JOÃO ALFREDO BOLIVAR PEDROSO

O EFEITO DA DELEÇÃO DO SOCS3 EM CÉLULAS RESPONSIVAS À LEPTINA EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

João Alfredo Bolivar Pedroso

O efeito da deleção do SOCS3 em células responsivas à leptina em diferentes condições experimentais

Teseapresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Donato Júnior

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Bolivar Pedroso, João Alfredo
O efeito da deleção do SOCS3 em células responsivas à leptina em diferentes condições experimentais / João Alfredo Bolivar Pedroso; orientador José Donato Junior. -- São Paulo, 2016.
97 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Obesidade. 2. Emagrecimento. 3. Leptina. I. Donato Junior, José, orientador. II. Título.

ERRATA

PEDROSO, J. A. B. **O efeito da delação do SOCS3 em células responsivas à leptina em diferentes condições experimentais. 2016.** 98 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Folha	Onde se lê:	Leia-se:
Agradecimento	À FAPESP e ao CNPq, pela bolsa e pelo auxílio financeiro: a pesquisa não seria viável sem o apoio destas instituições. Meus agradecimentos.	À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (PROCESSO 2013/25032-2) pelo recurso financeiro disponibilizado (Bolsa para realização do projeto de pesquisa). Meus agradecimentos.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS

BIOMÉDICAS_____

_____

Candidato(a): João Alfredo Bolivar Pedroso

Título da Tese: O efeito da deleção do SOCS3 em células responsivas à leptina em diferentes condições experimentais

Orientador(a): Prof. Dr. José Donato Júnior

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado,em sessão pública realizada em____/____/ 2016, considerouo(a) candidato(a):

() Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **012** nas fls. **03** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **José Donato Junior**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Neurofisiologia da leptina e regulação central da ingestão alimentar"* do qual participam o(s) aluno(s), **Thais Tessari Zampieri, Isadora Clivatti Furigo, João Alfredo Bolivar Pedroso, Laís Iatauro Cardinali, Vanessa Sayuri Nagaishi, Aline Coelho Macedo, Marina Silveira, Regina Silva** os pesquisadores **Martin Andreas Metzger, Sara Joyce Shammah Lagnado, Renata Frazão,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **19.03.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 20 de março de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico aos meus pais Fátima e Vicente, por todo esforço em minha criação que me permitiram chegar até aqui. E à minha esposa Carol, pelo seu amor, companheirismo, incentivo - elementos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e acima de tudo, por me fazer feliz!

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado de uma longa jornada, da qual muitas pessoas fizeram parte. Agradecer, muitas vezes, não é tarefa fácil. Portanto, para não correr risco de injustiça, agradeço de antemão a todos que, de alguma forma, participaram do desenvolvimento deste trabalho, desde a ajuda com os experimentos até na discussão da elaboração da tese.

Ao Prof. Dr. José Donato Junior, meu orientador, por confiar em mim e por ajudar no meu crescimento. Pelo seu excelente exemplo de profissional, a minha mais profunda admiração, o meu respeito e minha eterna gratidão.

À “Aninha”, técnica do laboratório: obrigado pela sua ajuda e pelos ensinamentos nos experimentos que, apesar de não estarem nesta tese, foram importantes para o desenvolvimento dos artigos publicados referentes a este trabalho.

Às amigas e integrantes do laboratório: Isadora, Pryscila e Angela,Obrigado pela preciosa colaboração “intelectual” e “braçal” durante todos esses anos do doutorado. Sem dúvida nenhuma, esta colaboração foi muito importante para o desenvolvimento desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Aos demais amigos do laboratório e ex-alunos: Leandro, Débora, Thais, Dani, Vanessa, Lais e Igor. Pela colaboração nas análises epor estarem dispostos em ajudar, sempre que fosse preciso.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas: meus sinceros agradecimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (PROCESSO 2013/25032-2) pelo recurso financeiro disponibilizado (Bolsa para realização do projeto de pesquisa). Meus agradecimentos

Por fim, peço minhas sinceras desculpas àqueles que porventura eu tenha esquecido de mencionar, dada a emoção do momento.

“A ciência marcha com os homens, sem os homens e apesar dos homens”.

Allan Kardec

RESUMO

PEDROSO, J. A. B. O efeito da delação do SOCS3 em células responsivas à leptina em diferentes condições experimentais. 2016. 98 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Diversos estudos buscam estratégias que aumentem a sensibilidade à leptina, como uma possível alternativa para o tratamento da obesidade. No entanto, neste contexto, a maioria das pesquisas limita-se em investigar somente os aspectos relacionados com o balanço energético. Poucos estudos averiguaram as demais variáveis fisiológicas moduladas pela leptina. Portanto, no presente trabalho investigamos os efeitos do aumento da sensibilidade à leptina sobre a ingestão alimentar e o balanço energético, mas também sobre a modulação da homeostase glicêmica, a capacidade cardiovascular e o impacto que a sensibilidade à leptina causa na taxa de mortalidade em longo prazo. Para tanto, considerando a participação das proteínas supressoras do sinal de citocinas (SOCS) na inibição da sinalização da leptina, camundongos com deleção do gene SOCS3 em células que expressam o receptor de leptina (LepR SOCS3 KO) foram submetidos, inicialmente, à obesidade induzida pela dieta. Como resultado, observamos que a deleção condicional do SOCS3 não foi capaz de prevenir o ganho de peso induzido pela dieta. Todavia, essa manipulação aumentou a sensibilidade à ação da insulina. A seguir, outrogrupode animais controle e LepR SOCS3 KO foram submetidos a protocolo de restrição alimentar e, na sequência, acompanhamos o consumo de ração e a recuperação de peso no período de realimentação. Constatamos que a ausência do SOCS3 em células responsivas à leptina promoveu redução da hiperfagia alimentar e menor ganho de peso no período de realimentação; no entanto, foi observado comprometimento nos mecanismos de controle da glicemia durante o período de restrição alimentar, particularmente, através da modulação no sistema nervoso simpático. Para elucidar possíveis efeitos colaterais ocasionados pelo aumento a sensibilidade à leptina, grupos de animais foram utilizados para analisar a capacidade cardiovascular, por meiodo teste de esforço em esteira. Animais LepR SOCS3 KO apresentaram menor desempenho no teste Constatamos que a taxa de mortalidade foi de quase 80% no grupo LepR SOCS3 KO, ao longo de 16 meses, enquanto que, no grupo controle, os animais permaneceram quase todos vivos durante esse período de acompanhamento. Nossos resultados ajudam a entender o efeito da leptina no balanço energético e no controle glicêmico durante a obesidade e após um período de restrição alimentar. Por fim, nossos dados apontam possíveis efeitos colaterais de futuras estratégias que visam aumentar a sensibilidade à leptina como alternativa para o tratamento da obesidade.

Palavras-chave:Leptina.Obesidade. Gliconeogênese.Emagrecimento.

ABSTRACT

PEDROSO, J. A. B. The effect of SOCS3 deletion from leptin responsive cells in different experimental conditions.2016. 98 p. PhD. thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Several studies have investigated strategies that increase leptin sensibility as a future alternatives to treat obesity. However, these studies investigated only changes in energy balance and only few assessed other potential effects of leptin. We investigated the effect of increasing leptin sensitivity on energy balance and weight control, but also in glucose homeostasis, cardiovascular performance and long-term mortality rate. For this purpose, we produced mice lacking SOCS3 only in leptin receptor-expressing cells (LepR SOCS3 KO mice). Initially, mice received high-fat diet to induce obesity. Inactivation of SOCS3 only in LepR-expressing cells protected against leptin resistance induced by diet-induced obesity (DIO), but did not prevent weight gain. However, LepR SOCS3 KO mice were protected from insulin resistance induced by DIO. Next, we investigated whether SOCS3 modulates post-restriction hyperphagia and weight regain. Control and LepR SOCS3 KO mice were subjected to a 48 hours fasting, followed by refeeding. LepR SOCS3 KO mice showed attenuated food intake and weight regain after a 48 h fasting. Post-restriction hyperleptinemia was also prevented in LepR SOCS3 KO mice.Remarkably, LepR SOCS3 KO mice showed impaired glucose control during fasting, leading to hypoglycemia. To investigate the mechanisms of action, we showed that increased leptin sensibility modulates the sympathetic nervous system and can be harmful to glucose homeostasis during fasting. To elucidate possible long-term side effects of leptin sensibility, we performed a maximal aerobic test in treadmill. LepR SOCS3 KO showed a lower aerobic performance in the test. This result indicates that leptin sensibility modulates cardiac function. Finally, mortality rate was over 80% during 16 months follow-up period in LepR SOCS3 KO, while control group remained alive during the same period. In conclusion, our results help to understand the effects of leptin to prevent obesity, but also highlight possible side effects from strategies that increase leptin sensitivity.

Keywords: Leptin. Obesity. Gluconeogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Pág.

Figura 1 -Produção de animais transgênicos: Sistema Cre/LoxP 38

Figura 2-Expressão de SOCS3 no hipotálamo de animais submetidos à administração de salina ou leptina (A) e após o consumo crônico de dieta padrão ou HFD (B). Consumo alimentar (C e E) e ganho de peso (D e F) após a administração crônica da leptina (*P < 0,05 CON vs. KO) 50

Figura 3 -Ganho de peso (A e B), consumo alimentar (C), adiposidade (D) e concentração de leptina sérica (E) dos animais submetidos à dieta HFD. (*P < 0,05 CON vs. KO) 52

Figura 4 -Expressão gênica hipotalâmica dos animais CON e LepR SOCS3 KO submetidos a 18 semanas de HFD (*P < 0,05 CON vs. KO) 53

Figura 5 - Concentração plasmática de glicose dos animais CON e LepR SOCS3 KO submetidos a 18 semanas de HFD nos períodos pós-prandial e jejum (*P < 0,05 CON vs. KO) 54

Figura 6 -Concentração plasmática de glicose dos animais CON e LepR SOCS3 KO submetidos a 18 semanas de HFD submetidos ao GTT e ao ITT e as respectivas áreas sob a curva (ASC) (*P < 0,05 CON vs KO) 55

Figura 7 - Concentração sérica de insulina (A) e glucagon (B) dos animais CON e LepR SOCS3 KO submetidos a 18 semanas de HFD. Expressão de proteínas pIR e pAKT no fígado (C) e no músculo (D) após o tratamento agudo de salina ou insulina (*P < 0,05 salina vs leptina #P < 0,05 CON vs KO) 56

Figura 8 - Consumo alimentar (A) e massa corporal (B) dos animais CON e LEpR SOCS3 KO submetidos a 48 horas de jejum seguido de realimentação (*P < 0,05 CON vs KO) 58

Figura 9 -Expressão hipotalâmica do gene SOCS3 (A) e concentração plasmática de Leptina (B) dos animais CON e LEpR SOCS3 KO submetidos a 48 horas de jejum seguido de re-alimentação (*P < 0,05 CON vs KO) 59

Figura 10 -Expressão gênica dos animais CON e LepR SOCS3 KO submetidos a 48 horas de jejum e seguido de realimentação (*P < 0,05 CON vs KO) 59

Figura 11 -Glicemia dos animais dos animais CON e LepR SOCS3 KO submetidos a 48 horas de jejum e seguido de realimentação (A). Percentual (B) e características os animais sobreviventes e mortos após 48 horas de jejum peso (C), idade (D) e glicemia (E). (*P < 0,05) 61

Figura 12 -Teste de tolerância ao piruvato (TTP) no ad libtum (A), após 24 (B) e 48 horas de jejum (C). Área sob a curva (AUC) nos grupos Controle e LepR SOCS3 KO nas 3 etapas do experimento (D) (*P < 0,05 CON vs KO) 63

Figura 13 -Concentração hormonal dos animais controle e LepR SOCS3 KO nos períodos ad libitum e jejum 64

Figura 14 -Teste de tolerância ao piruvato, com o bloqueio do sistema nervoso autônomo nos momentos Ad Libitum e Jejum (*P < 0,05 CON vs KO) 65

Figura 15 -Desempenho no teste de esforço máximo (TEM) em camundongos controle e com deleção de SOCS3 em células que expressam o receptor de leptina (LepR SOCS3 KO).Velocidade alcançada (A) e tempo até a exaustão (*P < 0,05 CON vs KO) 67

Figura 16 -Percentual de sobreviventes de animais controle e LepR SOCS3 KO ao longo de 16 meses de acompanhamento 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µg/h	Micrograma por hora
AGrP	Proteína relacionada à agouti
ARC	Neurônios do Núcleo Arqueado
CART	Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina
CCK	Colecistoquinina
COM	Controle
CSF	Fluído Cérebro Espinhal
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERK	Cinase Regulada Extracelularmente
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
Gh	Hôrmonio do Crescimento
GTT	Teste de Tolerância à Glicose
H2O	Água
HFD	Dieta Hiperlipídica
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ICV	Intracerebroventricular
IMC	Índice de Massa Corporal
IRS	Substrato do Receptor de Insulina
ITT	Teste de Tolerância à Insulina
JAK	Janus tirosina quinase
Kg	Quilograma
kg/m^2	Quilograma por metro quadrado
LepR	Receptor da Leptina
m^2	Metro quadrado
MCH	Hormônio concentrador de melanina
NPY	Neuropeptídio Y
ºC	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
pAKT	Proteína quinase B fosforilada
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PEPCK	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase
pIR	Receptor de Insulina fosforilado
pmol/kg/min	Picomoles por Quilograma por minuto
POMC	Pró-opiomelanocortina
PP	Polipeptídio Pancreático
PTP1B	Proteína tirosina fosfatase 1B
PTPN11	Proteína tirosina fosfatase não receptor do tipo 11
PTPN2	Proteína tirosina fosfatase não receptor do tipo 2
PTPRe	Proteína tirosina fosfatase receptor do tipo E
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo
RC	Restrição Calórica
RNA	Ácido ribonucleico
SH2B1	Proteína adaptadora sh2b 1
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS	Supressores do Sinal de Citocinas
STAT	Trasdutor de sinal e ativador de transcriação
TEM	Teste de Esforço Máximo
TTP	Teste de Tolerância ao Piruvato
UI/kg	Unidade Internacional por Quilograma
USP	Universidade de São Paulo
VMH	Núcleo Hipotalâmico Ventromedial
VO2max	Volume de Oxigênio Máximo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DE LITERATURA 19
2.1Regulação do apetite por hormônios gastrointestinais 20
2.2 Sinais periféricos de adiposidade 25
2.3Leptina e regulação do balanço energético 26
2.4Leptina e controle da glicemia 28
2.5Leptina e obesidade 29
2.6Ação da leptina em estratégias nutricionais no combate à obesidade 31
2.7Possíveis efeitos colaterais do aumento da ação da leptina: foco no sistema nervoso simpático 33
3 OBJETIVOS 36
3.1Objetivos específicos 36
4 MATERIAL E MÉTODOS 37
4.1Produção dos animais com deleção condicional do SOCS3 37
4.2Desenho experimental 39
4.3Experimento 1: SOCS3 e prevenção da obesidade induzida pela dieta 39
4.3.1 Teste de Tolerância à Glicose e Teste de Tolerância à Insulina 40
4.3.1.1 Eutanásia e coleta de tecidos 40
4.3.2Experimento 2: SOCS3 e hiperfagia alimentar após período de restrição calórica 41
4.3.2.1 Teste de Tolerância ao Piruvato 42
4.3.2.2 Teste de Esforço Máximo 43
4.3.2.3 Acompanhamento dos animais até o envelhecimento 43
4.3.2.4 Eutanásia e coleta dos tecidos 44
4.4Validação da deleção condicional do SOCS3 44
4.5Western Blot 45
4.5.1 Extração de proteínas 45
4.5.2 Eletroforese e transferência 45
4.6Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real 46
4.6.1 Extração de RNA total 46
4.6.2 Transcrição reversa 46
4.6.3Expressão gênica por PCR em tempo real 47
4.7Análise estatística 48

5 RESULTADOS 49

5.1Validação dos animais com deleção do SOCS3 condicionada às células que contêm o receptor de leptina 49

5.2Inativação do SOCS3 em células que expressam LepR não previne a obesidade induzida pela HFD 51

5.3Expressão gênica hipotalâmica dos animais CON e LepR SOCS3 KO submetidos à HFD 52

5.4Inativação do SOCS3 em células que expressam LepR previne a resistência à insulina em camundongos submetidos à HFD 53

5.5Inativação de SOCS3 em células que expressam LepR previne a hiperfagia e o reganho de peso após período de restrição alimentar 57

5.6Inativação de SOCS3 em células que expressam o LepR promove hipoglicemia e reduz a capacidade gliconeogênica de animais submetidos a jejum prolongado 61

5.7Inativação de SOCS3 em células que expressam o LepR compromete funcionamento cardiovascular e reduz o índice de sobrevivência 66

6 DISCUSSÃO 69

7 CONCLUSÃO 80

REFERÊNCIAS 81

APÊNDICE 93

A - Artigo 1 - Reviewing the Effects of L-Leucine Supplementation in the Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Glucose Homeostasis. 93

B - Artigo 2 - Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats. 93

C - Artigo 3 - Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats. 94

D- Artigo 4 - Leptin resistance is not the primary cause of weight gain associated with reduced sex hormone levels in female mice. 95

E - Artigo 5 - SOCS3 deficiency in leptin receptor expressing cells mitigates the development of pregnancy-induced metabolic changes. 95

F - Artigo 6 - Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. 96

ANEXOS 97

A - Anexo 1 - Primers utilizados para determinação de expressão gênica por PCR em tempo real 97

B - Anexo 2 - Anticorpos utilizados no *Western Blot* 98

1 INTRODUÇÃO

O aumento da incidência da obesidade, acompanhado pela dificuldade em manter a massa corporal reduzida, sugere a ação de importantes mecanismos moleculares envolvidos na regulação do balanço energético. Neste contexto, a leptina, hormônio produzido pelo tecido adiposo, tem ganhado cada vez mais atenção, devido seu potente efeito na modulação do consumo alimentar e do gasto energético.

Apesar de a leptina ser classicamente considerada como um potente hormônio anorexígeno(FRIEDMAN; HALAAS, 1998; HALAAS et al., 1995) em animais e humanos obesos sua ação na promoção do apetite e da perda de peso é reduzida, indicando, portanto, que a obesidade é marcada por uma resistência àleptina (HALAAS et al., 1997; ZHANG; SCARPACE, 2006). Nessa temática, diversos estudos demonstraram que um grupo de proteínas, conhecidas como supressores do sinal de citocinas (SOCS), tem papel essencial na resistência da ação da leptina. Comprova essa conclusão o fato de a obesidade ser marcada pelo aumento da concentração plasmática de leptina e, ao mesmo tempo, pelo aumento da expressão de SOCS3 no núcleo arqueado do hipotálamo de roedores(KROL; SPEAKMAN, 2007). Da mesma forma, em camundongos, a superexpressão de SOCS3 em neurônios pró-opiomelanocortina(POMC) promoveu obesidade, resistência à leptina e intolerância glicose(REEDet al., 2010). Destacando, portanto, a importante participação do SOCS3 na redução aos efeitos da ação da leptina, e consequentemente, na predisposição à obesidade.

Baseando-se nisso, terapias que aumentem a ação da leptina, como por exemplo, através de inibidores do SOCS3, apresentam-se como futuras estratégias terapêuticas no combate contra a obesidade, conforme demonstrado em animais deficientes de SOCS3 no cérebro ou somente em neurônios POMC, uma vez que estes apresentam atenuação da obesidade induzida por dieta (KIEVITet al., 2006; MORIet al., 2004). Da mesma forma, sugere-se que o aumento da sensibilidade àleptina seja interessante também em prevenir o reganho de peso, uma vez que a administração deste hormônio é capaz de reduzir a hiperfagia alimentar após período de restrição calórica(HAMBLYet al., 2012).

Contudo, a ação fisiológica da leptina não deve ser limitada somente ao balanço energético. Já é bem estabelecida sua influência na modulação do eixo tiroidiano, na puberdade, na fertilidade, além promover modulação no sistema nervoso autonômico, bem como na imunidade(FAROOQI; O'RAHILLY, 2014). Além disso, estudos demonstram o efeito da leptina no aumento da pressão sistólica e a associação entre o nível de leptina plasmática com problemas cardiovasculares(BELTOWSKI et al., 2004; MARTINet al., 2008). Portanto, apesar de terapias que aumentem a ação da leptina serem consideradasfuturas alternativas no tratamento da obesidade e no combate ao reganho de peso, não é claro se,no longo prazo, este fenômeno pode causar algumadisfunção, comprometendo a integridade do organismo. Por isso, torna-se necessário investigar o efeito do aumento na sensibilidade à leptina, não só no balanço energético, mas também em outros aspectos fisiológicos regulados por este hormônio.

No presente trabalho, foram produzidos camundongos deficientes da proteína SOCS3, apenas em células que expressam o receptor da leptina (LepR), e avaliado o efeito do aumento da sensibilidade à leptina, em diferentes aspectos fisiológicos (balanço energético, gliconeogênese e sistema cardiovascular) de animais submetidos à obesidade induzida por dieta e também no reganho de peso durante o período de recuperação nutricional. Nossos dados ajudam a entender o efeito da leptina, não só no balanço energético, mas também sua potente ação no controle da homeostase glicêmica e alterações no sistema cardiovascular como consequência da alteração do funcionamento do sistema nervoso simpático.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A incidência de obesidade vem crescendo progressivamente, tornando-a, nos dias de hoje,uma epidemia mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de pessoas obesas praticamente dobrou desde a década de 1980.Conformeestimativas da OMS, em 2005, o número de adultos com sobrepeso era de aproximadamente 1,6 bilhões,enquanto a obesidade atingia aproximadamente 400 milhões de pessoas no mundo inteiro. A previsão é ainda mais assombrosa, visto que a própria OMS sinaliza a expectativa,referente aos números de 2015, de que aproximadamente 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso eem torno de 700 milhões sejam obesos em todo o mundo.No Brasil, o quadro é similar; pesquisas têm mostrado aumento de 43% para 48% na prevalência de sobrepeso e de 11% para 15% de obesidade nos últimos anos (BRASIL, 2006, 2010).

Este fato é extremamente preocupante, pois o sobrepeso ea obesidadeaumentam a incidência defatores de riscos para diversos tipos de doenças crônicas não transmissíveis, tais quais diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e, até mesmo, alguns tipos de câncer. Dessa forma, a obesidade vem sendoconsiderada a causa principal de morte de 2,8 milhões de pessoas por ano em todo o mundo.Neste panorama, um recente estudo norte-americano mostrou forte relação entre o aumento do Índice de Massa Corporal (IMC) e a redução na expectativa de vida. Os pesquisadores mostraram que indivíduos com sobrepeso (IMC 26-29,9kg/m^2) tinham redução de 3 anos na expectativa de vida.O mais surpreendente foi encontrado em pessoas com IMC acima de 30kg/m^2,nas quais os resultados mostraram redução de até8 anos(GREGG, 2015).

O excesso de gordura corporal também leva a enormes gastos médicos. Recentes pesquisas têm mostrado que o custo para o tratamento da obesidade tem aumentado consideravelmente nos últimos anos.Bahiaet al., (2012)mostraramque o Brasil gasta anualmente 2,1 bilhões de dólares com o tratamento de doenças relacionadas ao sobrepeso e à obesidade. Portanto, políticas de saúde pública que visam a promoção da saúde devem ser incentivadas para o tratamento da obesidade, melhorando, assim, não só a qualidade de vida da população,mas minimizando o impacto econômicodo excesso de peso.

Sendo assim, para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no tratamento, torna-se importante, inicialmente, entender os fatores que influenciam no controledo comportamento alimentar.

Apesar de o excesso de pesoser consequência do desbalanço nutricional entre o consumo e o gasto energético, as causas da obesidade são complexas e multifatoriais. Dentre as causas mais importantes, o contexto ambiental é, sem dúvida, um dos principais responsáveis pela dificuldade no controle do peso. A falta de tempo, decorrente do aumento de atividades profissionais, tem influenciado na redução do estilo de vida fisicamente ativo e, paralelamente, a acessibilidade a comidas rápidas, de alta densidade calórica,tem favorecido o balanço energético positivo. Assim, alguns autores definem o ambiente em que vivemos atualmente como “obesogênico”, pois induz comportamentos e atitudes que favorecem ao ganho de peso(SWINBURN et al., 1999).

Apesar de os fatores ambientais influenciarem na decisão da escolha do alimento, é bastante claro que existem mecanismos fisiológicos complexos que regulam o comportamento alimentar. Baseando-se neste pressuposto, uma série de estudos foi desenvolvida para investigar os mecanismos envolvidos no controle alimentar.

2.1 Regulação doapetite por hormônios gastrointestinais

Já é bem estabelecido, por exemplo, que peptídeos produzidos pelo trato gastrintestinaltêm capacidade de influenciar a homeostase energética (MURPHY; BLOOM, 2006). Um dos primeiros hormônios conhecidos secretados pelo trato digestório que influencia o comportamento alimentar e o balanço energético é a colecistoquinina (CCK). A secreção de CCK é estimulada principalmente pela presença de gordura no intestino delgado, onde sua ação periférica promoverá contração da vesícula biliar, resultando, então, na secreção da bile – que exerce papel importante na emulsificação lipídica durante o processo digestório das gorduras. Ademais, destaca-se a ação da CCK na regulação da secreção do suco pancreático, além de reduzir a motilidade e o esvaziamento gástrico. A ação da CCK no comportamento alimentar foi relatada em 1973,quando Gibbset al., demonstraram que este hormônio reduziu o consumo alimentar em ratos, provando, portanto, sua ação

na saciedade(GIBBSet al., 1973). Estudos posteriores mostraram que a ação da CCK é principalmente importante para regular o tamanho da refeição, mas não tem influência no balanço energético total. Em um trabalho desenvolvido com ratos, CCK foi administrada durante 6 dias antes do início de cada refeição. Como resultado, foi encontrado que o volume das refeições diminuiu quase 44%; por outro lado, o número de refeições aumentou 162% ao longo dos 6 dias de tratamento. Apesar de ter sido observada redução na massa corporal no primeiro dia de infusão, não houve diferença no peso ao final do experimento, devido os mecanismos compensatórios, que promoveram aumento da frequência das refeições, de forma que o consumo calórico total não fosse substancialmente afetado(WESTet al., 1984).

Outro hormônio gastrointestinal que promove influência no apetite é o polipeptídio pancreático (PP). Secretado pelo pâncreas endócrino, sua estrutura consiste em uma cadeia de 36 aminoácidos e sua ação periférica promove efeito inibitório no esvaziamento gástrico, bem como retardo no aumento da insulina pós-prandial(SCHMIDTet al., 2005). No que diz respeito ao comportamento alimentar, em camundongos geneticamente obesos (ob/ob) e com ausência de células PP no pâncreas, a infusão diária (2 vezes ao dia) de PP promoveu supressão no ganho de peso e redução na hiperfagia (MALAISSE-LAGAEet al., 1977). Da mesma forma, em 2003, Asakawaet al.,demonstraram, também em camundongos ob/ob, que a administração periférica de PP induziu o balanço energético negativo,por meio da redução do consumo alimentar e do aumento do gasto energético; corroborando os estudos anteriores, o tratamento com PP promoveu retardo no esvaziamento gástrico (ASAKAWAet al., 2003). Resultados similares também foram encontrados em humanos, sendo que a infusão intravenosa de PP (10pmol/kg/min), durante 90 min, promoveu redução do apetite e do consumo energético em uma refeição após 2 horas do término da infusão. Além disso, a administração de PP também promoveu efeitos crônicos, pois foi observada redução sustentada no consumo energético ao longo de 24 horas após o tratamento(BATTERHAMet al., 2003b).Baseados nos resultados acimadescritos, Murphy; Bloom(2006)afirmaram que a administração de PP pode ser umaestratégiainteressante como tratamento medicamentoso contra a obesidade.

Outro peptídeo produzido pelo intestino,com influência no comportamento alimentar, é o YY (PYY). Este hormônio é secretado de maneira proporcional àquantidade de calorias ingeridas na dieta. Sua estrutura consiste em uma cadeia

de 36 aminoácidos e é secretado pelas células L do trato gastrointestinal, além de ser amplamente expresso em todo o intestino, com altos níveis detectados no colón e noreto(ADRIANet al., 1985).Existem duas formas estruturais do PYY secretadas pelo organismo: a PYY1-36 e a PYY3-36, sendo a PYY3-36 com maior influência no controle alimentar. Diversos estudos em humanos e animais demonstram o efeito anorexígeno do PYY3-36. Em ratos, a administração intraperitoneal de PYY3-36 reduziu o consumo alimentar e, por consequência, promoveu a redução no ganho de peso (BATTERHAMet al., 2002). Em humanos, a infusão de PYY3-36, na taxa de 0,8 pmol/kg/min, foi capaz de promover redução no consumo alimentar, após 2 horas do término da infusão, em uma refeição de livre escolha em *buffet*. Além disso, após 24 horas da infusão, o consumo alimentar foi 33% menor, quando comparado ao grupo que recebeu salina (BATTERHAM et al., 2002).Alguns trabalhos também relatam que os benefícios na perda de peso, através de cirurgias bariátricas, podem ocorrer, em parte, devido a alterações na produção de PYY3-36. Deste modo, sugere-se que o aumento da concentração de PYY3-36 encontrado em pacientes após cirurgia bariátrica pode promover supressão da fome, resultando em sustentada perda de peso em longo prazo (BALLANTYNE, 2006). Apesar de obesos apresentarem baixa concentração basal de PYY3-36, diferentemente de outros hormônios, parece não existir quadro de resistência à ação do PYY3-36 na obesidade. Batterham et al., (2003a) mostraram que a infusão de PYY3-36, em obesos, promoveu redução no consumo alimentar similarmente aos sujeitos magros (grupo controle) que também receberam a infusão. Devido este efeito, a utilização terapêutica com PYY3-36 pode ser, futuramente, uma estratégia farmacológica interessante para o tratamento e a prevenção da obesidade.

O peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) é produzido pela clivagem do pró-glucagon, sendo secretado pelas células Ldo trato gastrointestinal, localizadas principalmente no íleo e no cólon. O GLP-1 é secretado na corrente sanguínea em resposta à proporção de calorias consumidas na refeição. No entanto, sua ação é rapidamente inativada pela dipeptidil-peptidase 4 (DPP-4); assim,sua meia vida no sangue é de aproximadamente 1 a 2 minutos(MENTLEIN et al., 1993). Sobre sua ação no controle alimentar, o GLP-1 tem sido proposto como um regulador na saciedade pós-prandial. Turtonet al., (1996) mostraram, em ratos no jejum, que injeções intracerebroventriculares de GLP-1 reduziram o consumo alimentar. Em humanos, quatro estudos mostraram que a administração de GLP-1 reduz o

consumo alimentar (10-32%) comparado com o grupo salina (FLINT et al., 1998; GUTZWILLER et al., 1999a,1999b; NASLUNDet al., 1999). Além disso, em uma meta-análise,Verdich et al., (2001)afirmaram que, apesar de adultos magros e obesos reduzirem o consumo alimentar cominfusão de GLP-1, a resposta na saciedade em obesos é menor. Além do efeito anorexígeno, a GLP-1 pode atuar no controle da glicemia, através da secreção de insulina pelas células *β* do pâncreas. Baseado nesse conceito,3 semanas de tratamento com GLP-1melhoraram o controle glicêmico em pacientes com diabetes tipo II(TODD et al., 1998).

A oxintomodulina (OXM) é um peptídeo produzido pelas células L do intestino, formado por 37 aminoácidos. É liberada na corrente sanguínea pelas células enteroendócrinas, em proporção à ingestão energética, em torno de 5 a 10 minutos após o início das refeições(BALDISSERA; HOLST, 1984; LE QUELLECet al., 1992).Além disso, alguns indicativos mostramque aOXM pode exercer ação similar às incretinas(WYNNE et al., 2005). No entanto, nem todos os trabalhos conseguiram demonstrar aumento da concentração de insulina pós-prandial após a administração exógena de OXM(COHEN et al., 2003), sendo necessário o desenvolvimento de mais pesquisas para comprovar tais efeitos. No que diz respeito à sua ação no comportamento alimentar, estudos com animais demonstram que tanto a administração intracerebroventricular (ICV)(DAKIN et al., 2001) como a intraperitoneal(SOWDEN et al., 2007) promovem redução no consumo alimentar, podendo, dessa forma, ser um potente alvo para o tratamento terapêutico contra a obesidade. Corroborando essa hipótese,Dakinet al., (2002) demonstraram, em roedores, que a infusão ICV de OXM ao longo de 7 dias de tratamento promoveu significativa redução no peso e nos depósitos de gordura, quando comparado ao grupo controle. Esse efeito ocorreu mesmo quando comparado a grupos *pair fed*, que apresentaram consumo de ração similar. Esses resultados sugerem que as modificações na composição corporal ocorreram não só devido a ação da OXM no consumo alimentar, mas também por meio de sua influência na promoção do gasto energético. Trabalhos em humanos demonstram resultados similares.Cohenet al., (2003) reportaram que a infusão intravenosa de OXM em indivíduos magros promoveu redução no consumo alimentar (19%) em uma refeição de livre escolha em *buffet*. Além disso, o consumo alimentar cumulativo, 12 horas após o tratamento, foi reduzido em 11,3%. No que diz respeito ao tratamento crônico, a administração subcutânea pré-prandial em obesos, durante 4 semanas, promoveu significativa

redução de peso quando comparada ao grupo controle tratado com salina (2,3kg *vs* 0,5kg; respectivamente)(WYNNE et al., 2005).

Apesar de a maioria dos hormônios gastrointestinais promoverem ação anorexígena, esse papel não é característica de todos. Nesse aspecto, a grelina, produzida predominantemente pelo estômago, é o único peptídeo gastrintestinal conhecido que apresenta ação orexígena. Dessa forma, injeções sistêmicas de grelina aumentam o consumo alimentar em humanos e roedores e sua administração crônica induz obesidade em animais(TSCHOP et al., 2000; WREN et al., 2001a,2001b). Seus níveis estão elevados no jejum e se encontram reduzidos durante a alimentação.Assim, tem sido sugerida sua participação no controle do início da alimentação(CUMMINGS et al., 2001). No que diz respeito à relação com a composição corporal, o nível plasmático de grelina é inversamente proporcional à massa corporal e, além disso, aumenta após a perda de peso (CUMMINGS et al., 2002).Níveis aumentados deste potente peptídeo orexigênico após o emagrecimento explicam, parcialmente, a dificuldade que os sujeitos encontram em manter o peso reduzido e a tendência em reganhar o peso após uma intervenção dietética. Devido ao seu potente efeito estimulador do apetite, alguns trabalhos investigam o seu uso clínico em pacientes com caquexia. Nessa conjuntura, emindivíduoscom câncer,no qual uma característica clássica é a perda de apetite, a infusão de grelina promoveu aumento no consumo alimentar em uma refeição de livre escolha em *buffet*(NEARY et al., 2004). Além disso, o desenvolvimento de anticorpos que atuam no bloqueio da ação da grelina é uma potencialalternativa futura para o tratamento da obesidade. Dessa forma, Zorrilla et al., (2006) mostraram, em roedores, que a administração de imunoconjugados para grelina reduziu a eficiência alimentar, o ganho de peso e a adiposidade.

Além da ação no comportamento alimentar, alguns estudos sugerem o papel essencial do eixo *Grelina-Hormônio do crescimento*(Gh) na manutenção da concentração glicêmica durante período rigoroso de balanço energético negativo. Durante restrição alimentar, ocorre aumento na produção de grelina pelo estômago. O receptor de grelina, conhecido comoGHS-R, é amplamente expresso em somatotrófos da hipófise anterior e sua ativação causa potente secreção do GH. Por conseguinte, o GH promove aumento da concentração de glicemia, através da diminuição da oxidação da glicose e de sua captação em vários tecidos e, ainda, estimulando sua produção no fígado(GHANAAT; TAYEK, 2005; PELL; BATES,

1990). Para comprovar essa teoria, um grupo de pesquisadores demonstrou,tanto em animais *knockout*de grelina ($Ghrl^{-}/^{-}$) (LI et al., 2012), bem como em animais *knockout*para aGrelina-O-Aciltransferase ($GOAT^{-}/^{-}$) – enzima responsável por transformar a grelina na sua forma ativa(ZHAO et al., 2010) – que a restrição alimentar de 60% causauma profunda hipoglicemia, quando comparados com animais selvagens. Adicionalmente, a concentração de GH foi aumentada somente no grupo controle, mas não nos animais $Ghrl^{-}/^{-}$ e $GOAT^{-}/^{-}$, confirmando, portanto, o relevante papel da grelina na elevação dos níveis de GH para a manutenção da concentração de glicose no sangue, garantindo a sobrevivência dos animais durante períodos de escassez alimentar.

Vale ressaltar que, apesar de os neuropeptídios gastrointestinais apresentarem considerável influência no comportamento alimentar, parece que tal participação é importante principalmente na regulação do início, da duração, do término e do intervalo entre as refeições. Portanto, devido ao limitado entendimento entre a interação endócrina e os sinais neurológicos no controle alimentar, especialmente em longo prazo, ainda é questionável a manipulação desses hormônios para o tratamento do controle de peso e do combate à obesidade.

2.2 Sinais periféricos de adiposidade

Uma das principais hipóteses sobre a regulação do controle alimentar baseia-se na teoria adipostática,também conhecida como teoria do*set-point.* A ideia supõe que nosso corpo produz um sinal que indica a quantidade de energia armazenada – na forma de gordura corporal. Esse sinal é recebido pelo sistema nervoso central (SNC), que regula mecanismos compensatórios (consumo alimentar e gasto energético), a fim de restaurar o peso e a adiposidade para valores previamente determinados pelo nosso próprio organismo (FARIAS et al., 2011; HARRIS, 1990; SPEAKMAN et al., 2002).

Assim, diversos estudosforam desenvolvidos para tentar elucidar qual substância seria responsável pelo “sinal energético”. Em função da forte correlação entre a massa adiposa corporal e os níveis plasmáticos de insulina, os estudos iniciais nessa área postulavam que a insulina poderia ser uma possível candidata.Além disso, a concentração da insulina no fluído cérebroespinhal (CSF) é

maior em obesos, sendo reduzida proporcionalmente após período de jejum. A hipótese era baseada, ainda, na descoberta da distribuição do receptor de insulina em diversas regiões do cérebro. Baseados nesses pressupostos,(WOODS et al., 1979)demonstraram que a infusão intracerebroventricular da insulina diminuía o consumo alimentar e a massa corporal em babuínos. Estudos posteriores tambémsuportam a participação da insulina na regulação do comportamento alimentar.Bruning et al., (2000)encontraram, em camundongos, que a deleção de receptores de insulina apenas em neurônios promoveu ganho de peso e aumento da adiposidade.

No entanto, o grande avanço sobre o conhecimento dos mecanismos que controlam o comportamento alimentar aconteceu em 1994,quando o grupo do Dr. Jeffrey Friedman descobriu que a mutação, em camundongos, de um geneem particular,levava àobesidade mórbida e ao diabetes do tipo II. Dado o potente efeito deste gene no conteúdo de gordura corporal, os autores nomearam esse gene como gene da obesidade (ob) (ZHANG et al., 1994). Mais tarde, um trabalho desenvolvido pelo mesmo grupo, demonstrou que animais com mutação do gene ob, quando recebiam a reposição da proteína codificada por esse gene ausente, tinham redução de 30% de massa corporal ao longo de 2 semanas de tratamento,sugerindo que a expressão deste gene estava relacionada como consumo alimentar e com os depósitos de gordura corporal. Devido sua ação, os pesquisadores sugeriram o nome de leptina para a proteína codificada pelo gene OB (do grego leptós que significa: magro). A partir disso, uma série de estudos foi desenvolvida, na perspectiva de investigar os principais efeitos da leptina no controle alimentar.

2.3 Leptina e regulação do balanço energético

A leptina se destaca como um dos principais componentes fisiológicos que controlam o comportamento alimentar e o balanço energético nolongoprazo. Esse hormônio é secretado proporcionalmente à quantidade de gordura estocada no tecido adiposo e, uma vez lançada na corrente sanguínea, a leptina tem a capacidade de interagir com diversas regiões hipotalâmicas, resultando na redução do consumo calórico e no aumento no gasto energético (FRIEDMAN; HALAAS, 1998;ZHANG et al., 1994). Como evidência da importância da leptina sobre o

controle do balanço energético, camundongos e seres humanos deficientes desse hormônio (ou de seu receptor cognato) apresentam obesidade mórbida e hiperfagia (MONTAGUE et al., 1997).

A sinalização da leptina depende de sua ligação a um receptor monomérico transmembrana da família dos receptores de citocina da classe I (TARTAGLIA et al., 1995). O receptor de leptina de forma longa (Ob-Rb, aqui referido de maneira genérica como LepR) não possui atividade catalítica intrínseca, pois depende da ligação com uma proteína citosólica com atividade tirosina quinase chamada de Janus quinase -2 (JAK-2) (BJORBAEK et al., 1997). A ligação do hormônio promove a dimerização do LepR. Uma vez dimerizados, há ativação e fosforilação em tirosina das moléculas de JAK-2 que, por fim, catalisam a fosforilação do LepR nos resíduos tirosina 985 e 1138. Criam-se, dessa forma, sítios ativos que darão continuidade ao sinal da leptina. O sítio JAK-2 fosforilado promoverá o recrutamento e a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) e a consequente ativação da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K) (MORTON et al., 2005; XU et al., 2005) que desempenha papel importante sobre os efeitos agudos da leptina (DONATO et al., 2010). Além disso, o resíduo tirosina 985 fosforilado no LepRé conhecido por ser um sítio derecrutamento de SRC homólogo-2 (SHP-2), que leva àativação da cinase regulada extracelularmente (ERK)e da c-Fos (MUNZBERG; MYERS, 2005). Por fim, o terceiro sítio do sinal da leptina, tirosina 1138, promove recrutamento do fator de transcrição, conhecido como trasdutor de sinal e ativador de transcriação 3 (STAT3), responsável por conduzir o sinal gerado pela leptina ao núcleo. Uma vez fosforilado, o STAT3 dimerisa-se e transloca-se para o núcleo, ondecombina-se com sequências promotoras do DNA e medeia a regulação da transcrição de genes-alvo (LEONARD; O'SHEA, 1998). Esta etapa é crucial paraa açãoda leptinasobre o consumo alimentareo gasto energético (BATES et al., 2003; CUI et al., 2004).

Uma vez no SNC, a leptina interage com seus receptores encontrados em núcleos hipotalâmicos, tais como em neurônios do núcleo arqueado (ARC), regulando a ingestão alimentar e o gasto energético. O ARC possui pelo menos dois conjuntos de neurônios inter-relacionados e influenciados pela leptina, sendo que um destes induz efeitos orexigênicos (aumento da ingestão alimentar) e outro induz efeitos anorexigênicos (redução da ingestão alimentar). O aumento da leptina plasmática promove supressão da atividade de neurônios que produzem neuropeptídeo Y e peptídeo relacionado ao agouti (NPY/AgRP), que possuem

efeitos orexígenos, enquanto que estimula a atividade de neurônios produtores de pró-opiomelanocorticotropina (POMC) e do transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), que possuem efeitos anorexígenos (SCHWARTZ et al., 2000). Cabe ressaltar que outras populações de neurônios, no hipotálamo e no tronco cerebral, também são afetadas direta e indiretamente pela leptina (MUNZBERG; MYERS, 2005; MYERS et al., 2009).

2.4 Leptina e controle da glicemia

Estudos demonstram que, independentemente dos efeitos sobre a taxa metabólica basal e o consumo alimentar, a leptina também pode controlar mecanismos envolvidos na homeostase glicêmica. Tem sido comprovado que a ação deste hormônio no hipotálamo ventromedial também está relacionada com a regulação na secreção de glucagon pelo pâncreas, resultando, portanto, na redução da concentração da glicemia (MEEK; MORTON, 2012). De acordo com essa afirmação, a administração crônica de leptina foi capaz de restaurar a euglicemia de ratos diabéticos tratados com estreptozotocina, sem encontrar qualquer diferença no consumo de alimento (HIDAKA et al., 2002). Em outro estudo, a reexpressão de LepR exclusivamente em neurônios POMC foi suficiente para normalizar a glicemia e melhorar a sensibilidade à insulina no fígado de camundongos deficiente de LepR, independentemente de alterações no peso corporal (BERGLUND et al., 2012b).

Além da regulação da secreção de glucagon pelo pâncreas, outra ação importante da leptina no controle glicêmico diz respeito à sua ação sobre a inibição de enzimas hepáticas envolvidas na gliconeogênese e na glicogenólise. Nesta conjuntura, em estudo com ratos tratados com dieta de alto teor lipídico,Pocaiet al.,(2005) observaram que a infusão ICV de leptina inibiu a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima que converte o oxalacetato em fosfoenolpiruvato, importante etapa da gliconeogênese, além de inibir a atividade da glicose-6-fosfatase (G-6-P), enzima responsável pela liberação da glicose hepática na circulação. Em outro estudo, a deficiência do LepRlevou à perda da capacidade do fígado em inibir a liberação de glicose durante um clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. Por outro lado, a sinalização da leptina sobre neurônios POMC restaurou os efeitos inibitórios da insulina sobre a produção hepática de glicose

(BERGLUND et al., 2012b). Portanto, a ação da leptina sobre o SNC tem se mostrado essencial para o controle adequado da glicemia. Os mecanismos envolvidos com essa ação da leptina (neural ou neuroendócrina)não foram totalmente esclarecidos. Além disso, a maioria das pesquisas foi desenvolvida em situações experimentais, nas quais a redução da glicemia evitaria o desenvolvimento de diabetes mellitus secundário à obesidade. No entanto, pouca atenção é destinada ao impacto da leptina no controle glicêmico durante situações de restrição alimentar severa, cuja inibição da gliconeogênese pode produzir condições indesejáveis de hipoglicemia.

2.5 Leptina e obesidade

Devido o papel da leptina sobre a inibição do apetite, alguns estudos começaram a investigar sua utilização como uma possível alternativa para o tratamento farmacológico contra obesidade. De fato, a administração exógena de leptina em camundongos selvagens magros promoveu redução no consumo alimentar esustentada perda de peso (12%), particularmente por meio da redução do tecido adiposo (12,2 para 0,7%) (HALAAS et al., 1995). No entanto, em animais obesos, a administração subcutânea de leptina não promoveu tais efeitos (HALAAS et al., 1997). Mais ainda: tanto em humanos como em animais obesos, a concentração plasmática de leptina é significativamente maior. Portanto, ao menos em obesos, deve existir uma possível resistência à ação deste hormônio, o que poderia favorecer o quadro de ganho de peso.

Existem vários mecanismos propostos para explicar a resistência à leptina durante a obesidade. Primeiramente, foi postulado o comprometimento do transporte de leptina para o cérebro. De fato, Caroet al., (1996) demonstraram que a razão entre a concentração de leptina no fluído cérebro-espinhal/plasma foi maior em indivíduos magros, concluindo que a saturação do transporte de leptina poderia explicar sua resistência na obesidade. Além dessa teoria, por meio do avanço de técnicas moleculares, descobriu-se, em roedores, que alterações genéticas podem comprometer a expressão do LepR, contribuindo, portanto, para o quadro de obesidade. Em humanos, diversos polimorfismos e mutações no LepR foram investigados, devido à relação com o fenótipo de obesidade, sendo sugerido que a

modificação estrutural do receptor poderia comprometer seu funcionamento adequado. Contudo, vale destacar que o desenvolvimento de tais polimorfismos é raro e tudo indica que tais fatores genéticos não são a causa primária do desenvolvimento da obesidade na população. Por outro lado, nos últimos anos, tem-se buscado investigar defeitos na transdução do sinal de leptina, comprometendo seu papel no controle do comportamento alimentar.

Assim, uma das primeiras evidências de que mecanismos pós-receptores poderiam comprometer a ação anorexigênica da leptina foi demonstrada por (EL-HASCHIMI et al., 2000), através de um estudo com camundongos obesos induzidos pela dieta. No trabalho, os pesquisadores mostram que, em4 semanas de dieta hiperlipídica, a ativação hipotalâmica de STAT3 foi indetectável após a administração intraperitoneal de leptina e, ainda, após 15 semanas com ração de alto teor lipídico, apesar de a administração intracerebroventricular de leptina promover indução do STAT3, a magnitude foi consideravelmente reduzida, quandocomparada com aquela observada em animais magros controles. Portanto, foi sugerido que a expressão de uma proteína que possua a capacidade de bloquear a ação do sinal da leptina poderia estar atrelada ao mecanismo de resistência.

Nessa temática, diversos estudos demonstraram que um grupo de proteínas, conhecidas como supressores do sinal de citocinas (SOCS), tem papel essencial na resistência da ação da leptina. Dessa forma, está bem estabelecido que as SOCS atuam como reguladores negativos da sinalização de citocinas via inibição da transdução do sinal JAK/STAT (YASUKAWA et al., 1999). Além disso, a própria ativação do LepR induz a expressão de SOCS3. Esta proteína inibe a fosforilação de JAK2 e a ativação do sinal LepR-STAT3 (FRUHBECK, 2006; HOWARD; FLIER, 2006). Comprovando esse fato, a superexpressão de SOCS3 em neurônios POMC induziu resistência à leptina, obesidade e intolerância à glicose (REED et al., 2010). Por outro lado, a deleção condicional dessa proteína no sistema nervoso ou no músculo esquelético pode atenuar a obesidade induzida pela dieta (JORGENSEN et al., 2013; MORI et al., 2004).Além de SOCS3, a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) está diretamente envolvida na resistência à ação da leptina durante a obesidade. A PTP1B exerce função de desfosforilação de proteínas no resíduo de tirosina. Dessa forma, uma vez que a via de sinalização de leptina é dependente da ativação de JAK2, a PTP1B pode desfosforilar a JAK2, atenuando, portanto, o sinal da leptina. Para comprovar a participação da PTP1B no comportamento alimentar,

camundongos com deleção de PTP1B apresentaram diminuição na razão leptina/adiposidade e aumento da sensibilidade à leptina devido ao aumento da expressão hipotalâmica de STAT3 (ZABOLOTNY et al., 2002).

Com baseado nesses resultados, estratégias que visam o aumento da sensibilidade da ação da leptina, seja pela inibição de SOCS3 ou PTP1B,são promissores alvos para o desenvolvimento de terapias farmacológicas para o tratamento da obesidade.

2.6 Ação da leptina em estratégias nutricionais no combate à obesidade

Considerando a obesidade como uma doença crônica e progressiva, é importante destacar as etapas utilizadas para o tratamento e que se intensificam conforme a evolução da doença. Inicialmente, para todos os pacientes obesos, as principais recomendações são as terapias que estão envolvidas no estilo de vida, como aumentar a prática de exercício físico em associaçãoà dieta equilibrada. Para pacientes que não alcançam progressos na perda de peso somente com as mudanças no estilo de vida, recomenda-se a prescrição de medicamentos para ajudar no tratamento. Por fim, na terceira etapa,encontra-se os procedimentos cirúrgicos que devem ser recomendados quando todas as outras estratégias forem ineficazes para reverter o quadro de excesso de gordura corporal ou quando há comorbidades severas instaladas. É importante destacar que a escolha do tratamento adequado se baseia na gravidade do problema e na presença de complicações associadas e que quaisquer das estratégias adotadas apresentam vantagens e desvantagens que devem ser levadas em consideração na hora da escolha do procedimento mais adequado.

Entre as estratégias envolvidas na mudança do estilo de vida, destaca-se a intervenção nutricional conhecida como restrição calórica (RC).Essa técnica consiste em consumir quantidade de calorias inferior ao gasto energético, promovendo balanço energético negativo, a fim de mobilizar os estoques de gordura corporal para geração de energia.

Contudo, apesar de diversos estudos demonstrarema efetividade da RC na perda de gordura corporal em pessoas obesas e com sobrepeso(AHMADI et al., 2011; LARSON-MEYER et al., 2006; REDMAN et al., 2011), apenas pequena parcela desses

indivíduos mantém o peso reduzido por longo período de tempo. Em uma meta-análise desenvolvida sobre o tema, foi demonstrado que,com o passar dos dias, quase dois terços dos sujeitos recuperam até mais quilos do que aqueles perdidos através da RC(MANN et al., 2007). Além disso, evidências experimentais sugerem que sucessivos ciclos de perda de massa corporal, acompanhados por períodos de ganho de peso, facilitam o desenvolvimento da obesidade(RICCARDI et al., 2004; SEA et al., 2000).Em outro estudo, MacLeanet al., (2006)mostraram que algumas intervenções nutricionais falharamno longo prazo devido a adaptações de mecanismos compensatórios, que resultaram em rápido e eficiente reganho de peso.

Dentre os principais fatores envolvidos no reganho de peso, após período de ingestão energética reduzida, destaca-se um fenômeno conhecido como *hiperfagia pós-restrição calórica* – ou seja, excessivo consumo alimentar é observado quando animais têm acesso irrestrito ao alimento, após período deRC(BJORNTORP; YANG, 1982) Além disso, já é bastante conhecido que a redução na massa corporal resulta em diminuição no gasto energético(ARONE et al., 1995; REDMAN et al., 2009), promovendo, portanto, aumento da eficiência metabólica e reganho de peso(MACLEAN et al., 2006).Tendo em vista o potente efeito da leptina na regulação do controle alimentar, alguns estudos investigaram as mudanças de concentração da leptina plasmática após o período de restrição alimentar.

Diversos estudos sugerem que o comportamento alimentar pode influenciar a concentração sanguínea de leptina. De forma aguda, estudo desenvolvido com camundongos mostrou que 48 horas de privação alimentar resultaram em 82% de redução na concentração desse hormônio(AHIMA et al., 1996). Similarmente, em humanos, a concentração de leptina foi reduzida após período de 72 horas de jejum, chegando a diminuir 90% do valor encontrado no estado basal(CHAN et al., 2003). De forma crônica, seis meses de RC, em humanos, promoveram redução de 44% da concentração de leptina na circulação (LECOULTRE et al., 2011).

Por outro lado, a realimentação, após período de RC, causa aumento da expressão do gene da leptina no tecido adiposo branco, que é associado com elevação na concentração sérica deste hormônio(CRUJEIRAS et al., 2010; HAMBLY et al., 2012; SUCAJTYS-SZULC et al., 2009). Mas, apesar do efeito anorexígeno da leptina, aingestão alimentar não é efetivamente suprimida. Pelo

contrário, estudos demonstram aumento no consumo alimentar nesse período. Hamblyet al. (2012)constataram que, após 4 dias de realimentação *ad libitum*, houve aumento na concentração de leptina; entretanto, nesse mesmo momento, apesar da estabilização nas concentrações séricas desse hormônio, os animais ainda apresentavam hiperfagia. Portanto, ***é possível especular que, assim como na obesidade, o aumento expressivo de leptina após RC esteja associado à resistência desse hormônio***. Esses fatos sugerem a ação de mecanismos compensatórios que resultam no aumento do consumo alimentar e na redução do gasto energético após período de RC. No conjunto, esses efeitos levam ao reganho de peso. Neste caso, torna-se importante investigar se terapias que visam aumentar a sensibilidade à leptina após o período de restrição alimentar poderiam inibir os efeitos deletérios que promovem reganho de peso,contribuindo, assim, com a manutenção da massa corporal no longo prazo.

2.7 Possíveis efeitos colaterais do aumento da ação da leptina: foco no sistema nervoso simpático

Se, por um lado,estratégias terapêuticas que aumentam a sensibilidade à leptina podem apresentar futurosbenefícios no combate à obesidade e ao ganho de peso, torna-se necessárioinvestigar, também, se o aumento a ação deste hormônio promove algum efeito deletério ao equilíbrio interno do organismo.

A preocupação neste ponto baseia-se em estudos que demonstram a ação da leptina em diversos aspectos fisiológicos, além daqueles relacionados ao controle do peso. É sabido que a leptina participa, por exemplo, naregulação do controle neuroendócrino, da puberdade, da fertilidade, do sistema imunológico edo sistema nervoso autonômico, em especial do sistema nervoso simpático(FAROOQI; O'RAHILLY, 2014).

Neste último aspecto,o aumento da concentração plasmática de leptina foi associado com o aumento da ativação simpática em humanos saudáveis(PAOLISSO et al., 2000).Já em animais, a injeção intracerebroventricular de leptina aumentou a atividade simpatética do plexo lombar (SHI et al., 2015)enquanto sua administração intravenosaaumentou a

atividade simpática para o tecido adiposo marrom, os rins e as glândulas adrenais em ratos Sprague-Dawley (HAYNES et al., 1997).

Assim, tendo em vistaa ligação entre o aumento do tônus simpático no surgimento de desordens metabólicas relacionadas com a síndrome metabólica(MOREIRA et al., 2015)e conhecendo o efeito da leptina no aumento da atividade simpática, conforme previamente discutido, é possível especular oenvolvimento deste hormônio no desenvolvimento de tais alterações. Neste sentido, alguns estudos demonstram, conforme evidenciado em animais, que a administração de leptina aumentou a pressão sanguínea sistólica (BELTOWSKI et al., 2004). Da mesma forma, em humanos, a concentração da leptina foi associada, de forma independente, com resistência à insulina e doenças cardiovasculares(MARTIN et al., 2008).

Supõe-se que tais alterações aconteçam especificamente pelo aumento da concentração de leptina e,consequentemente, da sua atividade. Isso porque, apesar de aobesidade ser marcada por resistência à leptina, acredita-se que isso não ocorra de maneira global. Este conceito foi demonstrado em experimento com camundongos obesos e controles, quandoadministração exógena de leptina promoveu perda de peso e redução do consumo alimentar de maneira dose-dependente nos animais controles, mas não no grupo obeso. No entanto, animais de ambos os grupos apresentaram aumento no tônus simpático de modo similar, sugerindo, portanto, que a resistência ao efeito da leptina acontece de maneira seletiva. Dessa forma, mesmo durante a obesidade, a leptina tem a sua atividade aumentada e, assim, modulandoo tônus simpático - o que poderia contribuir para o desencadeamento de doenças classicamente relacionadas com o excesso de gordura corporal(CORREIA et al., 2002).

Da mesma forma, outro estudo também demonstra a participação da leptina em alguns distúrbios fisiológicos. Animais submetidos à obesidade induzida pela dieta apresentam aumento da pressão sanguínea. Por outro lado, animais também obesos, mas deficientes de leptina ou do seu receptor não apresentam esta alteração. Além disso, a inibição da atividade de neurônios sensíveis a leptina no núcleo hipotalâmico dorsomedial, causa rápida redução da pressão arterial em camundongos obesos, independentemente da alteração do peso (SIMONDS et al., 2014).

Portanto, destaca-se a necessidade de investigar também as possíveis alterações fisiológicas que, em longo prazo, o aumento da sensibilidade à leptina pode causar, para, dessa forma, anteceder possíveis efeitos colaterais de fármacos com esta proposta e que levem em consideração somente seu efeito no controle de peso.

3 OBJETIVOS

O objetivo desta tesefoi analisar os efeitos do aumento da sensibilidade àleptina como uma possível estratégia terapêutica para o tratamento da obesidade ou na prevenção da recuperação de peso após período restrição alimentar.

3.1 Objetivos específicos

Buscamos no presente trabalho investigar, em camundongos machos, a influência da deleção de SOCS3 especificamente em células que expressam LepR ($SOCS3^{flox/flox}LepR^{Cre/Cre}$):

a) no ganho de peso e no consumo alimentar durante a obesidade induzida por dieta e após um período de restrição alimentar;
b) na homeostase glicêmica em animais submetidos à dieta com alto teor de lipídio e também durante a restrição alimentar severa;
c) na capacidade cardiovascular;
d) na taxa de mortalidade a longo prazo.

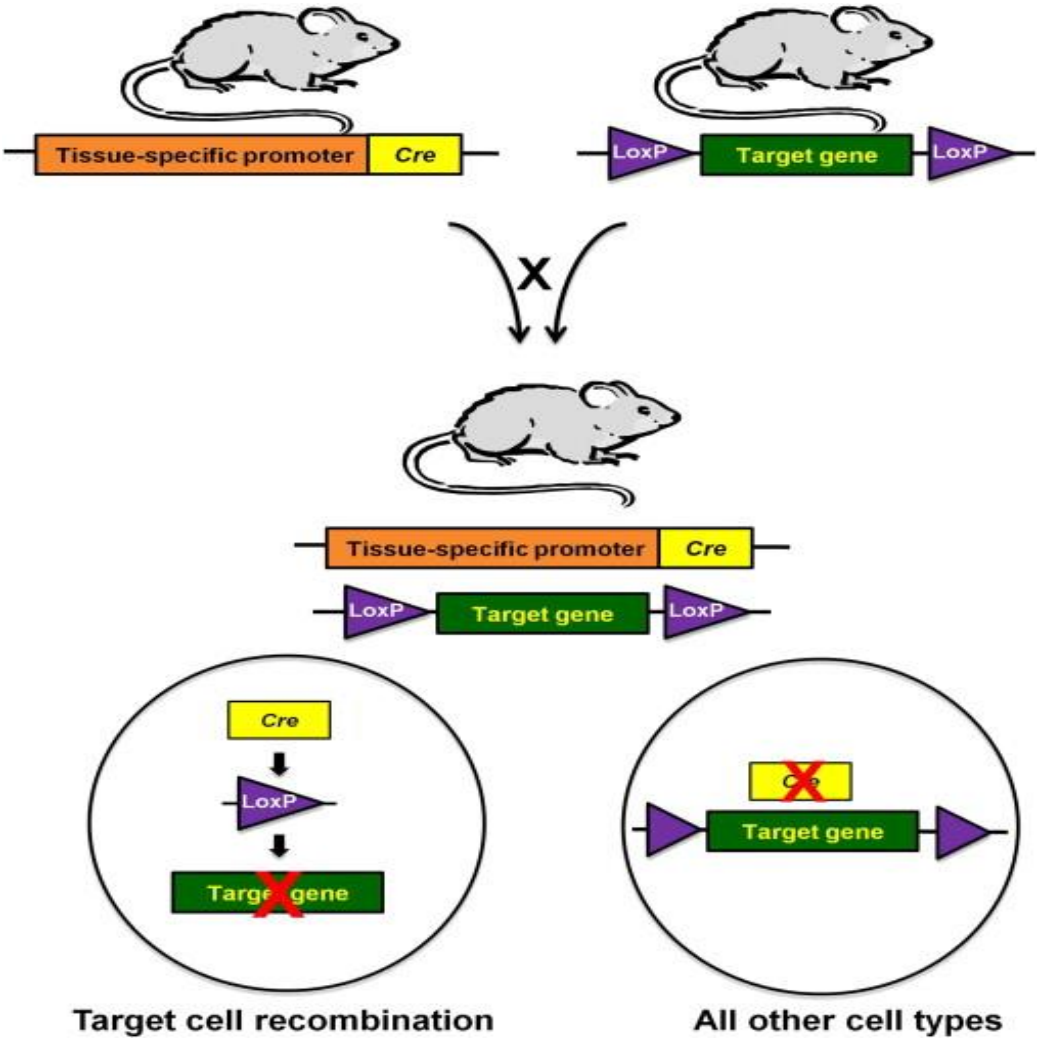
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção dos animais com deleção condicional do SOCS3

Para investigar o objetivo proposto, utilizamos animaisnocautescondicionais, ou seja, aqueles nos quais a deleção de uma proteína-alvo ocorre somente de maneiratecido-específica e não no organismo inteiro do animal. Esse método é considerado uma ferramenta poderosa para estudar funções específicas de genes em determinadas células ou regiões do organismo, sendo um avanço valioso em estudos nas áreas de fisiologia e neurociência.

Para a produção dos camundongos geneticamente modificados,foi utilizada a tecnologia Cre/LoxPque empregaa enzima conhecida como *Cre recombinase,* oriunda de bacteriófagos P1, capaz de reconhecer uma sequência de 34 nucleotídeos conhecida como LoxP. Ao reconhecer um par de LoxP na mesma orientação, a Cre remove permanentemente o fragmento de DNA que se encontra entre os LoxP. Assim, cria-se um animal cujo gene de interesse é flanqueado por sequências LoxP. Ao se cruzaresse animal com outro camundongo,no qual a expressão da enzima Cre é condicionada a promotores de interesse, pode-se criar mutantes cuja deleção da proteína de interesse ocorrerá somente naquelas células que expressam a enzima Cre (**FIGURA 1**). Nosso interesse foi estudar especificamente ascélulas que expressam o receptor de leptina. Portanto, usamos uma linhagem de camundongos geneticamente modificados, conhecidos como ObRb-IRES-Cre, cuja sequência que codifica a enzima Cre recombinase foi condicionada à expressão do gene *LepR*(DEFALCO et al., 2001; SCOTT et al., 2009). Para manipular o gene *SOCS3*, utilizamos outra linhagem de camundongos, conhecida como SOCS3-flox, que teve o exon 2 do gene *SOCS3*flanqueado por sítios loxP (B6;129S4-Socs3tm1Ayos/J, The Jackson Laboratories). No final, o cruzamento destas duas linhagens de camundongos produziu animais cujo gene *Socs3* é inativado apenas nas células que expressam o LepR ($SOCS3^{flox/flox}LepR^{Cre/Cre}$).

Figura 1 -Produção de animais transgênicos: Sistema Cre/LoxP.
Fonte: http://www.cell.com/cms/attachment/2007958474/2030597061/gr1.jpg



Foram realizados cruzamentos entre os animais heterozigotospara o alelo $SOCS3^{flox/+}$ e homozigotos para a mutação $LepR^{Cre/Cre}$. Com o resultado destes cruzamentos (25% $SOCS3^{+/+}LepR^{Cre/Cre}$; 25% $SOCS3^{flox/flox}LepR^{Cre/Cre}$; 50% $SOCS3^{flox/+}LepR^{Cre/Cre}$),obtivemos os animais controle ($SOCS3^{+/+}$) e nocaute($SOCS3^{flox/flox}$–aqui utilizaremos a nomenclatura LepR SOCS3 KO) oriundos das mesmas ninhadas –condição importante para a devida comparação entre os grupos experimentais.Os camundongos utilizados apresentam fundo genético C57BL/6.

No28º dia de vida, os animais foramdesmamados, identificados e deles foi coletadaamostra de epitélio caudal para genotipagem. O DNA foi extraído para

posterior reação em cadeia da polimerase (PCR). O protocolo de extração e amplificação de DNA foi realizado conforme manual do fabricante (Sigma-Extract-N-Amp^{TM} Tissue PCR kit, Cat N°. XNAT2), com primers específicos da região flanqueada do alelo SOCS3-flox (F-5'-CGGGCAGGGGAAGAGACTGT-3'; R-5'-GGAGCCAGCGTGGATCTGC-3').

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados somente animais machos, que foram mantidos em ambiente climatizado, a 22 ± 2°C com umidade relativa do ar de 55 ± 15%, com ciclo biológico de 12horas claro/12 horas escuro, com a luz acessa às 8 horas. Todos os experimentos já foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP (**ANEXO 1**).

4.2 Desenho experimental

Para alcançar os objetivos propostos pelo trabalho, foram desenvolvidos conjuntos de experimentos com diferentes desenhos experimentais que serão descritos a seguir.

4.3 Experimento 1: SOCS3 e prevenção da obesidade induzida pela dieta

Inicialmente, investigamos a ablação do gene SOCS3 em células que expressam o LepR, como uma alternativa terapêutica ***para a prevenção da obesidade induzida pela dieta***. Para tanto, foram utilizados 24 camundongos, da linhagem C57BL/6, controles (CON) e 20 *knockout*condicionais (LepR SOCS3 KO). Os animais de ambos os grupos foram submetidos à dieta hiperlipídica (HFD, 5,31 kcal/g, 58% calorias de gordura; PragSoluções, Brasil)durante 16 semanas. Neste período, a massa corporal foi mensurada semanalmente. A partir desta etapa, os animais foram individualizados durante uma semana e mensuramos a massa corporal, a ingestão alimentar e, por fim, realizamos o Teste de Tolerância àGlicose (GTT) e o Teste de Tolerância à Insulina (ITT).Ao final da 18ªsemana, os animais foram eutanasiados para a realização dasanálises bioquímicas descritas a seguir.

4.3.1 Teste de Tolerância à Glicose e Teste de Tolerância à Insulina

Nos animais submetidos à HFD, o GTT foi realizado na 18ª semana de experimento. Para tanto, no dia do teste, os animais permaneceram em jejum durante 4 horas. Após o período de jejum, os animais receberam glicose (D-glicose Anidra – Synth) subcutânea(1 g/kg diluído em salina 10%). Amostras de sangue caudal foram coletadas nos tempos 0 (basal, antes da administração de glicose), 20, 40, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose. A glicemia foi avaliada por glicosímetro portátil (One Touch® - Ultra™– *Johnson &Johnson Medical*), visando sua determinação para o cálculo da área sob a curva de glicose sérica.

Os animais também foram submetidos ao ITT ao final da 18ªsemana. Para isso, no dia do teste, os animais permaneceram em jejum durante 4 horas. Após período de jejum, os animais receberam insulina (NOVOLIN® insulina regular humana) subcutânea (2 UI/kg). Amostras de sangue caudal foram coletadas nos tempos 0 (basal, antes da administração de insulina), 20, 40, 60, 90 e 120 minutos após a administração de insulina. A glicemia foi avaliada por glicosímetro portátil (One Touch® - Ultra™– *Johnson &Johnson Medical*), visando a determinação da glicemia para o cálculo da área sob a curva relativa ao momento inicial (tempo 0).

4.3.1.1 Eutanásia e coleta de tecidos

Ao final da 18ªsemana de experimento, os animais foram eutanasiados por decapitação, após período de 4 horas de jejum. Dessa forma, a retirada da ração aconteceu entre 8 e 10horas da manhã (início do período claro), enquanto a eutanásia foi realizada entre 12 e 14horas. Assim, 10 camundongos de cada grupo foram eutanasiados e o hipotálamo foi coletado para análise de expressão gênica (qPCR) dos seguintes transcritos:NPY, AgRP, MCH, orexina, PTP1B, PTPN2, PTPRe, SH2B1POMC, PTPN11. Os hipotálamos foram rapidamente coletados e armazenados (-80 ºC), para posterior extração de RNA total, transcrição reversa e análise de expressão gênica por PCR em tempo-real. Para dissecar o hipotálamo, foram definidos os seguintes limites: rostro-caudal, 1 mm anterior ao quiasma óptico

e imediatamente posterior aos corpos mamilares; latero-lateral, definida pelo trato óptico; e superior, o limite dorsal do terceiro ventrículo.

O sangue foi coletado, centrifugado a 22 ºC, 4.000 RPM, 10 minutos; foram separadas as respectivas porções séricas, o soro foi devidamente armazenado, em microtubos, em freezer (-80 ºC) para análises, pelo método de ELISA, de insulina (Crystal Chem), glucagon (Sigma) e leptina (Crystal Chem), conforme informação dos fabricantes dos kits.

Após a eutanásia, os depósitos de gordura perigonadal, subcutâneo e retroperitoneal foram retirados e pesados para determinação da adiposidade.

Nos animais restantes, foram injetados5 UI/kg de insulina ou salina e estes forameutanasiados após 15 minutos. O fígado e o músculo foram coletados para análise do estado fosforilado de proteínas (Western Blot) envolvidas na sinalização da insulina (pAKT e pIR).

4.3.2 Experimento 2: SOCS3 e hiperfagia alimentar após período de restrição calórica

O segundo experimento foi desenvolvido com o propósito de investigar a ablação do gene SOCS3 na **prevenção da recuperação de peso após período restrição alimentar**.Para isso, camundongosCON(n = 23) e LepRSOCS3 KO (n = 18) foram utilizados.Os animais foram previamente alocados em gaiola individual e, durante uma semana, foram adaptados à ração padrão para roedores (2,99 kcal/g; 9,4% calorias de gordura; Quimtia, Brasil), às condições da sala e à manipulação. Depois disso, forammonitoradas a ingestão alimentar e a evolução da massa corporal por 5 dias consecutivos. Os valores obtidos neste período foram considerados como basais. Em seguida, os animais foram submetidos a 48 horas de jejum e, depois disso, voltaram a receber ração *ad libitum,* sendo acompanhados por 7 dias consecutivos de recuperação alimentar. O consumo e a massa corporal foram monitorados diariamente. Nos demais dias, ambas variáveis forammonitoradas diariamente (1 hora após o início do período claro do dia; ciclo 12 horas claro/12 horas escuro). Além disso, na perspectiva de analisar variações glicêmicas desses animais, realizamos a coleta de sangue através de um pequeno corte na cauda, no

quinto dia do período basal (pré-jejum), após 24 e 48 horas de jejum. A glicemia foi mensurada através de um glicosímetro (modelo, Johnson & Johnson).

Com base nos resultados do experimento citado acima, uma nova etapa, com outro grupo de animais, foi desenvolvida com o objetivo de investigar os mecanismos moleculares que controlam esse comportamento alimentar. Para o desenvolvimento dessa etapa, 48 animais controle e 48 animais LepRSOCS3 KO foram utilizados. Dessa forma,baseado no mesmo desenho experimental citado previamente,8 animais de cada grupo forameutanasiados nos respectivos tempos: ao final do período basal de consumo *ad libitum* (BASE), após 48 horas de jejum (JEJUM) e no final do primeiro (REC1), do terceiro (REC3), do quinto (REC5) e do sétimo (REC7) dias de recuperação alimentar.

4.3.2.1 Teste de Tolerância ao Piruvato

Diversos trabalhos têm utilizado o Teste de Tolerância ao Piruvato(TTP) com o objetivo de investigar a capacidade de produção hepática de glicose (CLEMENTI et al., 2011; RODGERS;PUIGSERVER, 2007). Portanto, para analisar a capacidade gliconeogênica nas situações *alimentado* e *durante a restrição alimentar*, realizamos o TTP nos animais nos momentos:*baseline*, 24 e 48 horas em jejum. Inicialmente foicoletadauma amostra de sangue através da veia caudal, para mensuração da glicemia no tempo 0. A seguir, os animais receberam, via intraperitoneal, uma injeção de piruvato de sódio (Synth) (2g/kg) dissolvido em salina estéril. A partir disso, a glicose sanguínea foi mensurada nos tempos 20, 40, 60, 90 e 120 minutos.

Além disso, afim de investigar os mecanismos que controlam a homeostase glicêmica, repetimos o teste em conjunto com a administração de drogas que bloqueiam os sistemasnervosos simpático e parassimpático. Dessa forma, para o bloqueio do sistema nervoso parassimpático, o TTP foi realizado paralelamente à administração de 3mg/kg de atropina (Sigma), potente antagonista muscarínico, ao passo que, para o bloqueio do sistema nervoso simpático, foram administrados fentolamina (Sigma) (3mg/kg), bloqueador alfa-adrenérgico, juntamente com propranolol (Sigma), (0,5mg/kg), bloqueador beta-adrenérgico. Cabe ressaltar que o TTP com a administração das drogas também ocorreu nos momentos:*baseline*, 24 e 48 horas em jejum.

No TTP realizado no momento *baseline*, a ração foi retirada no início do ciclo claro (8horas) e o teste foi realizado às 12horas, portanto, após 4 horas de jejum. Para os tempos 24 e 48 horas em jejum, o TTP foi realizado aproximadamente às 9horas.

4.3.2.2 Teste de Esforço Máximo

A capacidade cardiovascular dos animais foi verificada através do teste de esforço máximo em esteira (TEM). A literatura científica aponta que a mensuração do consumo máximo de oxigênio (VO2max) é a principal maneira de avaliar a capacidade cardiovascular. Adicionalmente, alguns autores demonstram que o TEM apresenta forte correlação com o VO_2máximo, podendo ser utilizado, portanto, para prescrição do treinamento bem como para a análise da aptidão cardiovascular dos animais (RODRIGUES et al., 2007). Para tanto, 10 animais de cada grupo foram adaptados em uma esteira para camundongos durante 3 dias consecutivos por 10 minutos à velocidade a 10m/min. No dia seguinte após o período de adaptação aconteceu o TEM, que foi iniciado em uma velocidade de 10m/min durante 5 minutos e, a partir deste tempo, a velocidade era aumentada em 3m/min a cada 1 minuto até a exaustão dos animais. A exaustão foi definida quando o animal não tinha mais a capacidade de correr na mesma intensidade da esteira(HONG et al., 2016).

4.3.2.3 Acompanhamento dos animais até o envelhecimento

Para analisar o efeito em longo prazo que o aumento da sensibilidade à leptina poderia ocasionar nos camundongos, nós acompanhamos por 16 semanas a taxa de mortalidade de animais do grupo controle (n=27) e LepR SOCS3 KO (n= 23). Dessa maneira, após o desmame, os animais foram mantidos em caixa coletiva (até 5 animais por caixa) com água e ração ad libitum. Três vezes por semana, os animais eram observados para verificação de óbito. Após este período, com os dados coletados, foi feito um gráfico para mensurar o percentual de sobreviventes.

4.3.2.4 Eutanásia e coleta dos tecidos

Os animais foram eutanasiados por decapitação, após período de 4 horas de jejum, exceto para aqueles que foram eutanasiados no tempo JEJUM. Dessa forma, a retirada da ração aconteceu entre 8 e 10horas da manhã (início do período claro), enquanto a eutanásia foi realizada entre 12 e 14horas. Para os animais do tempo JEJUM, o horário da eutanásia foi às 8horas, logo em seguida ao início do período claro.

Os hipotálamos foram rapidamente coletados e armazenados (-80 ºC), para posterior extração de RNA total, transcrição reversa e análise de expressão gênica por PCR em tempo-real. Cabe ressaltar que os limites para a dissecação do hipotálamo foram os mesmosdescritos anteriormente. Foi determinadaa expressão dos seguintes transcritos no hipotálamo: NPY, AgRP, orexina, POMC SOCS3, PTP1B PTPN2, PTPRe SH2B1.

O sangue foi coletado, centrifugado a 22 ºC, 4.000 RPM, 10 minutos; foram separadas as respectivas porções séricas;o soro foi devidamente armazenado, em microtubos, em freezer (-80 ºC) para análises, pelo método de ELISA, de leptina (Crystal Chem), conforme informação do fabricante.

Especificamente nos animais eutanasiados nos momentos*baseline*(BASE) e JEJUM,analisamos a concentração sérica de insulina, glucagon, corticosterona e hormônio do crescimento, através do método de ELISA, conforme a informação do fabricante.

4.4 Validação da deleção condicional do SOCS3

Para garantirmos que a inativação do gene SOCS3 de fato ocorreu nos animais utilizados em nossos experimentos, procedemos com análise molecular para avaliar a capacidade da leptina em estimular o aumento da expressão gênica de SOCS3 hipotalâmico. Dessa forma, após 4 horas de jejum, animais CON eLepRSOCS3 KO foram subdivididos em dois grupos; o primeiro recebeu injeção s.c. de leptina (2,5 µg/g), enquanto o segundo serviu como controle do experimento, recebendo injeção s.c. da mesma solução utilizada para diluição da leptina (PBS). Após três horas da

administração deleptina ou PBS, procedeu-se a eutanásia (decapitação), para rápida coleta do hipotálamo e análise de expressão gênica do SOCS3.

Também, como forma de avaliação, verificamos a sensibilidade crônica à leptina em animais submetidos à HFD. Para tanto, foi implantada em cada animal, subcutaneamente, uma microbomba de infusão (Micro – Osmotic Pump Model – 1002 - Alzet) preenchidacom leptina[1] recombinante de camundongo, com taxa de infusão de 0,5 µg/h. Nós avaliamos o consumo alimentar e o ganho de peso durante 5 dias antes da cirurgia da microbomba (período basal), bem como 14 dias após a cirurgia. Cada animal foi utilizado como próprio controle entre a comparação dos valores pré- e pós-operatórios. Cabe ressaltar, ainda como forma de validação, que analisamos e comparamos a expressão hipotalâmica do gene SOCS3 nos animais CON e LepRSOCS3 KO submetidos à dieta padrão e HFD.

4.5 Western Blot

4.5.1 Extração de proteínas

Após eutanásia, o fígado e o músculo foram rapidamente coletados e imediatamente homogeneizados em 250µl de tampão RIPA (Sigma) contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (1:100, Sigma). Foi realizada centrifugação (14.000 RPM, 4°C por 20 minutos) para coleta do material sobrenadante. Para determinação da concentração de proteínas totais, foi utilizado kit comercialmente disponível (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific).

4.5.2 Eletroforese e transferência

As amostras (50µg de proteína total) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Protein Gel Solutions). Finalmente, foi realizada transferência para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad,

[1]A leptina foi adquirida do Dr. A.F. Parlow - National Hormone and Peptide Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney, Torrance, CA, EUA.

#162-0115). As membranas passaram por bloqueio em 5% de albumina sérica bovina (BSA) e foram incubadas *overnight*a 4°C, em anticorpos primários específicos (1:1000): pIR-tyr1162/1163 (Santa Cruz); pAKT-Ser473 (Cell Signaling) e GAPDH (Santa Cruz). Posteriormente, as membranas foram incubadas por 45 minutos em anticorpo secundário (1:10000, IRDye 800CW, Li-COR 926-32211). As proteínas foram detectadas e analisadas utilizando o equipamento Li-COR Odyssey system (Li-COR). A normalização foi feita pelo GAPDH.

4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

4.6.1 Extração de RNA total

Todas as amostras coletadas tiveram RNA total extraído utilizando o protocolo do TRIzol® Reagent e seguindo o manual do fabricante. As amostras foram retiradas do freezer -80 °C somente no momento da extração – sendo sempre mantidas em gelo. A homogeneização das amostras foi realizada utilizando-se 1 mL de TRIzol® Reagent com auxílio de homogeneizador de tecidos (Polytron). A mistura resultante foi incubada por 5 min à temperatura ambiente e, a seguir,foram acrescidos 0,2 mL de clorofórmio (CHCl3) para desproteinização (fase de separação). O sobrenadante foi separado por centrifugação (12.000 rpm, 15 min, 4 ºC) e o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com isopropanol (fase de precipitação), lavado com etanol 75% por duas vezes (fase de lavagem) e dissolvido com H_2O DEPC (fase de diluição). O RNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek®) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

4.6.2 Transcrição reversa

Inicialmente, amostras de 2 µg de cada RNA total foram tratadas com DNase I, RNase free (Roche, #776785). O uso da DNase teve por objetivo eliminar qualquer contaminação que as amostras pudessem ter com DNA genômico. Para essa etapa, foram acrescidos o volume predeterminado pela biofotometria de RNA total (até 2 µg

de RNA total), 0,32 µL de DNase I previamente diluída (2µL de DNase, 1µL de tampão e 7 µL de H2O DEPC), 3,36 µL de $MgCl_2$ (Roche, #1699113) e foi completado com H2O DEPC até o volume final de 20 µL. Esta solução foi incubada em um termociclador a 37 ºC, por 30 min; a 75 ºC, por 10 min.

As amostras então foram submetidas à reação de transcrição reversa. Foram acrescidos à solução anterior: 20 µL de H2O DEPC, 10 µL de DTT (0,1M), 10 µL de primers randômicos (146 ng – pdN6 Roche, #1034731), 20 µL de dNTPmix (desoxirribonucleotídeos trifosfatados –Sinapse inc #P9013, 1 µL da enzima transcriptase reversa (SuperScript II RTase, Invitrogen™) e 20 µL do tampão da enzima. Estes primers randômicos são, na maioria das vezes,hexâmeros de oligodesoxirribonucleotídeos que se combinam à fita simples de RNA para que a enzima transcriptase reversa reconheça um sítio de início de transcrição. Os desoxirribonucleotídeos fosfatados dNTPs são os quatro nucleotídeos do DNA (Adenina, Citosina, Guanina e Timina). Novamente, a solução foi levada ao termociclador: 25 ºC, por 10 min; 42 ºC, por 50 min; 72 ºC, por 10 min; 4 ºC. Terminada a reação, as amostras foram devidamente armazenadas a -20 °C.

4.6.3 Expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão do RNAm foi determinadamediante PCR quantitativo em tempo real. A técnica de PCR em tempo real é sensível e permite a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e a detecção em cada ciclo. Para tal, foi utilizada a técnica de coloração “SYBR Green”, que segue o princípio Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), que emite sinal de fluorescência quando ligadas ao DNA dupla fita, utilizando o Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®). Além do SYBR Green, foi utilizada a tecnologia TaqMan (TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems®), que permite maior especificidade da reação utilizando o mesmo princípio de FRET, porém o sinal de fluorescência é emitido quando a sonda específica do gene estudado é hidrolisada. Para cada reação, foram padronizados os volumes dos reagentes conforme o manual do fabricante. Para TaqMan: 6,25µL MasterMix; 0,35µL primer; 4,4µL H2O DEPC; 1,5µL amostras. Para SYBR: 6,25µL MasterMix; 1,5µL primer; 3,25µL H2O DEPC; 1,5µL amostras.

Em todas as reações, foram realizadas desnaturações iniciais a 95 °C por 5 min, seguidas dos ciclos de desnaturação (95 °C, 30 s), anelamento (60 °C, 30 s) e extensão (72 °C, 30 s); e, quando utilizado SBR Green, seguindo para a curva de dissociação (95ºC por 15 segundos e 60 ºC por 1 minuto). As reações foram realizadas em equipamento próprio para PCR em tempo real (7500TM Real-Time PCR System, Applied Biosystems®). A quantificação de expressão gênica foi realizada por $2^{\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os dados foram normalizados pela expressão do gene da beta-actina.

4.7 Análise estatística

Inicialmente, analisamos a normalidade e a homogeneidade das variâncias dos dados. As diferenças entre os dados foram comparadas usando o teste t-Student não pareado. Os dados de sensibilidade à insulina e à leptina foram analisados pelo teste ANOVA *two-way*; em seguida, foi utilizado o teste post hoc de Bonferroni, para identificação dos contrastes significantes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software*GraphPad Prism. Os resultados são expressos como média eerro padrão médio. Foi considerado o valor para $p < 0,05$ como sendo estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

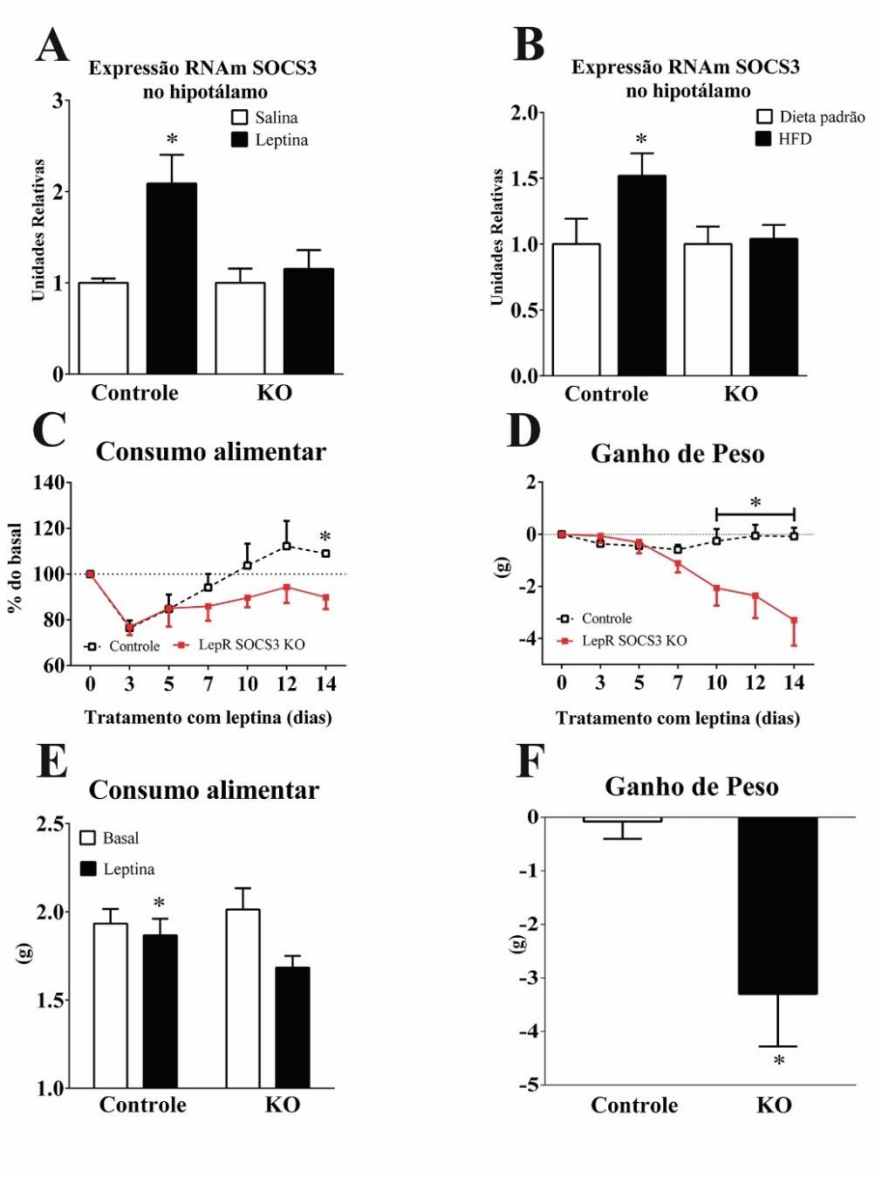
5.1 Validação dos animais com deleção do SOCS3 condicionada às células que contêm o receptor de leptina

Para comprovar que a deleção condicional ocorreu nos animais experimentais, inicialmente, avaliamos a expressãogênica de SOCS3 após a administração aguda de leptina (**FIGURA2A**).Aadministração aguda de leptina aumentoua expressão do SOCS3 dos animaisCON. Além disso, podemos observar que a administração de leptina nos animais CON praticamente dobrou a expressão do SOCS3 quando comparada com a administração de salina(**FIGURA 2A**). Contudo, ao analisarmos o grupo dos animais LepR SOCS3 KO, tal aumento não aconteceu. Nesse sentido, a expressão gênica SOCS3, nos animais LepR SOCS3 KO, foi similar em ambas situações (salina e leptina). Esses resultados indicam que a tecnologia Cre/loxP utilizada neste experimento foi eficaz para abolir a expressão de SOCS3 em células responsivas à leptina, visto que a leptina foi incapaz de induzir a expressão desse gene nos animais LepR SOCS3 KO.

Em seguida, comparamos a expressão gênica de SOCS3 entre os animais de ambos os grupos submetidos à dieta padrão e à HFDdurante 14 semanas(**FIGURA 2B**). Constatamos que a HFD promoveu aumento da expressão do RNAm de SOCS3 no grupo CON. No entanto, a HFD não foi capaz de alterar a expressão deste gene no grupo LepRSOCS3 KO. Na sequência, a partir dos nossos resultados prévios, comprovando a deleção do gene SOCS3 em células responsivas à leptina, foi possível especular que os animais LepR SOCS3 KO devem ser mais sensíveis aos efeitos da leptina sobre o comportamento alimentar, até mesmo em situações que promovam a resistência à ação deste hormônio, como na obesidade induzida pela dieta. Dessa forma, testamos a sensibilidade à leptina por meio de sua administração crônica em animais submetidos à HFD. Observamos que, após a cirurgia para implante da microbomba de infusão osmótica, ambos os grupos reduziram o consumo alimentar; no entanto, com o passar dos dias, o grupo controle aumentou o consumo de ração, para quantidades superiores àquelas consumidas no basal. Contudo, o grupo LepRSOCS3 KO apresentou sustentada redução no consumo alimentar durante todo o tratamento crônico de leptina (**FIGURA 2C e E**). Consequentemente, ao ser analisado o ganho de peso neste período, a leptina não

teve efeito na massa corporal nos animais do grupo CON.No entanto, o grupo LepRSOCS3 KO mostrou persistente redução de peso durante a administração de leptina(**FIGURA 2D e F**). Esses dados, em conjunto, reforçam a ideia da eficácia da deleção condicional do gene SOCS3 nos animais e, consequentemente, no papel do SOCS3 como modulador daação da leptina.

Figura 2-Expressão de SOCS3 no hipotálamo de animais submetidos à administração de salina ou leptina (A) e após o consumo crônico de dieta padrão ou HFD (B). Consumo alimentar (C e E) e ganho de peso (D e F) após a administração crônica da leptina (*P < 0,05 CON vs. KO)

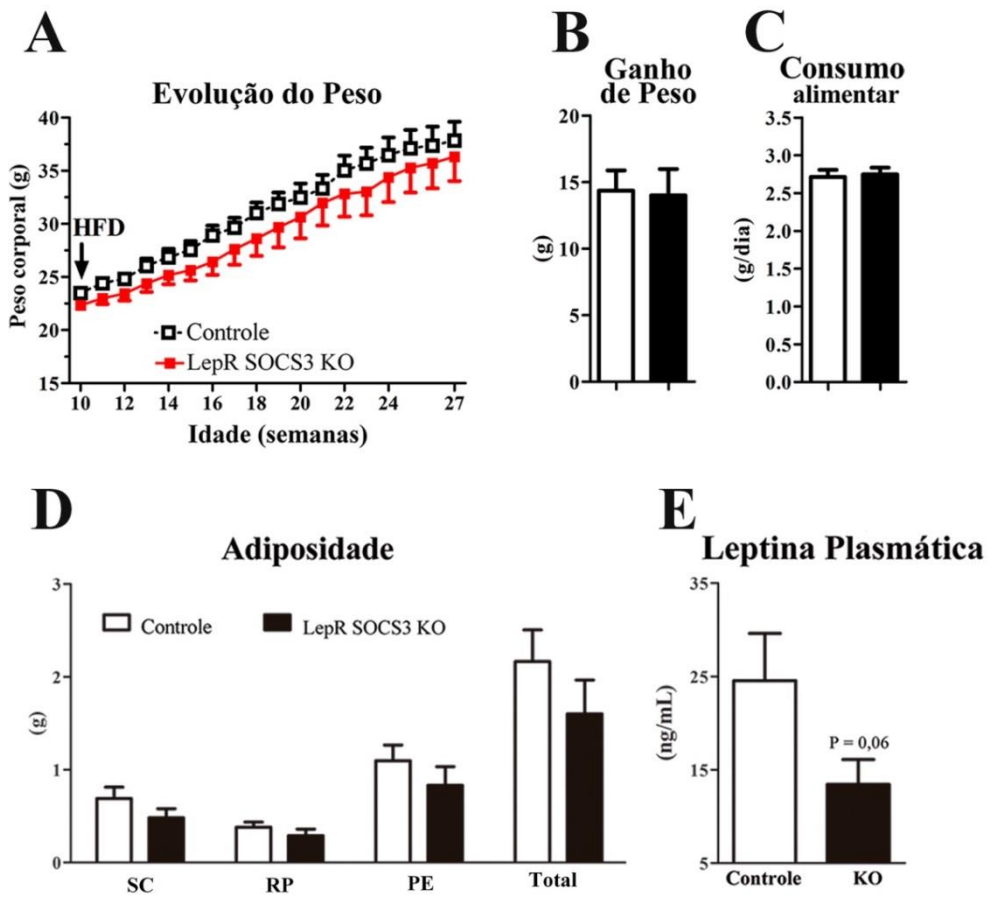


5.2 Inativação do SOCS3 em células que expressam LepR não previne a obesidade induzida pela HFD

Para observar se a inativação do SOCS3 em células LepRfoicapaz de prevenir a obesidade induzida pela dieta, 24 animais CON e 20LepR SOCS3 KOreceberam HFD durante 18 semanas. Observamos que, após o início do tratamento com HFD, camundongos de ambos os grupos aumentaram a massa corporal progressivamente, mas sem diferença estatística (**FIGURA 3A**). Com isso, o ganho de peso ao final do experimento também foi similar entre os animais CON e LepRSOCS3 KO (**FIGURA 3B**). Da mesma forma, a média diária do consumo alimentar foi semelhante entre os grupos (**FIGURA 3C**).

Após a eutanásia dos animais, coletamos e pesamos os tecidos adiposos subcutâneo (SC), retroperiotenal (RP) e periepididimal (PE) para verificar se a deleção do gene SOCS3 em células responsivas à leptina foi capaz de atenuar a adiposidade dos animais LepR SOCS3 KO. Similarmente aos resultados anteriores, não houve diferença na massa adiposa entre os grupos CON e LepR KO SOCS3 (**FIGURA 3D**). Adicionalmente, observamos tendência de redução na concentração sérica de leptina no grupo LepRSOCS3 KO; contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,06$) (**FIGURA 3E**). Esses dados em conjunto nos mostram que,apesar de os animais LepR SOCS3 KO apresentarem sensibilidade à ação da leptina exógena, demonstrada em nossos resultados anteriores, a deleção de SOCS3 em células LepR não foi suficiente para reduzir o consumo alimentar, atenuar o ganho de peso e, assim, prevenir a obesidade induzida pela dieta.

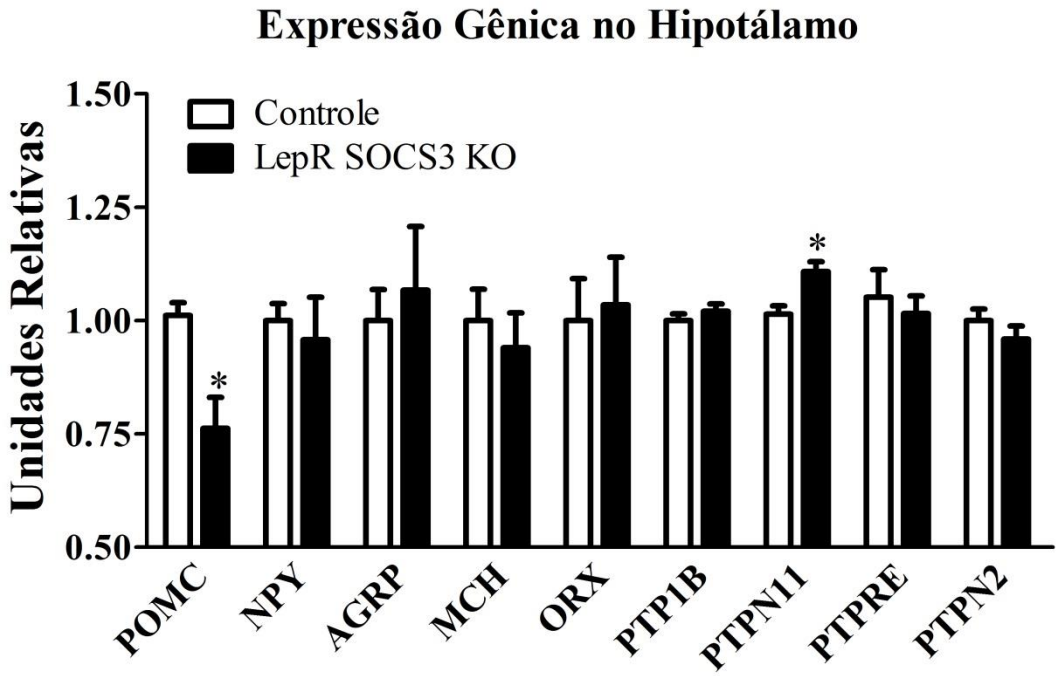
Figura 3 -Ganho de peso (A e B), consumo alimentar (C), adiposidade (D) e concentração de leptina sérica (E) dos animais submetidos à dieta HFD. ***(*P < 0,05 CON vs. KO)***



5.3 Expressão gênica hipotalâmica dos animais CON eLepRSOCS3 KO submetidos à HFD

A seguir, analisamos a expressão de genes no hipotálamo relacionados à resistência à leptina e ao controle do balanço energético. Não houve diferença entre os grupos na expressão gênica de NPY, AgRP, MCH, orexina, PTP1B, PTPN2, PTPRe, SH2B1. No entanto, os animais LepRSOCS3KO apresentaram menor expressão de POMC, acompanhado pelo aumento da expressão de PTPN11 (**FIGURA 4**).

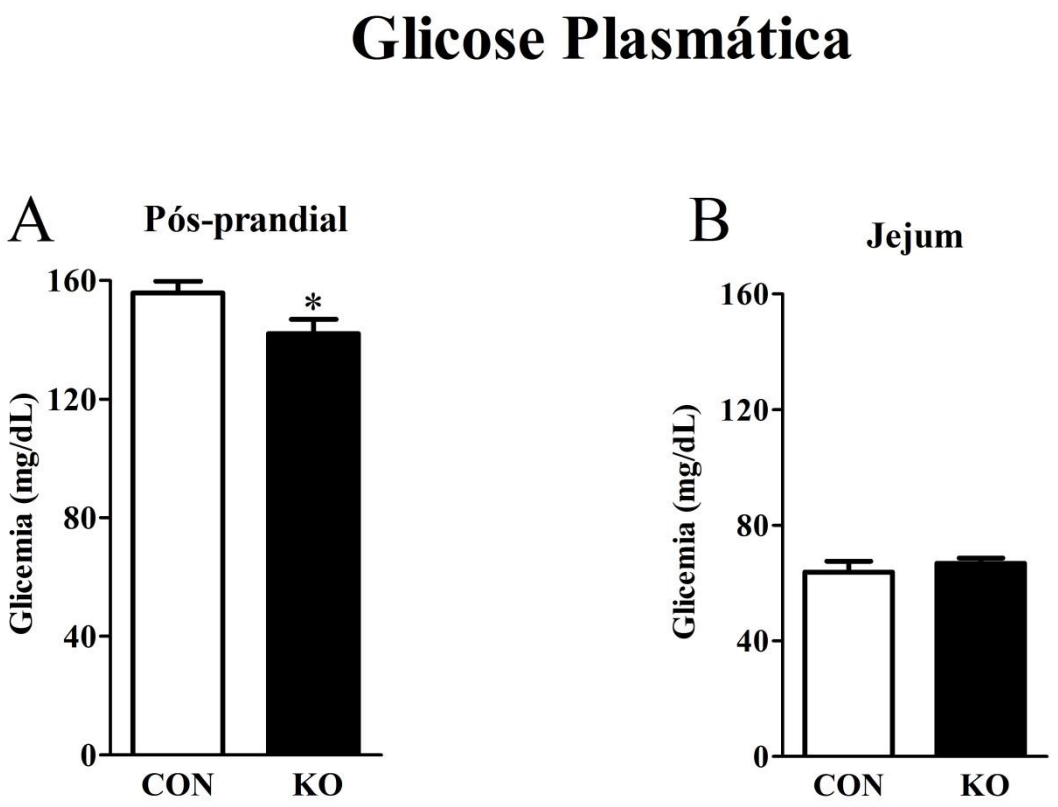
Figura 4 -Expressão gênica hipotalâmica dos animais CON e LepR SOCS3 KO submetidos a 18 semanas de HFD ***(*P < 0,05 CON vs. KO)***



5.4 Inativação do SOCS3 em células que expressam LepR previne a resistência à insulina em camundongos submetidos à HFD

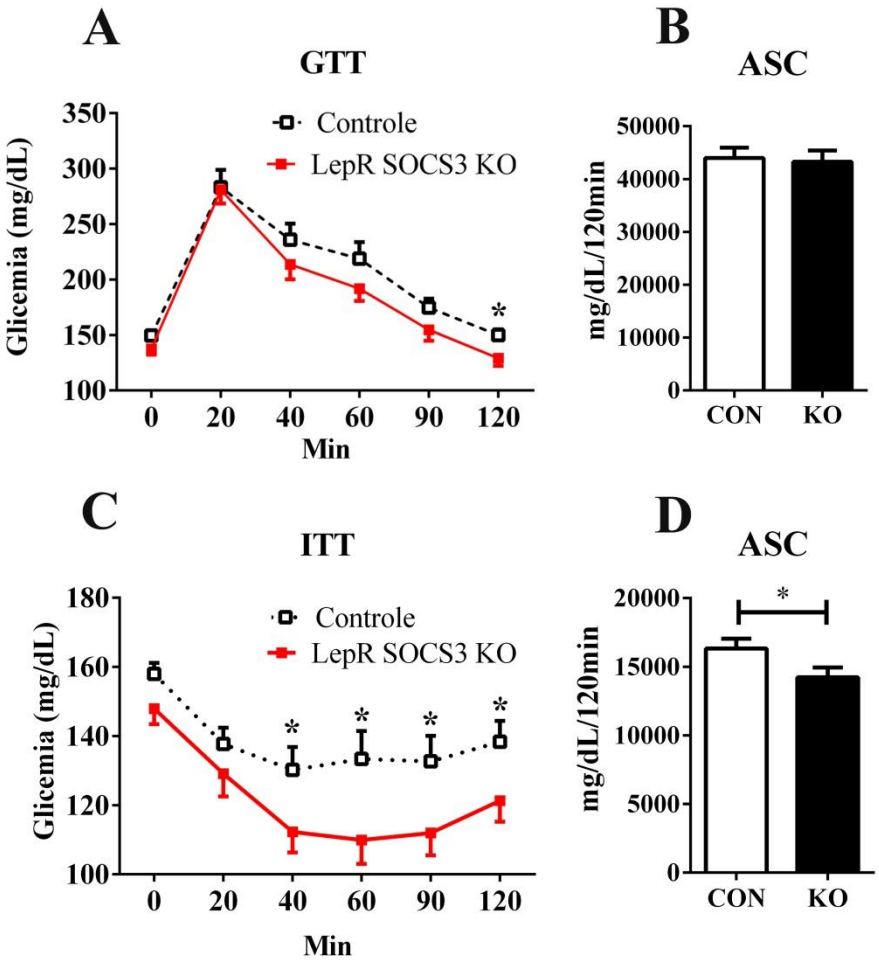
Para verificar se animais tratados com HFD apresentavam resistência à insulina, mensuramos inicialmente a glicemia dos camundongos. Verificamos que o grupo SOCS3LepR KO apresentou menor concentração de glicose no sangue no momento pós-prandial, comparado com o grupo CON. No entanto, essa diferença não foi observada na glicemia após período de jejum de 12 horas (**FIGURA 5**).

Figura 5 -Concentração plasmática de glicose dos animais CON e LepR SOCS3 KO submetidos a 18 semanas de HFD nos períodos pós-prandial e jejum ***(*P < 0,05 CON vs. KO)***



Posteriormente, realizamos os testes de ITT e GTT para verificar, respectivamente, a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose*in vivo*. Observamos diferença estatística no GTT somente no último ponto(**FIGURA 6A e B**). No entanto, quando foi administrada insulina, o caimento da glicose sanguínea foi mais pronunciado no grupo LepR SOCS3 KO, a partir do ponto 40 min, também sendo observada diferença estatística na área sob a curva (ASC) do ITT (**FIGURA 6C e D**).

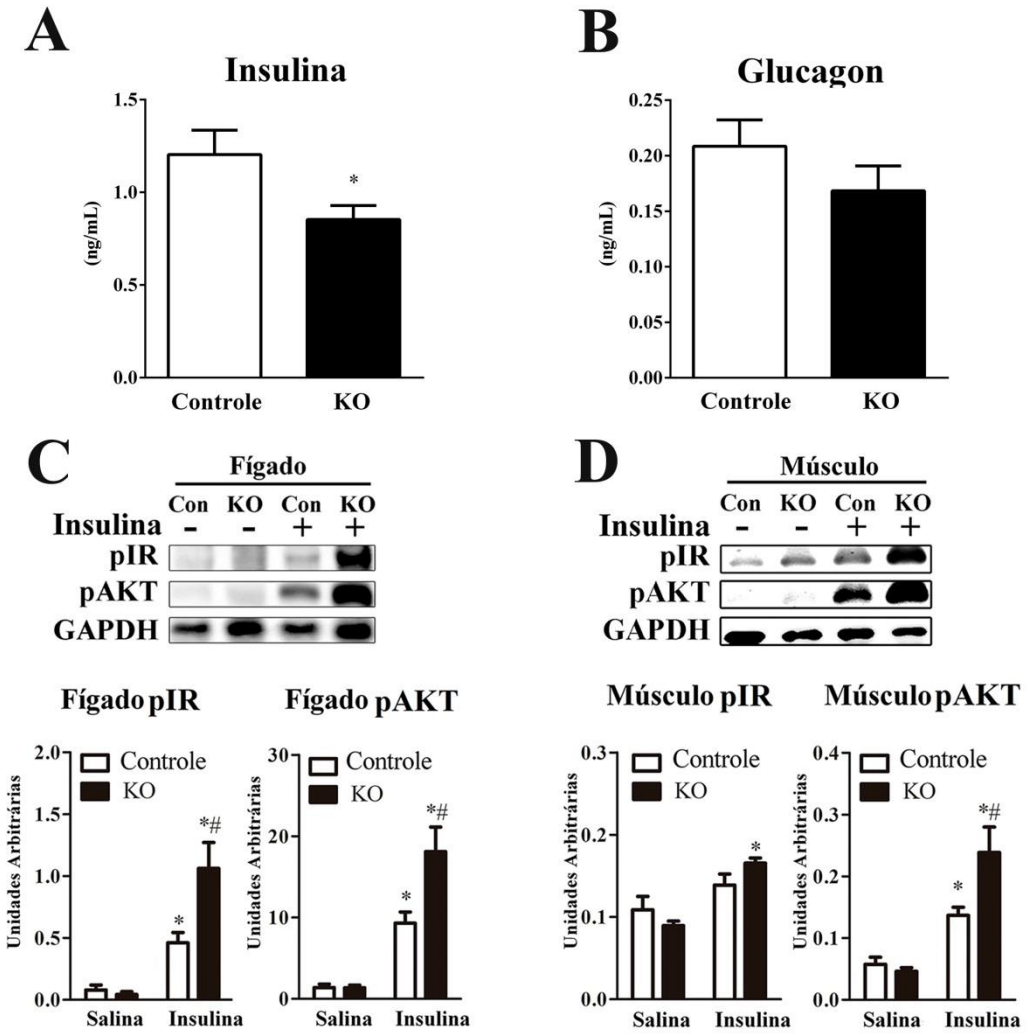
Figura 6-Concentração plasmática de glicose dos animais CON e LepR SOCS3 KO submetidos a 18 semanas de HFD submetidos ao GTT e ao ITT e as respectivas áreas sob a curva (ASC) ***(*P < 0,05 CON vs KO)***



Após a eutanásia, analisamos a concentração de insulina e glucagonno sangue (**FIGURA 7A e B**). Apesar de a concentração de glucagon ter sido similar entre os grupos, os animais LepR SOCS3 KO apresentaram menor concentração de insulina comparado com o grupo CON.Depois, analisamos as proteínas moleculares envolvidas na sinalização da insulina, por meio da determinação da fosforilação do receptor de insulina (pIR) e da AKT (pAKT), no músculo esquelético e no fígado, após a administração aguda de salina e insulina (**FIGURA 7C e D**). Observamos que a insulina foi capaz de aumentar a fosforilação dessas proteínas quando comparada com a administração de salina, em ambos os grupos e tecidos. No entanto, a resposta foi maior no grupo LepRSOCS3KO, comparado com o grupo CON. Baseado em todos esses

resultados, é possível sugerir que a deleção de SOCS3 em células LepR aumenta a sensibilidade à insulina em animais tratados com HFD.

Figura 7 -Concentração sérica de insulina (A) e glucagon (B) dosanimais CON e LepR SOCS3 KO submetidos a 18 semanas de HFD. Expressão de proteínas pIR e pAKT no fígado (C) e no músculo (D) após o tratamento agudo de salina ou insulina ***(*P < 0,05 salina vs leptina #P < 0,05 CON vs KO)***



5.5 Inativação de SOCS3 em células que expressam LepR previne a hiperfagia e o reganho de peso após período de restrição alimentar

Após verificarmos que a inativação do SOCS3 não preveniu a obesidade induzida pela dieta, mas melhorou a sensibilidade à insulina de animais submetidos à HFD, estudamos a participação do SOCS3 no controle da hiperfagia e no ganho de peso após período de restrição alimentar.

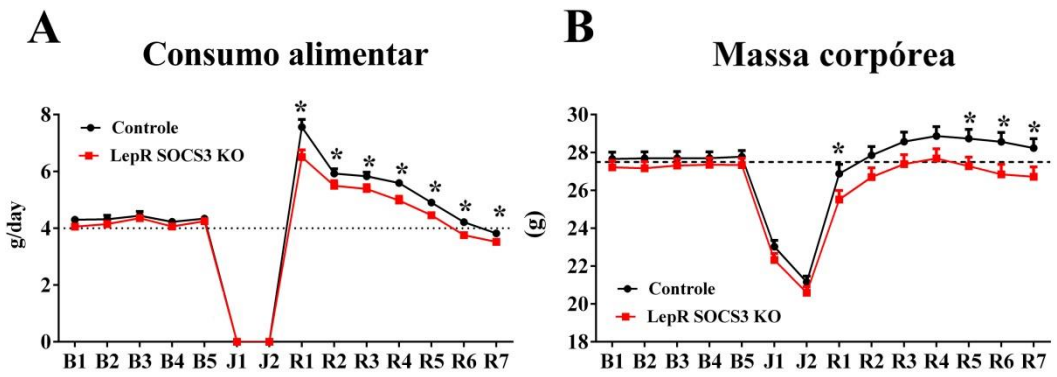
Embora a restrição àingestão energética seja uma das principais alternativas utilizadas para a perda de peso, a maioria das pessoas recupera o peso perdido após o término dessa intervenção (MANNet al., 2007).Dessa forma, acredita-se que o período posterior àrestrição alimentar sejamarcado pela dificuldade em controlar o consumo alimentar.Assim, tínhamos como hipótese inicial que este período de recuperação poderia ser marcado por resistência àação da leptina, similarmente como acontece na obesidade. Dessa forma, acreditávamos que o aumento da sensibilidade àleptina, por inativação do SOCS3 em células responsivas àleptina, poderia prevenir o reganho de peso após período de restrição alimentar.

Nesse sentido, acompanhamos camundongos dos gruposCON(n = 18) e LepRSOCS3 KO (n = 23)por 5 dias no período basal, seguido de um período de jejum de 48 horas.Após esse período, a ração foi fornecida de forma *ad libitum*e acompanhamos o consumo alimentardurante 7 dias de recuperação nutricional.

Observamos que, no basal, o consumo alimentar (CON: 4,3g ± 0,07g; KO: 4,1g ± 0,1g) bem como a massa corporal (CON: 27,7g ± 0,04g; KO 27,2g ± 0,08g) foram similares entre os animais (**FIGURAS 8A e B**). Quando foi cessada a oferta da ração, os camundongos perderam peso drasticamente e de maneira equivalente entre os grupos. Observamos que, após 48 de jejum, os animais perderam aproximadamente 25% do seu peso em relação ao basal (CON: 21,15±2g; KO: 20,6g ± 1,7g). Na sequência, o período de recuperação foi marcado por substancial aumento no consumo alimentar. Ambos os grupos apresentaram pico no consumo de ração logo no primeiro dia de recuperação, sendo gradativamente reduzido até chegar aos valores próximos ao basal no sexto dia de recuperação. Notavelmente, o consumo de ração foi significativamente menor no grupo LepR SOCS3 KO, em todos os dias de recuperação, comparado com os animais do grupo CON. Este fato contribuiu para menor ganhode peso por parte dos animais*nocautes* condicionais. A massa corporal foi estatisticamente maior no grupo CON no primeiro, quinto, sexto e

sétimo dias de recuperação. Interessantemente, no quarto dia de recuperação, o grupo LepR SOCS3 KO atingiu os valores basais e manteve-se nesse faixa até o final da recuperação; já o grupo CON teve reganho de peso superior à linha média do basal, a partir do segundo dia de recuperação, e o manteve aumentado durante todo o período. Confirmando nossa hipótese inicial, a inativação do SOCS3 em células que expressam o receptor de leptina foi capaz de modular o consumo alimentar e o reganho de massa corporal após período de restrição alimentar.

Figura 8 -Consumo alimentar (A) e massa corporal (B) dos animais CON e LEpR SOCS3 KO submetidos a 48 horas de jejum seguido de realimentação ***(*P < 0,05 CON vs KO)***

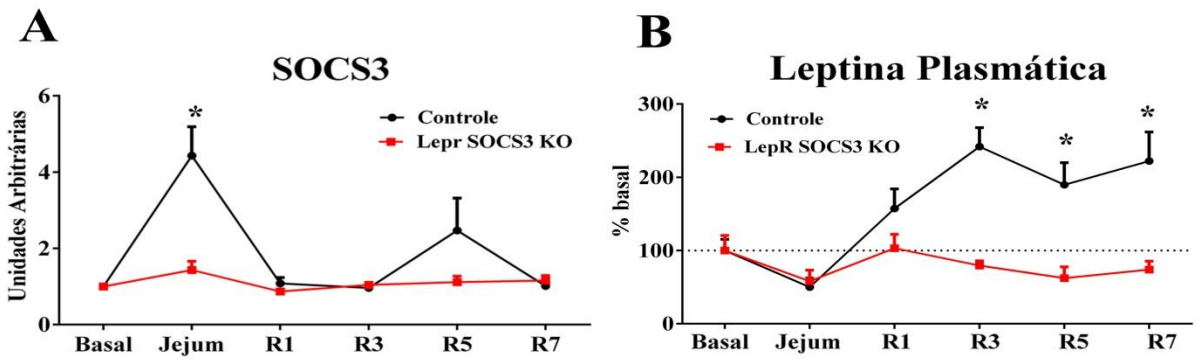


Depois que encontramos evidências da participação do SOCS3 na modulação da hiperfagia e no reganho de peso,investigamos os mecanismos moleculares que controlam esse comportamento alimentar. Dessa forma, os animais foram eutanasiados em momentos diferentes (Basal, Jejum, R1, R3, R5 e R7) para analisarmos a expressão hipotalâmica de genes envolvidos no comportamento alimentar (NPY, AgRP, orexina, POMC) e resistência à leptina (SOCS3, PTP1B PTPN2, PTPRe SH2B1). Além disso, o sangue foi coletado para analisarmos a concentração de leptina plasmática.

Similarmente aos resultados anteriores, a expressão gênica de SOCS3 não se alterou nos animais LepR SOCS3 KO, independentemente do momento da eutanásia(**FIGURA 9A**). Em contraste, observamos aumento da expressão de SOCS3 nos animais do grupo controle no tempo R1. Esses resultados mostram, novamente, que a deleção condicional deste gene foi efetiva em prevenir variações na expressão gênica do SOCS3 no hipotálamo dos animais LepR SOCS3 KO.

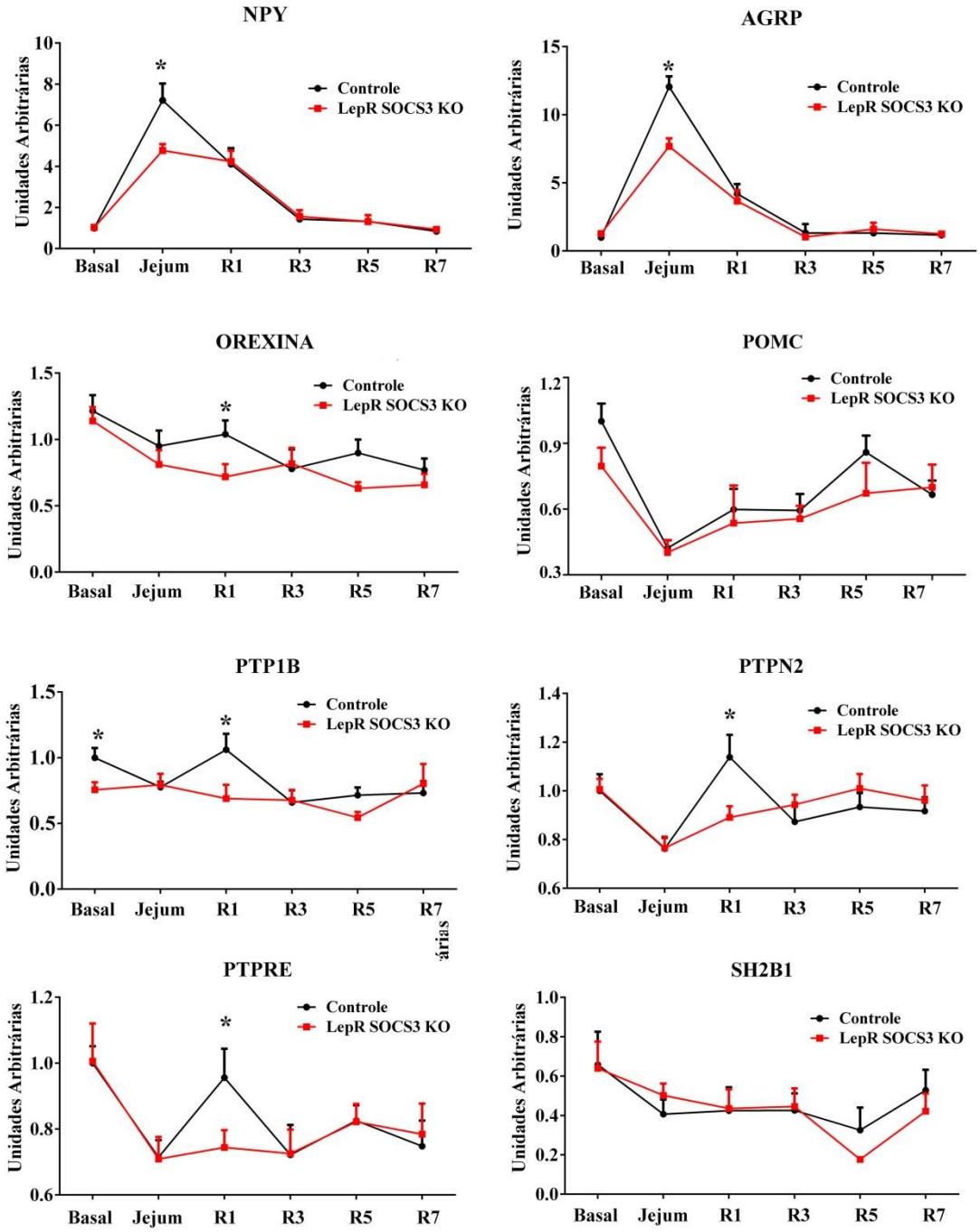
Quando analisamos a concentração de leptina sérica (**FIGURA 9B**), verificamos que, diferentemente do grupo LepR SOCS3 KO, a concentração deste hormônio aumentou progressivamente ao longo dos dias de recuperação no grupo CON, sendo estatisticamente maior ao grupo LepR SOCS3 KO nos períodos R3, R5 e R7.

Figura 9 -Expressão hipotalâmica do gene SOCS3 (A) e concentração plasmática de Leptina (B) dos animais CON e LEpR SOCS3 KO submetidos a 48 horas de jejum seguido de re-alimentação ***(*P < 0,05 CON vs KO)***



O aumento da expressão de SOCS3 nos animais do grupo controle, em paralelo com o aumento dos níveis de leptina, estão de acordo com a nossa ideia inicial de que o período de recuperação, após restrição alimentar, pode ser marcado pelo estado de resistência à ação da leptina, favorecendo a hiperfagia e o reganho de peso.

Figura 10 -Expressão gênica dos animais CON e LepR SOCS3 KO submetidos a 48 horas de jejum e seguido de realimentação ***(*P < 0,05 CON vs KO***



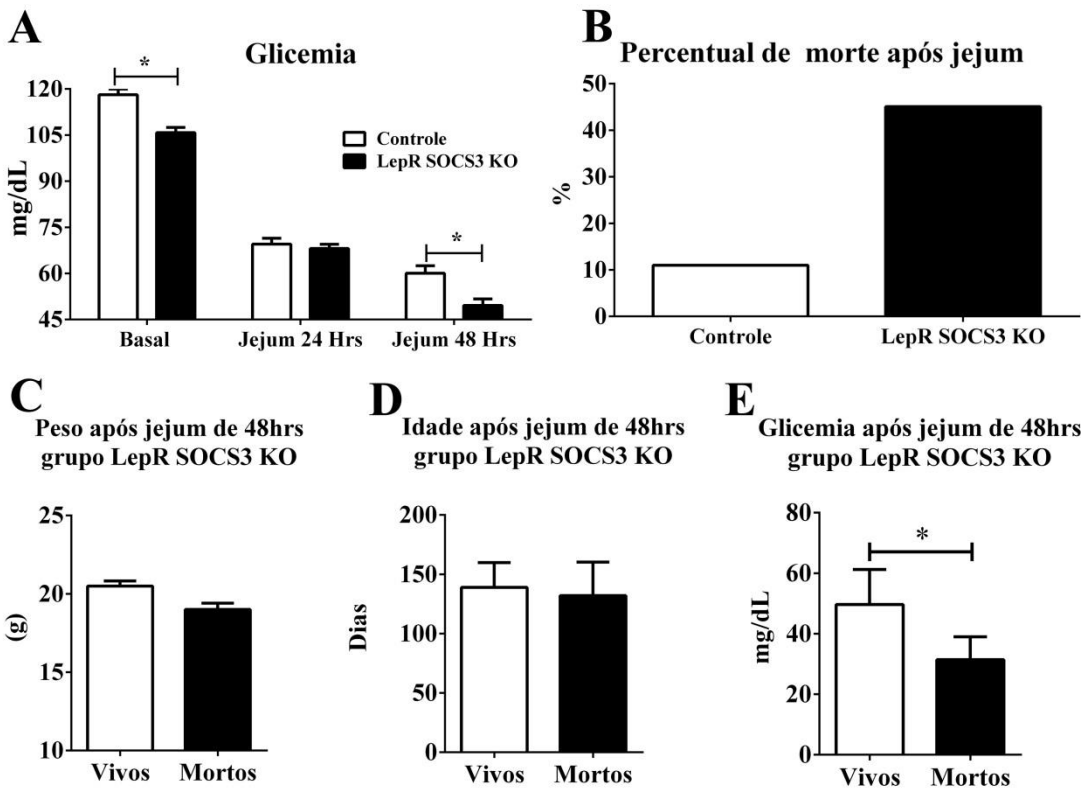
Posteriormente, quando foram analisadostranscritos envolvidos no comportamento alimentar (**FIGURA 10**), verificamos que o grupo CON apresentou maior expressão de neuropeptídios orexigênicos NPY e AgRP no jejum, enquanto a orexina mostrou-se elevada nos R1 e R5, comparada com o grupo LepR SOCS3 KO. Além disso, a expressão gênica das enzimas fosfatases, envolvidas na inibição da sinalização da leptina, estava aumentada nos animais do grupo controle nos momentos basal (PTP1B) e R1 (PTP1B, PTBRe e PTPN2).

5.6 Inativação de SOCS3 em células que expressam o LepR promove hipoglicemia e reduz a capacidade gliconeogênica de animais submetidos a jejum prolongado

Durante este experimento, observamos que grande percentual de animais LepRSOCS3 KO apresentou hipoglicemia durante o jejum prolongado (**FIGURA 11A**).Vários desses animais, apesar de receberem ração *ad libitum*na recuperação nutricional,tiveram pouca ingestão alimentar, resultando em óbito.Tal situação não ocorreude maneira tão intensa no grupo controle. Nessa conjuntura, de 46 animaisdo grupo controle, 5 (11%) não sobreviveram após serem submetidos ao protocolo de jejum. Surpreendentemente, dos 51 camundongos LepRSOCS3 KOsubmetidos ao mesmo protocolo, houve óbito em 23 dos casos (aproximadamente 50%) (**FIGURA 11B**). Vale lembrar que todos os animais morreram ao longo do primeiro dia de recuperação, permitindo que fossem realizadas análises de peso e glicemia ao final do período de jejum.Dessa maneira, quando verificamos as características entre os animais LepRSOCS3 KO sobreviventes ao protocolo e aqueles, do mesmo grupo, que morreram ao longo do primeiro dia de recuperação nutricional, observamos que os animais não eram diferentes na massa corporal (**FIGURA 11C**) ena idade (**FIGURA 11D**). Entretanto, os camundongos que morreram apresentaram concentração de glicemia estatisticamente menor após 48 horas de jejum(**FIGURA 11E**).

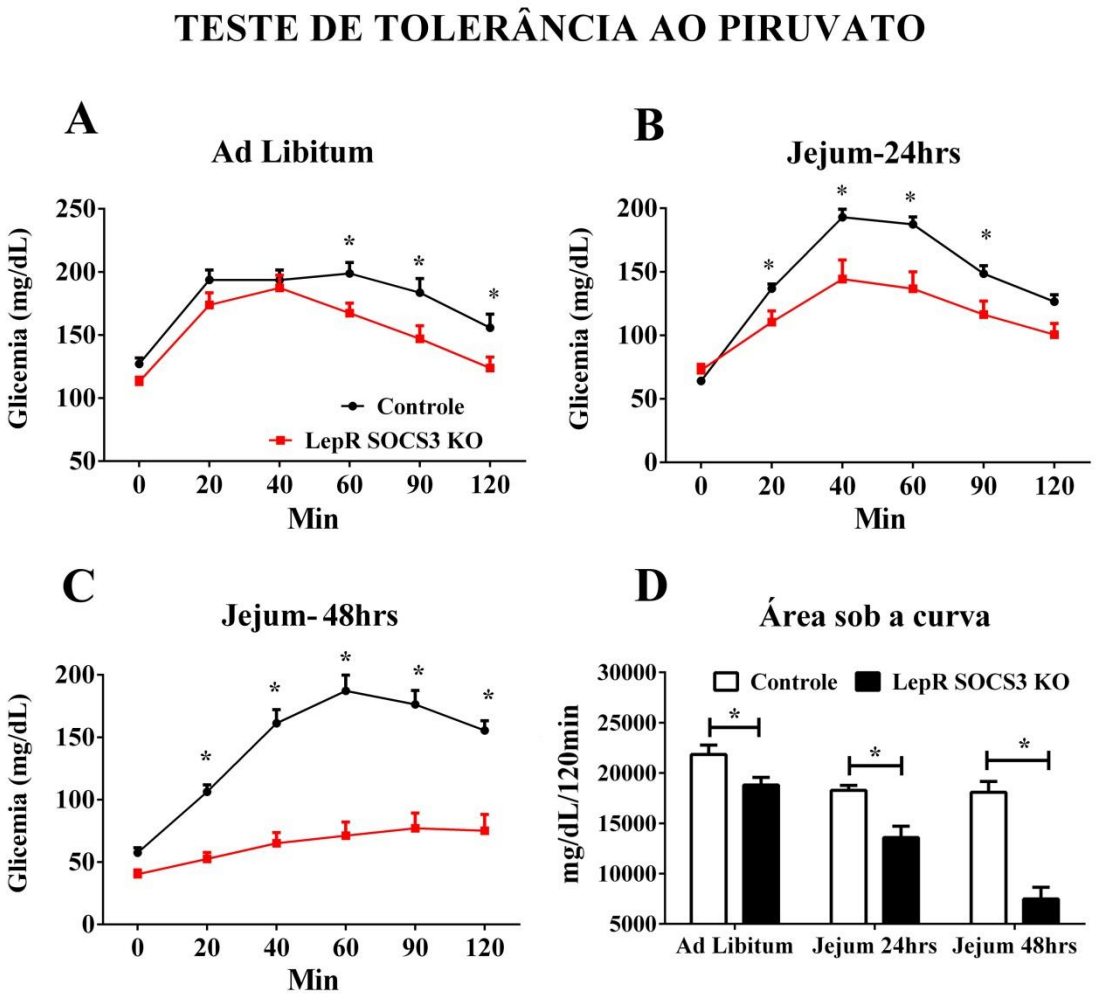
Figura 11 -Glicemia dos animais dos animais CON e LepR SOCS3 KO submetidos a 48 horas de jejum e seguido de realimentação (A). Percentual (B) e características os animais

sobreviventes e mortos após 48 horas de jejum peso (C), idade (D) e glicemia (E). ***(*P < 0,05)***



Baseadosem nossos resultados e também em relatos na literatura sobre os efeitos da leptina na inibição da gliconeogênese hepática(GERMAN et al., 2009),verificamos se a deleção condicional de SOCS3 compromete o controle glicêmico dos animais e, consequentemente, a habilidade, de alguns animais, em sobreviver durante período de jejum prolongado. Para tanto, realizamos o teste de tolerância ao piruvato (TTP), que se baseia na administração de um precursor da produção *de novo* de glicose (piruvato) e avalia o aumento da glicose circulante. Realizamos os TTP nas condições *ad libitum*, 24horas e 48horas de jejum e, conforme podemos observar na figura 12, a capacidade de manutenção da homeostase glicêmica pelo fígado foi menor nos animais LepRSOCS3 KO, mesmo na situação *ad libitum* de consumo de ração(**FIGURA 12A**). Interessantemente, observamos quequanto maior é o período de jejum, mais inibida se encontra a gliconeogênese nos camundongos LepRSOCS3 KO. Esses dados ajudam no entendimento da ocorrência da hipoglicemia dos animais LepRSOCS3 KO durante jejum prolongado.

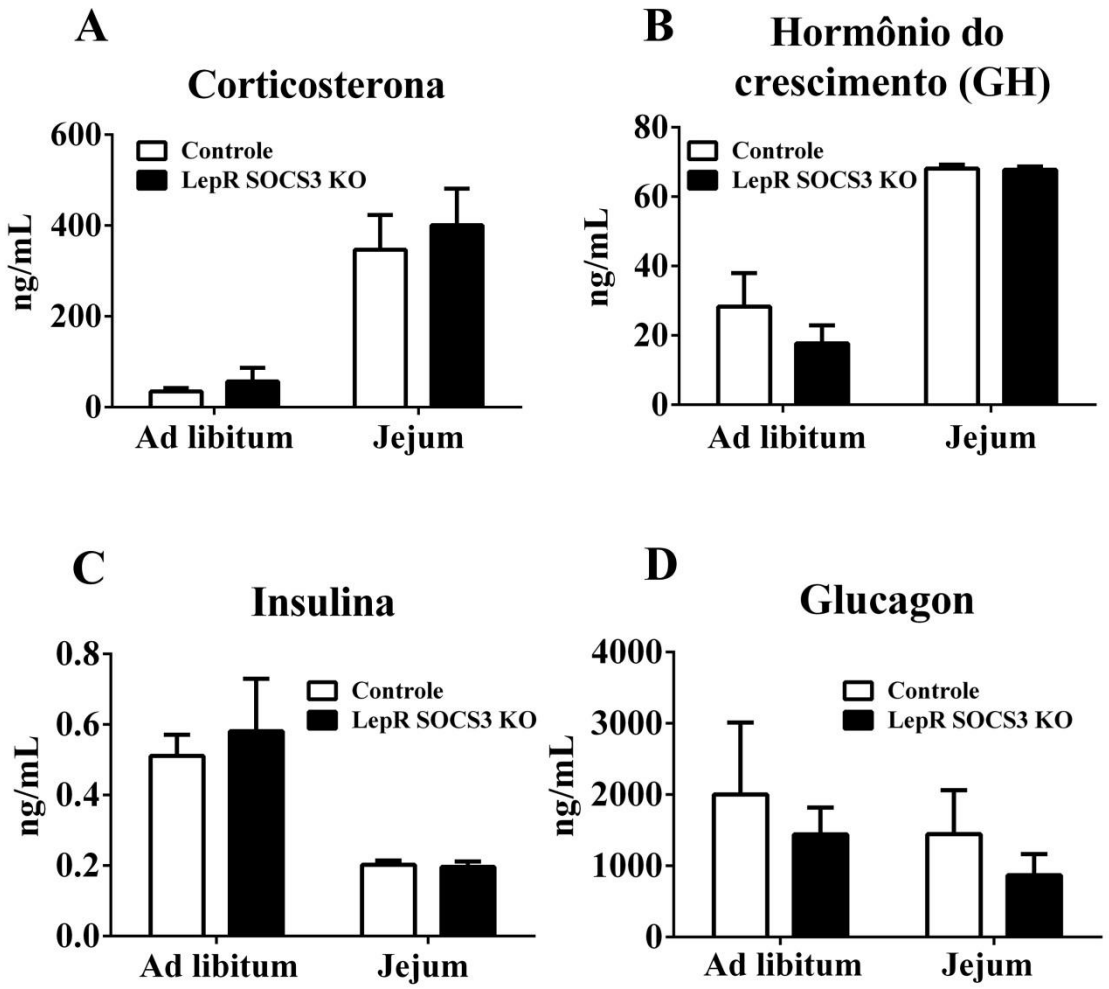
Figura 12 -Teste de tolerância ao piruvato (TTP) no *ad libtum* (A), após 24 (B) e 48 horas de jejum (C). Área sob a curva (AUC) nos grupos Controle e LepR SOCS3 KO nas 3 etapas do experimento (D) ***(*P < 0,05 CON vs KO)***



Na sequência, investigamos os possíveis mecanismos centrais afetados nos animais LepR SOCS3 KO que influenciam sua capacidade de controlar a gliconeogênese hepática. Dessa maneira, testamos se esses efeitos dependemde ação neuroendócrina ou se são por meio do sistema nervoso autônomo (sistema simpático ou parassimpático). Para isso, inicialmente analisamos,nos animais eutanasiados no período*baseline*(BASE) e após 48 horas de jejum (JEJUM), a concentração sérica de hormônios contrarregulatórios que auxiliam na manutenção da glicemia em situações de jejum: corticosterona, glucagon, insulina e hormônio do crescimento (GH)(**FIGURA 13**). Observamos que, apesar de o jejum aumentar aconcentração de corticosterona e GH, esse efeito foi similar entre os grupos CON e LepR SOCS3 KO. Em contraste, 48 horas de privação alimentar causamredução na

concentração de insulina no sangue, mas não foi encontrada diferença estatística entre os grupos. Já a concentração do hormônio glucagon foi similar entre *ad libitum* e jejum, também sem diferença estatística entre os grupos.

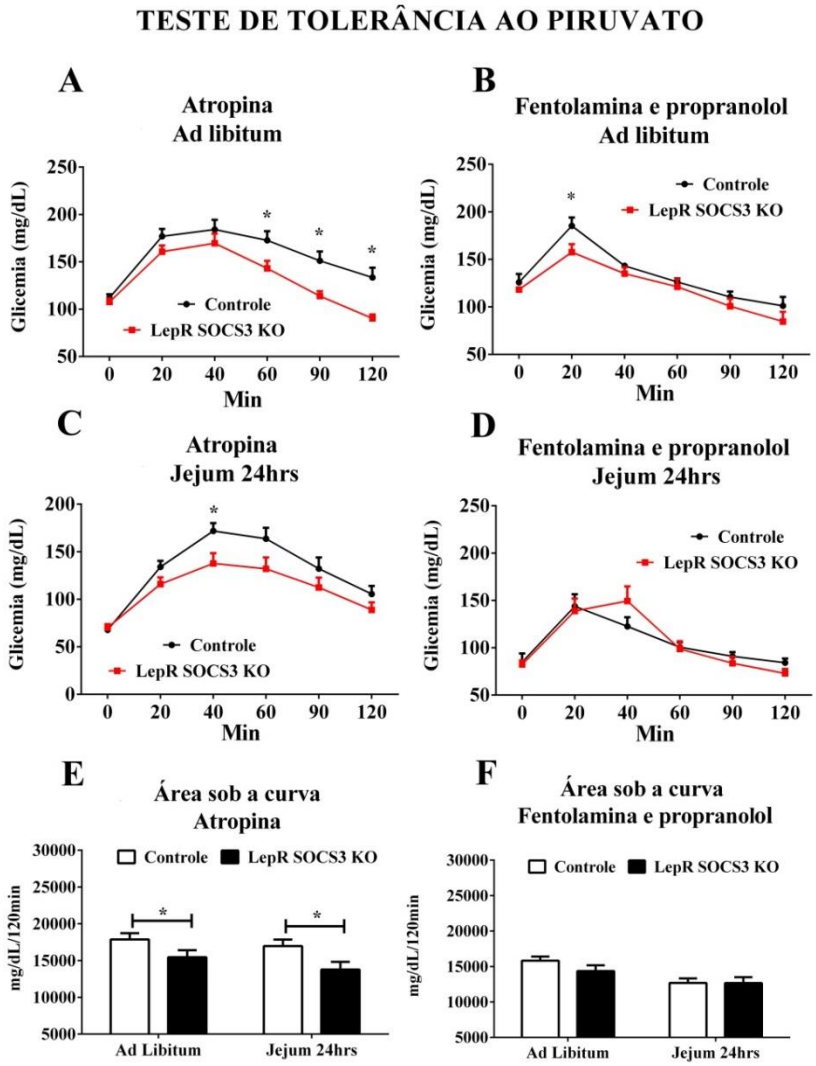
Figura 13 -Concentração hormonal dos animais controle e LepR SOCS3 KOnos períodos *ad libitum* e jejum



Uma vez que não encontramos evidências de alterações neuroendócrinas que possam explicar a supressão da gliconeogênese nos camundongos LepR SOCS3 KO, analisamos, então, a possível participação dos sistemas nervosos simpático e parassimpático. Para tanto, repetimos o TTP, agora coadministrando drogas que bloqueassem o sistema nervoso autônomo (**FIGURA 14**). Inicialmente, realizamos o TPP com a administração de atropina (3mg/kg), um antagonista muscarínico que

age nas terminações nervosas parassimpáticas, inibindo-as. O teste foi realizado no estado*ad libitum* e após 24 horas de jejum. Na sequência, repetimos o teste com a administração de fentolamina (3mg/kg), bloqueador alfa-adrenérgico, juntamente com propranolol (0,5mg/kg), bloqueador beta-adrenérgico.Essa combinação de drogas é capaz de bloquear o sistema simpático. Observamos que, mesmo com o bloqueio das terminações nervosas parassimpáticas, a capacidade gliconeogênica ainda foi menor nos animais LepR SOCS3 KO, comparado com os animais CON – sugerindo que o sistema nervoso parassimpático não temparticipação significativa nas alterações da gliconeogênese nos camundongos LepR SOCS3 KO. No entanto, quando bloqueamos o sistema nervoso simpático, não houve diferença do TPP entre os grupos. Esses dados, juntos com os resultados hormonais, nos mostram que o controle glicêmico dos animais LepR SOCS3 KO se dá principalmente por meio do sistema nervoso simpático.

Figura 14 -Teste de tolerância ao piruvato, com o bloqueio do sistema nervoso autônomo nos momentos *Ad Libitum* e Jejum ***(*P < 0,05 CON vs KO)***

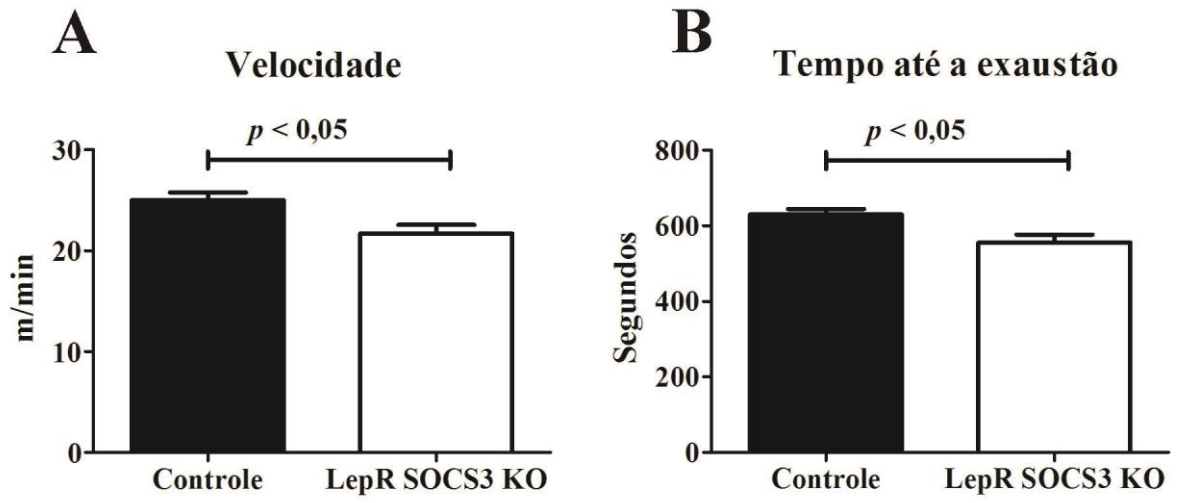


5.7 Inativação de SOCS3 em células que expressam o LepR compromete funcionamento cardiovascular e reduz o índice de sobrevivência

Assim, conforme demonstrado em nossos dados anteriores, cujos animais LepR SOCS3 KO apresentam distúrbio no sistema nervoso simpático, demos continuidade em nossas análises para verificar se esta alteração poderia comprometer, de alguma maneira, a funcionalidade de órgãos que sofrem a modulação pelo sistema nervoso simpático. Devido alguns trabalhos demonstraremrelação entre leptina e problemas cardiovasculares(MARTIN et al., 2008; MARTINEZ-MARTINEZ et al., 2014), decidimos investigar funções cardiovasculares. Dessa forma, realizamos um teste de esforço máximo em esteira (TEM) nos animais controle e LepR SOCS3 KO, para detectar a capacidade

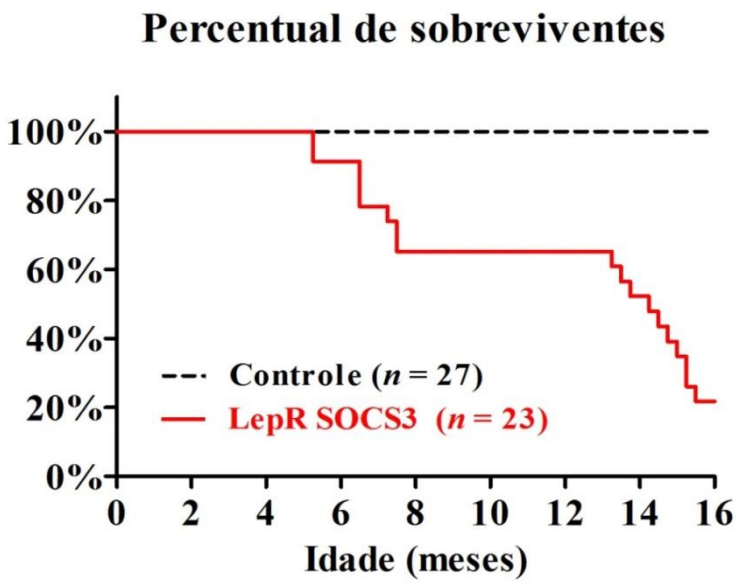
aeróbica. Interessantemente, como podemos observar na figura 15, os camundongos do grupo LepR SOCS3 KO tiveram menor desempenho no TEM do que os animais do controle, tanto na velocidade alcançada, bem como o tempo de duração do teste até a exaustão (**FIGURA 15**). Esses resultados nos mostram que os camundongos LepR SOCS3 KO podem apresentar mudanças funcionais em seu sistema cardiovascular, levando àmenor tolerância ao exercício físico.

Figura 15 -Desempenho no teste de esforço máximo (TEM) em camundongos controle e com deleção de SOCS3 em células que expressam o receptor de leptina (LepR SOCS3 KO).Velocidade alcançada (A) e tempo até a exaustão ***(*P < 0,05 CON vs KO)***



Com base nesses resultados, questionamos se o aumento da sensibilidade à leptina poderia comprometer de alguma forma a sobrevivência dos animais LepR SOCS3 KO em longo prazo. Por isso, acompanhamos, durante 16 meses, 27 camundongos controle e 23 LepR SOCS3 KO e, como resultado, verificamos taxa de mortalidade no grupo LepR SOCS3 KO de 80%, ao passo que praticamente 100% do grupo controle mantiveram-se vivos neste mesmo período. Ou seja, praticamente 18 camundongos do grupo LepR SOCS3 KO morreram ao longo de 16 meses (**FIGURA 16**). Esses dados chamam a atenção por mostrar possíveis consequências que o aumento da sensibilidade à leptina pode causar.

Figura 16 -Percentual de sobreviventes de animais controle e LepR SOCS3 KO ao longo de 16 meses de acompanhamento


Percentual de sobreviventes
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Controle (n = 27)
LepR SOCS3 (n = 23)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Idade (meses)

6 DISCUSSÃO

A prevalência da obesidade está aumentando em toda população mundial, tornando-se uma preocupação de saúde pública. Tendo em vista as consequências desencadeadas pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, diversos trabalhos são desenvolvidos com intuito de traçar estratégias para prevenir ou tratar este quadro clínico.

A sinalização da leptina é essencial para a manutenção adequada da regulação do consumo alimentar, da massa corporal e da homeostase glicêmica (COHEN et al., 2001; DE LUCA et al., 2005; SCHWARTZ et al., 2000). Contudo, indivíduos obesos apresentam elevada concentração da leptina, além de não responderem adequadamente ao tratamento exógeno deste hormônio, mostrando que a obesidade é caracterizada por resistência à ação da leptina.

A restrição calórica (RC) é uma das principais alternativas não farmacológicas para o tratamento da obesidade. Contudo, no longo prazo, esta conduta nutricional tem se mostrado ineficaz, devido ao surgimento de adaptações fisiológicas compensatórias, tais quais: redução do gasto energético e aumento no consumo alimentar – adaptações estas que resultam na recuperação do peso perdido(CORNIER, 2011). Portanto, no presente trabalho, avaliamos o papel do SOCS3 no desenvolvimento da obesidade induzida pela dieta e em sua função no comportamento alimentar após RC. Tínhamos, como hipótese inicial, que a deleção da proteína SOCS3, em células responsivas à leptina, promoveria maior ação deste hormônio, o que resultariaem maior saciedade nos animais e, dessa forma, contribuiria para menor ganho de peso, seja na obesidade induzida pela dieta ou na recuperação alimentar.

Nós observamos que a ablação do SOCS3 em células que expressam o LepR não foi suficiente para prevenir os ganhos de peso e adiposidade em animais tratados com HFD. Nossos resultados são diferentes daqueles encontrados em trabalhos sobre a deleção do SOCS3 e obesidade.Moriet al. (2004) demonstraram que animais deficientes de SOCS3 no cérebro tiveram atenuação da obesidade induzida pela dieta. Além disso, a deleção de SOCS3 somente em neurônios POMC preveniu parcialmente a obesidade induzida pela dieta (KIEVIT et al., 2006), enquanto que a elevada expressão do SOCS3, ainda em neurônios POMC, foi suficiente para causar resistência à leptina e obesidade (REED et al., 2010). Apesar

de neurônios POMC serem uma importante população de células ativadas pela leptina, cabe ressaltar que apenas um subconjunto de neurônios POMC expressa LepR(BERGLUND et al., 2012a; HUO et al., 2009; WILLIAMS et al., 2010). Portanto, em nosso estudo, a deleção de SOCS3 em neurônios POMC ocorreu somente nesta subpopulação de neurônios que expressam LepR, enquanto não afetou a outra subpopulação. Assim, acreditamos que essas discrepâncias dos nossos resultados, comparados com os demais trabalhos na literatura, podem ser explicadas pela diferença na população de células afetadas pela manipulação genética.

No entanto, observamos que a deleção condicional de SOCS3 somente em células responsivas à leptina foi capaz de reduzir a hiperfagia alimentar durante a recuperação nutricional – o que resultou em menor ganho de peso e massa corporal no grupo LepR SOCS3 KO. De acordo com esses resultados, as análises de expressões gênicas realizadas com os animais submetidos a 48 horas de jejum acusaram menor expressão de neuropeptídios anorexígenos, como NPY e AgRP, principais alvos da ação da leptina.

De acordo com os nossos resultados, com o objetivo de investigar a participação do SOCS3 na obesidade e na resistência à leptina, Reedet al., (2010) desenvolveram camundongos que superexpressavam SOCS3 em neurônios POMC e encontraram que a superexpressão desta proteína promoveu obesidade, resistência à leptina e intolerância à glicose.KROL; SPEAKMAN (2007), em roedores *Microtus agrestis*, constataram que o desenvolvimento da adiposidade foi marcado por aumento na concentração plasmática de leptina. Além disso, durante o período de desenvolvimento da massa corporal, foi encontrado aumento na expressão de SOCS3 no núcleo arqueado do hipotálamo. Os autores acreditam que este fenômeno tenha desencadeado resistência à leptina e ganho de peso.

O aumento da leptina plasmática estimula a atividade de neurônios produtores de pró-opiomelanocorticotropina (POMC) e do transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), que possuem efeitos anorexígenos (SCHWARTZ et al., 2000). Nesse sentido, acreditávamos que animais LepR SOCS3 KO, por serem mais sensíveis à leptina, apresentariam maior expressão de POMC. No entanto, animais LepR SOCS3 KO submetidos à dieta com alto teor lipídico, apresentaram menor expressão gênica hipotalâmica deste neuropeptídeo quando comparados com os do grupo controle. Além disso, no experimento de recuperação alimentar, não encontramos qualquer diferença na expressão de POMC entre os grupos. De

maneira similar, outros trabalhos também mostraram que apesar do seu efeito anorexígenico, a expressão de POMC estava aumentada em camundongos com obesidade induzida pela dieta(HAGAN et al., 1999; ZIOTOPOULOUet al., 2000). Ademais, em outro trabalho desenvolvido pelo nosso laboratório, comcamundongos fêmeas ovarectomizadas, encontramos que a expressão de POMC estava aumentada 30 dias e 24 semanas após a ovarectomia (DA SILVA et al., 2014). Portanto, acreditamos que o aumento da expressão de POMC em situações que predispõem a obesidade faça parte de um mecanismo de *feedback* negativo para restaurar a homeostase energética e que, provavelmente, esse mecanismo não esteja relacionado diretamente com aaçãoda leptina.

Embora conhecido o papel no CART, a literatura aponta que a sua produção ocorre de forma diferente dependendo da região cerebral, apresentando, até mesmo, resultados distintos no que diz respeito a regulação do balanço energético. A injeção de CART no ventrículo cerebral reduziu o consumo alimentar em ratos submetidos ou não ao jejum (YU et al., 2008), enquanto injeção hipotalâmica de CART aumentou o consumo alimentar(ABBOTT et al., 2001). Além disso, a expressão de CART foi significativamente reduzida no núcleo arqueado, mas não no núcleo dorsomedial do hipotálamo de ratos submetidos ao jejum de 24 horas(KRISTENSEN et al., 1998). Portanto, em nosso trabalho, optamos por não analisar a expressão deste neuropeptídeo devido sua heterogeneidade em diversas regiões hipotalâmicas.

Acreditamos que nossos resultados são altamente relevantes, pois apontam para outras possibilidades para o tratamento da obesidade. Uma vez que a principal dificuldade é a manutenção do peso perdido no longo prazo, o desenvolvimento de fármacos que inibam a ação do SOCS3 pode ser uma medida efetiva na atenuação do consumo alimentar após dieta restrita em calorias.

Além das mudanças no comportamento alimentar, as dietas de RC e a perda de peso refletem-se em alterações fisiológicas compensatórias que levam à redução do gasto energético(LEIBEL et al., 1995; REDMAN et al., 2009); consequentemente, o período posterior ao término da RC é marcado por rápida recuperação do peso(BJORNTORP; YANG, 1982). Nesse sentido, evidências mostram que a leptina é capaz de modular também o gasto energético (HALAAS et al., 1995); embora não tenhamos investigadoessa variável no presente trabalho, podemos especular que a manutenção do gasto energético, resultante da maior sensibilidade à leptina nos

animais *knockout*condicionais do SOCS3, possa ter contribuído para o menor ganho de peso durante o período de recuperação nutricional.

Em nosso experimento de restrição energética, observamos que a expressão de genes que codificam as proteínas PTP1B, PTPN2 e PTPRe estava aumentada no grupo controle, no primeiro dia de recuperação alimentar. Essas proteínas fazem parte da classe das tirosinas fosfatases (PTPs) que promovem desfosforilação de proteínas no resíduo de tirosina. Dessa forma, uma vez que a via da leptina é dependente da fosforilação em tirosina da proteína JAK2, o aumento a expressão das tirosinas fosfatases pode atenuar o sinal da leptina. Comprovando tais mecanismos, camundongos com deleção ou com mutação de PTP1B em neurônios no hipotálamo são mais magros - e mais sensíveis a leptina -, mais resistentes à obesidade induzida pela dieta, além de apresentarem melhora na homeostase glicêmica (BENCE et al., 2006; CHENG et al., 2002; KLAMAN et al., 2000; PICARDI et al., 2008). Similarmente, a PTPre também desfosforila a JAK2. Além disso, a PTPre está aumentada no hipotálamo de camundongos obesos. Por outro lado, a deleção de PTPre protege os animais da obesidade em diferentes condições experimentais como: dieta, envelhecimento e ovariectomia(ROUSSO-NOORI et al., 2011). Portanto, acreditamos que o aumento da atividade destas proteínas está associado com maior consumo alimentar e maior ganho de peso no grupo controle durante o período de recuperação alimentar.

Contudo, no experimento de obesidade induzida por dieta, não encontramos qualquer diferença entre os grupos, nas expressões destes mesmos genes. Suet al. (2014)mostraram que a concentração da leptina era diretamente proporcional à expressão de PTP1B. Além disso, a expressão de PTPre ocorre através de um mecanismo de feedback negativo, ocasionado pela própria leptina(ROUSSO-NOORI et al., 2011). Neste raciocínio, no experimento de recuperação alimentar, os animais do grupo controle apresentaram sistemático aumento na leptina plasmática o que possivelmente pode ter contribuído para o aumento da expressão desses genes. Em contraste, no experimento da obesidade induzida pela dieta, a concentração de leptina foi semelhante entre os grupos controle e LepR SOCS3 KO. Portanto, apesar de não termos investigado diretamente os mecanismos pelos quais a delação de SOCS3 em células LepR modula a expressão de genes que codificam as PTPs, acreditamos que a diferença na concentração da leptina plasmática esteja envolvida na discrepância de resultados entre os dois experimentos

As diferenças entre os nossos resultados, nos quais a deleção do SOCS3 foi capaz de minimizar o ganho de peso após o período de restrição calórica, mas não causou qualquer impacto na massa corporal dos animais submetidos à HFD, nos mostram o envolvimento de outros fatores no controle do comportamento alimentar durante a obesidade induzida pela dieta. De fato, evidências mostram que a ingestão de dietas com alto teor lipídico leva à inflamação hipotalâmica através de vias moleculares como a IKKB/NF-kB(PURKAYASTHA et al., 2011; ZHANG et al., 2008b). Além disso, a inflamação crônica pode levar à apoptose de neurônios que atuam no controle alimentar(MCNAY et al., 2012; MORAES et al., 2009). Portanto, o consumo HFD pode estar associado a inflamações centrais que levam ao detrimento de neurônios essencias para o controle da massa corporal(THALER et al., 2012). Assim, podemos sugerir que a deleção do SOCS3 não foi suficiente para atenuar esses outros processos inflamatórios envolvidos na ingestão de HFD e que também contribuem para a obesidade. Por isso, o ganho de peso foi similar quando comparado com o grupo controle.

Além disso, acreditamos que a diferença, encontrada em nossos resultados, venha ainda mais reforçar a hipótese teórica de que a ação da leptina seja muito mais forte na sua ausência, como em situações de escassez alimentar, mais evitando que o indivíduo fique magro do que prevenindo o ganho de peso em situações de excesso de alimento – fato que ajuda a explicar a dificuldade de combater o problema da obesidade.

Encontramos que a sensibilidade à leptina atenuou o ganho de peso em um modelo severo de restrição calórica. Contudo,é importante destacar que estratégias dietéticas atualmente utilizadas para perda de peso são, em sua maioria, mais longas e brandas do que essas utilizadas no presente trabalho. Portanto, futuras pesquisas tornam-se necessárias para elucidar o efeito do aumento da sensibilidade à leptina na manutenção do peso em longo prazo.

Além disso, como previamente discutido, existem outras proteínas que também afetam a sinalização da leptina. Como acreditamos que o aumento das proteínas desta classe, em nossos animais do grupo controle, possa ter se refletido no consumo alimentar após o período de 48 de jejum, seria importante o desenvolvimento de novos trabalhos para investigar o efeito da inibição dessas proteínas no aumento da sensibilidade à leptina e, consequentemente, no ganho de peso durante período de recuperação nutricional. Torna-se necessário, também,

investigarse a deleção mútua dessas proteínas, SOCS3 e PTPs,podepromover efeitossinérgicosna redução do consumo alimentar e ganho de peso.

Portanto, diante dos nossos resultados e dos demais trabalhos encontrados na literatura científica, podemos considerar a SOCS3 com um importante papel no controle do comportamento alimentar. Nossos dados indicam que a supressão desta proteína, principalmente em células que expressam o receptor de leptina, pode ser uma terapia com potencial para atenuara recuperação do peso perdido após dietas de restrição calórica.

Observamos que a deleção de SOCS3 foi capaz de modular o controle glicêmico dos animais. No experimento da obesidade induzida pela dieta, camundongos do grupo LepR SOCS3 KO apresentaram melhor sensibilidade à insulina, verificada pelo ITT e confirmada pela análise de *western blot*das proteínas fosforiladas IR e AKT.

Diversos estudos têm mostrado que a leptina pode regular não só o balanço energético, mas também a homeostase glicêmica. Nessa conjuntura,o transplante de tecido adiposo de animais selvagens, mas não de animais deficientes de leptina (ob/ob), melhora a glicemia de camundongos com lipodistrofia (COLOMBO et al., 2002; GAVRILOVAet al., 2000). Além disso, a reposição de leptina preveniu a resistência àinsulina em ratos adultos Wistar, por mecanismos independentes daqueles envolvidos no consumo alimentar e no controle de peso(GERMAN et al., 2010).

Acredita-se que a leptina possa controlar a homeostase glicêmica por diferentes mecanismos. No entanto, em todas as situações, a ação é iniciada centralmente. A leptinaatua diretamente no hipotálamo,que regula a secreção de glucagon pelo pâncreas, reduzindo a glicemia (MEEK; MORTON, 2012). Mais especificamente, no núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH), a administração de leptina melhora a captação de glicose pelos tecidos periféricos de forma independente da insulina. Além disso, a deleção seletiva de SOCS3 somente em neurônios do VMH melhora a homeostase glicêmica sem afetar a massa corporal(HAQUE et al., 1999; MINOKOSHI et al., 1999; ZHANG et al., 2008a).

Em nosso trabalho, não investigamos os núcleos hipotalâmicos de maneira isolada. Uma vez que a expressão gênica foi realizada com todo o hipotálamo, éimpossível definir qual núcleo apresentou maior participação no controle da regulação da homeostase glicêmica. No entanto, nossos resultados suportam que

este controle ocorreu centralmente. No experimento de obesidade induzida pela dieta, observamos aumento da expressão hipotalâmica do gene PTPN11 nos animais LepR SOCS3 KO. Esse gene transcreve a proteína SHP2 tirosina fosfatase que apresenta importante participação da sinalização da leptina. A deleção neural de SHP2 causa obesidade em camundongos e comprometimento do sinal da leptina pela via MAPK/ERK (BJORBAEK et al., 2001; ZHANG et al., 2004). Adicionalmente, para investigar o impacto da ação da leptina no metabolismo pela via SHP2, camundongos controles e com deleção de SHP2 em neurônios POMC foram tratados com leptina por 7 dias. A infusão de leptina foi capaz de reduzir a glicemia e a insulina nos animais controles, mas não no grupo KO. Esses resultados indicam o papel do SHP2 em neurônios POMC na ação antidiabética da leptina (DO CARMO et al., 2014). O mecanismo pelo qual a deleção condicional de SOCS3,em nosso trabalho, aumentou a expressão de PTPN11 no hipotálamo é desconhecido. No entanto, acreditamos que este fator tenha relação com os resultados da melhora da sensibilidade à insulina nos animais LepR SOCS3 KO submetidos à dieta com alto teor de lipídios.

Acreditamos que nossos resultados possam contribuir para o desenvolvimento de futuras estratégias no tratamento da diabetes. Atualmente, a maioria dos fármacos utilizados na terapia da diabetes age perifericamente, seja no aumento da secreção de insulina pelo pâncreas ou no aumentoda sensibilidade à insulina no fígado e no músculo, regulando, assim, a homeostase glicêmica. Contudo, baseado em nossos resultados e demais trabalhos na literatura científica, o desenvolvimento de fármacos que possam aumentar a sensibilidade à leptina em pessoas obesas, em especial no sistema nervoso central, torna-se interessante medida de prevenção contra o desenvolvimento de diabetes tipo II.

No entanto, apesar de a redução da gliconeogênese ser uma característica benéfica durante a obesidade, quando a hiperglicemia é um dos aspectos a serem combatidos, este mesmo efeito pode ser prejudicial em situações de restrição nutricional, quandoo consumo alimentar é escasso e a manutenção da glicemia pelo fígado é fundamental.

Durante período de jejum, acontece uma série de modificações fisiológicas. O principal objetivo dessas adaptações é manter a homeostase glicêmica. Isso porque a glicose do sangue é o principal substrato energético para o sistema nervoso central. Assim, o controle da glicemia garante o bom funcionamento do SNC e,

consequentemente, do organismo como um todo. Entre as principais adaptações, destaca-se a regulação hormonal. Um período prolongado de jejum promove aumento da secreção de hormônios contrarregulatórios como glucagon, GH, cortisol e concomitante redução da secreção de insulina. A ação de todos esses hormônios em conjunto resulta no aumento da glicemia por diferentes mecanismos, tais quais: 1) aumento da lipólise pelo tecido adiposo, com o objetivo aumentar oferta deste substrato para o músculo; 2) aumento da gliconeogênese pelo fígado; e 3) redução da captação de glicose pelos tecidos periféricos. Além disso, a participação do sistema nervoso autonômico neste processo também é importante. A liberação das catecolaminas, pelo sistema nervoso simpático, promove, entre outras adaptações, aumento de fornecimento de glicose e ácidos graxos para a corrente sanguínea.

Para descobrir por qual mecanismo o aumento da sensibilidade à leptina modula a gliconeogênese hepática (ação neuroendócrina ou autonômica) analisamos a concentração dos hormônios contrarregulatórios nos períodos ad libitum e jejum e não encontramos qualquer diferença entre os grupos. Contudo, o teste de tolerância ao piruvato, associado a drogas que inibem o sistema nervoso autonômico, mostrou que ocontrole glicêmico dos animais LepR SOCS3 KO se dá particularmente pelo sistema nervoso simpático.

Nossos dados estão de acordo com os demais trabalhos da literatura que apontam a participação da leptina na regulação do sistema nervoso simpático. Embora neurônios simpáticos pré-ganglionares não expressem o LepR, neurônios sensíveis à leptina são encontrados em vários locais do cérebro que podem potencialmente influenciar no fluxo simpático. Nessa conjuntura,(HAYNES et al., 1997) demonstraram que a administração intravenosa de leptina aumentou a atividade simpática para o tecido adiposo marrom, os rins e as glândulas adrenais em ratos Sprague-Dawley. Além disso, Eliaset al., (1999) mostraram que neurônios sensíveis à leptina, localizados na área retroquiasmática e no núcleo arqueado,se projetam para neurônios simpáticos pré-glangionares na medula espinal torácica.Os efeitos da leptina no sistema nervoso simpático também podem ser observados com a ausência da ação deste hormônio. Humanos homozigotos para a mutação do gene da leptina apresentaram redução no tônussimpático (OZATA et al., 1999). Especificamente sobre regulação da glicemia, evidências científicas apontam que a leptina modula a gliconeogênese através da atividade da AMPKα2 no fígado(ANDREELLI et al., 2006) e que esta regulação é controlada centralmente,

pelo sistema nervoso simpático através da participação dos receptores alfa-adrenérgicos(MIYAMOTO et al., 2012).

Portanto, sugerimos que o aumento da sensibilidade da ação da leptina, causado pela deleção do gene SOCS3 em células que expressam LepR, promova alteração na atividade do sistema nervoso simpático (SNS), ampliando os efeitos regulados por esse sistema- o que refle em menor produção de glicose pelo fígado.

É importante destacar a participação do SNS no estímulo de ações que permitem ao organismo a responder as situações de estresse. Dessa maneira, o SNS desencadeia mudanças em diferentes partes do corpo, como: aceleramento da frequência cardíaca, diminuição da motilidade do intestino grosso, dilatação da pupila, além de aumentoda pressão sanguínea. Da mesma forma, o SNS é fundamental para o controle do gasto energético e paraas respostas catabólicas como glicogenólise e lipólise.(THORP; SCHLAICH, 2015). Apesar de estas variáveis serem importantes para preparar o organismopara as condições de estresse, conhecido classicamente como “luta ou fuga”, atualmente, evidências apontam que possíveis desordens fisiológicas estão relacionadas a uma superatividade do SNS. Como exemplo, distúrbios simpatéticos estão diretamente associados com o aumento da pressão arterial e com insuficiência cardíaca (OLIVEIRA-SALES et al., 2014; TAN et al., 2010). Consequentemente, o aumento do tônus do SNS está estritamente atrelado com o surgimento das principais alterações relacionadas coma síndrome metabólica (MOREIRA et al., 2015).

Tendo em vista o exposto acima, se animais do grupo LepR SOCS3 KO apresentam alteração no tônus simpático, demonstrado em nosso trabalho através do teste de piruvato com a manipulação de bloqueadores adrenérgicos, é possível especular que estes camundongos manifestariam alguma alteração fisiológica em órgãos que são modulados pelo sistema nervoso autonômico. Pelo fato de que a disfunção do sistema nervoso simpático mostrou-se fundamental para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca(PARATI; ESLER, 2012), averiguamos o funcionamento do coração através do teste de esforço máximo em esteira. Como resultado, encontramos que o grupo LepR SOCS3 KO apresentou menor desempenho no teste, comprovando, portanto, que a sensibilidade àleptina promove insuficiência coronariana em camundongos com deleção do SOCS3 em células LepR.

Esses resultados chamam a atenção, uma vez que doenças cardiovasculares são as principais causas de morte em todo o globo terrestre. Estima-se que 17,5 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2012, representando 31% do total de mortalidade em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2011).Baseados nesses achados, apuramos, finalmente, se essas alterações cardiovasculares poderiam comprometer, de alguma forma, a sobrevivência dos animais LepR SOCS3 KO em longo prazo e encontramos uma taxa de mortalidade de 80% nos animais sensíveis à leptina após 16 meses de acompanhamento.

Nossos dados estão de acordo com alguns estudos clínicos, quemostraram associação entre nível de leptina plasmática e problemas cardiovasculares(MARTIN et al., 2008). Além disso, a alta concentração plasmática deste hormônio é fator preditivo para a mortalidade em homens(BATSIS et al., 2015). No entanto, o mecanismo pelo qual a leptina está relacionada com desordens vasculares ainda não está bem estabelecido. Dessa maneira, nossos resultados fortalecem a ideia de que maior atividade da leptina, demonstrada aqui através de animais com deleção de SOCS3 em células LepR, promove disfunção no sistema nervoso autonômico, particularmente pelo aumento do tônus simpático que, por sua vez, pode estar envolvido com insuficiência coronariana e, em longo prazo, com alta taxa de mortalidade. Neste aspecto, nosso trabalho demonstra possíveis efeitos colaterais de estratégias terapêuticas que visam o aumento da ação da leptina como medida de combate à obesidade.

No entanto, vale lembrar que a produção de leptina também acontece no coração, assim como a expressão do seu receptor (LepR). Essa descobertasuporta a ação da leptina como um regulador da função cardíaca por mecanismos autócrinos e parácrinos(PURDHAM et al., 2004). Dessa forma, acredita-se que a leptina contribui, por ação direta, nas mudanças estrutural e funcional do coração na obesidade. No entanto, em nosso trabalho, acreditamos que o aumento da atividade simpática pelos animais sensíveis à leptina tenha contribuído para o surgimento de alterações cardiovasculares devido a evidências científicas que suportam a participação do sistema nervoso simpático no surgimento de alterações metabólicas relacionadas à síndrome metabólica e à insuficiência cardíaca(MOREIRA et al., 2015; PARATI; ESLER, 2012), mas como, nos animais estudados neste trabalho,a deleção do SOCS3 aconteceu em todas as células que apresentam LepR, é

possível especular que essa deleção também ocorreu no coração e, portanto, o tecido cardiovascular também estava mais sensível à ação da leptina. Embora não tenhamos estudado esta ação direta entre leptina/coração, é presumível a participação deste mecanismo no comprometimento coronariano encontrado em nossos resultados.

Em resumo, acreditamos que nossos dados ajudam a esclarecer os efeitos da leptina, através da deleção do SOCS3 em células LepR, em diferentes aspectos. No que diz respeito à modulação do consumo alimentar, a ação da leptina depende previamente da condição na o animal está inserido, pois, apesar de animais do grupo LepR SOCS3 KO apresentarem menores consumo de ração e ganho de peso após um período de restrição alimentar, o aumento da sensibilidade à leptina não foi capaz prevenir o ganho de peso durante o tratamento com ração com alto teor de gordura; sugerindo, portanto,o envolvimento de outros fatores no controle do comportamento alimentar durante a obesidade induzida pela dieta.

Já, sobre o controle glicêmico, observamos que a deleção de SOCS3 foi capaz de modular esta variável fisiológica em ambas condições experimentas estudadas. Embora este fator seja encarado de maneira positiva na obesidade, a dificuldade em controlar a homeostase glicêmica em uma situação de jejum prolongado pode, sem dúvida, comprometer a integridade do animal, já que, nesta condição, a manutenção da glicemia torna-se primordial para a sobrevivência do organismo.

Além disso, nossos resultados demonstram o potente efeito da leptina como um modulador do sistema nervoso autonômico. Nós demonstramos aqui que animais sensíveis à leptina apresentam alteração na atividade do sistema nervoso simpático,o que pode causar efeitos deletérios em longo prazo, como vistonas funções cardiovasculares.

Por fim, apesar de a obesidade e a dificuldade emcontrolar de peso corporalserem atualmente uns dos principais problemas mundiais a serem combatido, são necessários mais estudos para esclarecer os reais benefícios de futuros fármacos que aumentem a sensibilidade da leptina para o tratamento dessas desordens. Não só olhando sobre seu efeito no controle alimentar, mas também para diversas outras variáveis fisiológicas controladas pela leptina.

7 CONCLUSÃO

Baseados em nossos resultados, podemos concluir que a ablação do gene SOCS3 em células que expressam o LepR não atenua o ganho de peso, mas promove melhora na sensibilidade àinsulinadurante a obesidade induzida pela dieta.

Também podemos aferir que o aumento da sensibilidade àleptina preveniu o ganho de peso após período de restrição alimentar. Entretanto, a deleção parcial do gene SOCS3 comprometeu a capacidade dos animais em manter a glicemia, particularmente por meio do sistema nervoso simpático.

Além disso, como possíveis efeitos colaterais relacionados ao aumento da sensibilidade à leptina em longo prazo, encontramos que a ablação do gene SOCS3 em células que expressam LepR promoveu menor capacidade cardiovascular e aumento de taxa de mortalidade ao longo do envelhecimento.

Assim, mais pesquisas devem ser desenvolvidas para elucidar não só os benefícios do aumento da sensibilidade à leptina no tratamento da obesidade e no reganho de peso, mas também os possíveis efeitos colaterais que esta estratégia terapêutica pode causar.

Os resultados da presente tese resultaram nas publicações dos seguintes artigos científicos:

PEDROSO, J.A., et al. Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity. **Molecular Metabolism**,v. 3, n. 6, p. 608-618, 2014.

PEDROSO, J.A., et al. Changes in leptin signaling bySOCS3modulate fasting-induced hyperphagia and weight regain in mice. **Endocrinology**.[no prelo].

REFERÊNCIAS*

ABBOTT, C.R., et al. Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. **Endocrinology**, v. 142, n. 8**,**p. 3457-3463, 2001.

ADRIAN, T.E., et al. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. **Gastroenterology**, v.89, n. 5, p. 1070-1077, 1985.

AHIMA, R.S., et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**, 382, n. 6588, p. 250-252, 1996.

AHMADI, N., et al. Effects of Intense Exercise and Moderate Caloric Restriction on Cardiovascular Risk Factors and Inflammation. **American Journal of Medicine**, v. 124, v. 10, p. 978-982, 2011.

ANDREELLI, F., et al. Liver adenosine monophosphate-activated kinase-alpha2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. **Endocrinology**, v. 147, n.5, p. 2432-2441, 2006.

ARONE, L.J., et al. Autonomic nervous system activity in weight gain and weight loss. **American Journal of Physiology**, v. 269, n. 1, Pt 2, p. R222-R225, 1995.

ASAKAWA, A., et al. Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. **Gastroenterology**, v. 124, n. 5, p. 1325-1336, 2003.

BAHIA, L., et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 12, p. 440, 2012.

BALDISSERA, F.G.; HOLST, J.J. Glucagon-related peptides in the human gastrointestinal mucosa. **Diabetologia**, v. 26, n. 3, p. 223-228, 1984.

BALLANTYNE, G.H. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part II. Changes after gastrointestinal surgery and bariatric surgery. **Obesity Surgery**, v. 16, n. 06, p. 795-803, 2006.

BATES, S.H., et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. **Nature**, v. 421, n. 6925, p. 856-859, 2003.

BATSIS, J.A., et al. Leptin, adiposity, and mortality: results from the National Health and Nutrition Examination Survey III, 1988 to 1994. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 4, p. 481-491, 2015.

---

*[*] De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências:elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BATTERHAM, R.L., et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 650-654, 2002.

BATTERHAM, R.L., et al., Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 10, p. 941-948, 2003a.

BATTERHAM, R.L., et al. Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 8, p. 3989-3992, 2003b.

BELTOWSKI, J., et al. Oxidative stress, nitric oxide production, and renal sodium handling in leptin-induced hypertension. **Life Sciences**, v. 74, n. 24, p. 2987-3000, 2004.

BENCE, K.K., et al. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. **Nature Medicine**, v. 12, n. 8, p. 917-924, 2006.

BERGLUND, E.D., et al. Regulation of endogenous glucose production in glucose transporter 4 over-expressing mice. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52355, 2012a.

BERGLUND, E.D., et al. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 1000-1009, 2012b.

BJORBAEK, C., et al., Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32686-32695, 1997.

BJORBAEK, C., et al. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, v. 7, p. 4747-4755, 2001.

BJORNTORP, P.; YANG, M.U. Refeeding after fasting in the rat: effects on body composition and food efficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 36, n. 3, p. 444-449, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. **Vigitel Brasil 2006: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. – Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. **Vigitel Brasil 2010: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRUNING, J.C., et al., Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science**, v. 289, n. 5487, p. 2122-2215, 2000.

CARO, J.F., et al.Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. **Lancet**, v.348, n. 9021, p. 159-161, 1996.

CHAN, J.L., et al. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. **Journal of Clinical Investigation**,v. 111, n. 9, p. 1409-1421, 2003.

CHENG, A., et al. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. **Developmental Cell**,v. 2, n. 4, p. 497-503, 2003.

CLEMENTI, A.H., et al.Deletion of interleukin-6 improves pyruvate tolerance without altering hepatic insulin signaling in the leptin receptor-deficient mouse. **Metabolism**,v. 60, n. 11, p. 1610-1619, 2011.

COHEN, M.A., et al.Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 10, p. 4696-4701, 2003.

COHEN, P., et al. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 8, p. 1113-1121, 2001.

COLOMBO, C., et al. Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipoatrophy. **Diabetes**, v. 51, n.9, p. 2727-2733, 2002.

CORNIER, M. A. Is your brain to blame for weight regain?**Physiology & Behavior**, vol. 104, n, 4, p. 608-612, 2011.

CORREIA, M.L., et al. The concept of selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice. **Diabetes**,v. 51, n. 2, p. 439-442, 2002.

CRUJEIRAS, A.B., et al.Weight Regain after a Diet-Induced Loss Is Predicted by Higher Baseline Leptin and Lower Ghrelin Plasma Levels. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 11, p. 5037-5044, 2010.

CUI, Y., et al.Essential role of STAT3 in body weight and glucose homeostasis. **Molecular and Cellular Biology**,v. 24, n. 1, p. 258-269, 2004.

CUMMINGS, D.E., et al.A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. **Diabetes**,v. 50, n. 8, p. 1714-1719, 2001.

CUMMINGS, D.E., et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 21, p. 1623-1630, 2002.

DA SILVA, R.P., et al. Leptin resistance is not the primary cause of weight gain associated with reduced sex hormone levels in female mice. **Endocrinology**, v. 155, n. 11, p. 4226-4236, 2014.

DAKIN, C.L., et al.Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. **Endocrinology**,v. 142, n. 10, p. 4244-4250, 2001.

DAKIN, C.L., et al. Repeated ICV administration of oxyntomodulin causes a greater reduction in body weight gain than in pair-fed rats. **American Journal of Physiology**, v. 283, n. 6, p. E1173-E1177, 2002.

DE LUCA, C., et al. Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3484-3493, 2005.

DEFALCO, J., et al.Virus-assisted mapping of neural inputs to a feeding center in the hypothalamus. **Science**, v. 291, n. 5513, p. 2608-2613, 2001.

DO CARMO, J.M., et al. Shp2 signaling in POMC neurons is important for leptin's actions on blood pressure, energy balance, and glucose regulation. **American Journal of Physiology**, v. 307, n.12, p. R1438-R1447, 2014.

DONATO, J.Jr., FRAZAO, R., ELIAS, C.F. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 7, p. 591-602, 2010.

EL-HASCHIMI, K., et al. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 12, p. 1827-1832, 2000.

ELIAS, C.F., et al.Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. **Neuron**, v. 23, n. 4, p. 775-786, 1999.

FARIAS, M.M.; CUEVAS, A.M.; RODRIGUEZ, F. Set-point theory and obesity. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 9, n. 2, p. 85-89, 2011.

FAROOQI, I.S.; O'RAHILLY, S. 20 years of leptin: human disorders of leptin action.**Journal of Endocrinology**, v. 223, n. 1, p. T63-70, 2014.

FLINT, A., et al. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 3, p. 515-20, 1998.

FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p.763-770, 1998.

FRUHBECK, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. **Biochemical Journal**, v. 393, Pt. 1, p. 7-20, 2006.

GAVRILOVA, O., et al. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 3, p. 271-278, 2000.

GERMAN, J., et al.Hypothalamic Leptin Signaling Regulates Insulin Sensitivity Via a Neurocircuit Involving the Hepatic Vagus Nerve. **Endocrinology**, v.150, n. 10, p. 4502-4511, 2009.

GERMAN, J.P., et al.Leptin deficiency causes insulin resistance induced by uncontrolled diabetes. **Diabetes**,v. 59, n.7,p. 1626-1634, 2010.

GHANAAT, F.; TAYEK, J.A. Growth hormone administration increases glucose production by preventing the expected decrease in glycogenolysis seen with fasting in healthy volunteers. **Metabolism**, v. 54, n.5, p. 604-609, 2005.

GIBBS, J.; YOUNG, R.C.; SMITH, G.P. Cholecystokinin decreases food intake in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 84, n. 3, p. 488-495, 1973.

GREGG, E. Obesity, diabetes, and the moving targets of healthy-years estimation. **Lancet Diabetes Endocrinology**, v. 3, n. 2, p. 93-94, 2015.

GUTZWILLER, J.P., et al. Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. **American Journal of Physiology**, v. 276, n. 5, Pt. 2, p. R1541-R1544, 1999a.

GUTZWILLER, J.P., et al. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. **Gut**,v. 44, n. 1, p. 81-86.1999b.

HAGAN, M.M., et al.Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 2362-2367,1999.

HALAAS, J.L., et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 543-546,1995.

HALAAS, J.L., et al. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 16, p. 8878-8883,1997.

HAMBLY, C., et al. Repletion of TNF alpha or leptin in calorically restricted mice suppresses post-restriction hyperphagia. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, p. 83-94,2012.

HAQUE, M.S., et al.Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. **Diabetes**, v. 48, n. 9, p. 1706-1712,1999.

HARRIS, R.B.S. Role of Set-Point Theory in Regulation of Body-Weight. **Faseb Journal**. v. 4, n. 15, p. 3310-3318,1990.

HAYNES, W.G., et al.Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. **Journal of Clinical Investigation**,v. 100, n. 2, p. 270-278,1997.

HIDAKA, S., et al. Chronic central leptin infusion restores hyperglycemia independent of food intake and insulin level in streptozotocin-induced diabetic rats. **Faseb Journal**, v. 16, n. 6, p. 509-518,2002.

HONG, Y. H., et al. Skeletal muscle glucose uptake during treadmill exercise in neuronal nitric oxide synthase-μ knockout mice.**American Journal of Physiology**, v. 10, n. 10, p. E838-E845, 2016.

HOWARD, J.K.; FLIER, J.S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 9, p. 365-371,2006.

HUO, L., et al. Leptin-dependent control of glucose balance and locomotor activity by POMC neurons. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 6, p. 537-547,2009.

JORGENSEN, S.B., et al.Deletion of skeletal muscle SOCS3 prevents insulin resistance in obesity. **Diabetes**, v. 62, n. 1, p. 56-64, 2013.

KIEVIT, P., et al. Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 2, p. 123-132,2006.

KLAMAN, L.D., et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 15, p. 5479-5489,2000.

KRISTENSEN, P., et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. **Nature**, v. 393, n. 6680, p. 72-76,1998.

KROL, E.; SPEAKMAN, J.R. Regulation of body mass and adiposity in the field vole, Microtus agrestis: a model of leptin resistance. **Journal of Endocrinology**, v. 192, n. 2, p. 271-278, 2007.

LARSON-MEYER, D.E., et al. Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects. **Diabetes Care**,v. 29, n. 6, p. 1337-1344,2006.

LE QUELLEC, A., et al.Oxyntomodulin-like immunoreactivity: diurnal profile of a new potential enterogastrone. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**,v. 74, n. 6, p. 1405-1409,1992.

LECOULTRE, V.; RAVUSSIN, E.; REDMAN, L.M. The Fall in Leptin Concentration Is a Major Determinant of the Metabolic Adaptation Induced by Caloric Restriction Independently of the Changes in Leptin Circadian Rhythms. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**,v. 96, n. 9, p. E1512-E1516,2011.

LEIBEL, R.L.;ROSENBAUM, M.;HIRSCH, J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 10, p. 621-628,1995.

LEONARD, W.J.;O'SHEA, J.J.;Jaks and STATs: biological implications. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 293-322,1998.

LI, R.L., et al. Profound hypoglycemia in starved, ghrelin-deficient mice is caused by decreased gluconeogenesis and reversed by lactate or fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 22, p.17942-17950,2012.

LIVAK, K. J.;SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MACLEAN, P.S., et al. Peripheral metabolic responses to prolonged weight reduction that promote rapid, efficient regain in obesity-prone rats. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 6, p. R1577-R1588, 2006.

MALAISSE-LAGAE, F., et al. Pancreatic polypeptide: a possible role in the regulation of food intake in the mouse. **Hypothesis Experientia**, v. 33, n. 7, p. 915-917, 1977.

MANN, T., et al. Medicare's search for effective obesity treatments: diets are not the answer. **American Psychologist**,v. 62, n. 3, p. 220-233,2007.

MARTIN, S.S.; QASIM, A.; REILLY, M.P. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 15,p. 1201-1210,2008.

MARTINEZ-MARTINEZ, E., et al. Leptin, a mediator of cardiac damage associated with obesity. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**,v. 18, n.1, p. 3-14,2014.

MCNAY, D.E., et al. Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. **Journal of Clinical Investigation**,v. 122, n.1, p.142-152,2012.

MEEK, T.H.; MORTON, G.J. Leptin, diabetes, and the brain. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16,Suppl. 3, p. S534-S542,2012.

MENTLEIN, R.; GALLWITZ, B.; SCHMIDT, W.E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. **European Journal of Biochemistry**,v. 214, n. 3,p. 829-835,1993.

MINOKOSHI, Y., HAQUE, M.S., SHIMAZU, T. Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. **Diabetes**, v. 48, n. 2, p. 287-291,1999.

MIYAMOTO, L., et al.Leptin activates hepatic 5'-AMP-activated protein kinase through sympathetic nervous system and alpha1-adrenergic receptor: a potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin. **Journal of Biological Chemistry**,v. 287, n. 48, p. 40441-40447,2012.

MONTAGUE, C.T., et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature**, v. 387, n. 6636, p.903-908,1997.

MORAES, J.C., et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5045, 2009.

MOREIRA, M.C., et al. Does the sympathetic nervous system contribute to the pathophysiology of metabolic syndrome?.**Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 234, 2015.

MORI, H., et al. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. **Journal of Natural Medicines**,v. 10, n. 7, p. 739-743,2004.

MORTON, G.J., et al. Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. **Cell Metabolism**,v. 2, n. 6, p. 411-420,2005.

MUNZBERG, H.;MYERS, M.G.Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. **Nature Neuroscience**,v. 8, n. 5, p. 566-570, 2005

MURPHY, K.G.;BLOOM, S.R. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 854-859,2006.

MYERS, M.G., et al. The Geometry of Leptin Action in the Brain: More Complicated Than a Simple ARC. **Cell Metabolism**,v. 9, n. 2, p. 117-123,2009.

NASLUND, E., et al. Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in obese men. **International Journal Of Obesity And Related Metabolic Disorders**, v. 23, n. 3, p. 304-311,1999.

NEARY, N.M., et al. Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2832-2836, 2004.

OLIVEIRA-SALES, E.B., et al. Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 183, p. 23-29,2014.

OZATA, M.;OZDEMIR, I.C.;LICINIO, J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 10, p. 3686-3695,1999.

PAOLISSO, G., et al. Plasma leptin concentrations and cardiac autonomic nervous system in healthy subjects with different body weights. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**,v. 85, n. 5, p. 1810-1814,2000.

PARATI, G.; ESLER, M. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. **European Heart Journal**, v. 33, n. 9, p. 1058-1066, 2012.

PELL, J.M.; BATES, P.C. The nutritional regulation of growth hormone action. **Nutrition Research**, v. 3, p. 163-192,1990.

PICARDI, P.K., et al. Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. **Endocrinology**,v. 149, n. 8, p. 3870-3880,2008.

POCAI, A., et al.Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance. **Diabetes**,v. 54, n. 11, p. 3182-3189,2005.

PURDHAM, D.M., et al. Rat heart is a site of leptin production and action. **American Journal of Physiology**,v. 287, n. 6, p. H2877-H2884,2004.

PURKAYASTHA, S., et al. Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 7, p. 2939-2944,2011.

REDMAN, L.M., et al. Metabolic and behavioral compensations in response to caloric restriction: implications for the maintenance of weight loss. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4377, 2009.

REDMAN, L.M., et al.Effect of Caloric Restriction with and without Exercise on Metabolic Intermediates in Nonobese Men and Women. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**,v. 96, n. 2, p. E312-E321, 2011.

REED, A.S., et al.Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. **Diabetes**, v. 59, n. 4, p. 894-906, 2010.

RICCARDI, G.; GIACCO, R.; RIVELLESE, A.A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 447-456, 2004.

RODGERS, J.T.; PUIGSERVER, P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,v. 104, n. 31, p. 12861-12866, 2007.

RODRIGUES, B. et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovascular Diabetology**, v.6, p.1-7, 2007.

ROUSSO-NOORI, L., et al. Protein tyrosine phosphatase epsilon affects body weight by downregulating leptin signaling in a phosphorylation-dependent manner. **Cell Metabolism**,v. 13, n. 5, p. 562-572, 2011.

SCHMIDT, P.T., et al. A role for pancreatic polypeptide in the regulation of gastric emptying and short-term metabolic control. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 9, p. 5241-5246, 2005.

SCHWARTZ, M.W., et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-671, 2000.

SCOTT, M.M., et al.Leptin Targets in the Mouse Brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 514, n. 5, p. 518-532, 2009.

SEA, M.M., et al. Weight cycling-induced alteration in fatty acid metabolism. **American Journal of Physiology**, v. 279, n. 3, p. R1145-R1155, 2000.
SHI, Z.; LI, B.; BROOKS, V.L.Role of the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus in the Sympathoexcitatory Effects of Leptin. **Hypertension**, v. 66, n. 5, 1034-1041, 2015.

SOWDEN, G.L., et al. Oxyntomodulin increases intrinsic heart rate in mice independent of the glucagon-like peptide-1 receptor. **American Journal of Physiology**, v. 292, n. 2, p. R962-R970,2007.

SPEAKMAN, J.R.; STUBBS, R.J.; MERCER, J.G. Does body mass play a role in the regulation of food intake?.**Proceedings of the Nutrition Society**, 61, n. 4, p. 473-487,2002.

SU, T., et al. Expression change of SH2B1, SOCS3, PTP1B and NPY in mice hypothalamus and its relation with obesity. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 39, n. 1, p. 43-48,2014.

SUCAJTYS-SZULC, E., et al. Refeeding after prolonged food restriction differentially affects hypothalamic and adipose tissue leptin gene expression. **Neuropeptides**, v. 43, n. 4, p. 321-325, 2009.

SWINBURN, B.; EGGER, G.; RAZA, F. Dissecting obesogenic environments: the development and application of a framework for identifying and prioritizing environmental interventions for obesity. **Preventive Medicine**,v. 29, n. 6, Pt. 1, p. 563-570,1999.

TAN, Z.Y., et al.Chemoreceptor hypersensitivity, sympathetic excitation, and overexpression of ASIC and TASK channels before the onset of hypertension in SHR. **Circulation Research**, v. 106, n. 3, p. 536-545,2010.

TARTAGLIA, L.A., et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**,v. 83, n. 7, p. 1263-1271, 1995.

THALER, J.P., et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 1, p. 153-162,2012.

THORP, A.A.; SCHLAICH, M.P. Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, id. 341583, 2015.

TODD, J.F., et al. Subcutaneous glucagon-like peptide-1 improves postprandial glycaemic control over a 3-week period in patients with early type 2 diabetes. **Clinical Science**, v. 95, n. 3, p. 325-329,1998

TSCHOP, M.;SMILEY, D.L.;HEIMAN, M.L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v. 407, n. 6806, p.908-913,2000.

TURTON, M.D., et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 379, n. 6560, p. 69-72,1996.

VERDICH, C., et al. A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans. **Journal of Clinical Endocrinology &Metabolism**, v. 86, n. 9, p. 4382-4389,2001.

WEST, D.B.; FEY, D.; WOODS, S.C. Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. **American Journal of Physiology**, v. 246, n. 5, Pt. 2, p. R776-R787, 1984.

WHO - World Health Oganization. **Cardiovascular diseases** [Fact sheet nº. 317].2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>. Acesso em: 22 ago. 16.

WILLIAMS, K.W., et al. Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 7, p. 2472-2479, 2010.

WOODS, S.C., et al.Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. **Nature**, v. 282, n. 5738, p.503-505, 1979.

WREN, A.M., et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 12, p. 5992,2001a.

WREN, A.M., et al. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. **Diabetes**,v. 50, n. 11, p. 2540-2547,2001b.

WYNNE, K., et al. Subcutaneous oxyntomodulin reduces body weight in overweight and obese subjects: a double-blind, randomized, controlled trial. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2390-2395, 2005.

XU, A.W., et al. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 4, p. 951-958, 2005.

YASUKAWA, H., et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. **EMBO Journal**, v. 18, n. 5, p. 1309-1320, 1999.

YU, Y., et al. Differential expression of hypothalamic CART mRNA in response to body weight change following different dietary interventions. **Neurochemistry International**. v. 52, n. 8, p. 1422-1430, 2008.

ZABOLOTNY, J.M., et al. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. **Developmental Cell**, v. 2, n. 4, p. 489-495, 2002.

ZHANG, E.E., et al. Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 45, p. 16064-16069,2004.

ZHANG, R., et al. Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight. **Endocrinology**, v. 149, n. 11, p. 5654-5661,2008a.

ZHANG, X., et al. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell Metabolism**,v. 135, n. 1, p. 61-73,2008b.

ZHANG, Y.; Scarpace, P.J. The role of leptin in leptin resistance and obesity. **Physiology & Behavior**, v. 88, n. 3, p. 249-256,2006.

ZHANG, Y.Y., et al. Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homolog. **Nature**, v. 372, n. 6505, p.425-432,1994.

ZHAO, T.J., et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 16, p. 7467-7472,2010.

ZIOTOPOULOU, M., et al. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. **American Journal of Physiology**, v. 279, n. 4, p. E838-E845, 2000.

ZORRILLA, E.P., et al. Vaccination against weight gain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,v. 103, n. 35, p. 13226-13231, 2006.

APÊNDICE

A - Artigo 1 -Reviewing the Effects of L-Leucine Supplementation in the Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Glucose Homeostasis.

PEDROSO J.A.; ZAMPIERI T.T; DONATO, J.Jr. Reviewing the Effects of L-Leucine Supplementation in the Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Glucose Homeostasis. **Nutrients**, v. 7, n. 5, p. 3914-3975, 2015.DOI: 10.3390/nu7053914.
Fator de impacto JCR (2014): 4,064

Abstract: Leucine is a well-known activator of the mammalian target of rapamycin (mTOR). Because mTOR signaling regulates several aspects of metabolism, the potential of leucine as a dietary supplement for treating obesity and diabetes mellitus has been investigated. The objective of the present review was to summarize and discuss the available evidence regarding the mechanisms and the effects of leucine supplementation on the regulation of food intake, energy balance, and glucose homeostasis. Based on the available evidence, we conclude that although central leucine injection decreases food intake, this effect is not well reproduced when leucine is provided as a dietary supplement. Consequently, no robust evidence indicates that oral leucine supplementation significantly affects food intake, although several studies have shown that leucine supplementation may help to decrease body adiposity in specific conditions. However, more studies are necessary to assess the effects of leucine supplementation in already-obese subjects. Finally, although several studies have found that leucine supplementation improves glucose homeostasis, the underlying mechanisms involved in these potential beneficial effects remain unknown and may be partially dependent on weight loss.

B - Artigo 2 - Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats.

PEDROSO, J.A; NISHIMURA, L.S.; DE MATOS-NETO, E.M.; DONATO, J.Jr.; TIRAPEGUI, J.O. Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats. **Cell Biochemistry and Function Journal**, v. 32, n. 4, p. 326-332, 2013.DOI: 10.1002/cbf.3017.
Fator de impacto JCR (2014): 2,016

Abstract: Several studies have highlighted the potential of leucine supplementation for the treatment of metabolic diseases including type 2 diabetes and obesity. Caloric restriction is a common approach to improve the health in diabetic and obese subjects. However, very few studies assessed the effects of leucine supplementation in calorie-restricted animals. Rats were subjected to a 30% calorie-restricted diet for 6 weeks to study the effects of leucine supplementation on protein status markers and lipid metabolism. Caloric restriction reduced the body weight. However, increased leucine intake preserved body lean mass and protein mass and improved protein anabolism as indicated by the increased circulating levels of albumin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and the liver expression of albumin and IGF-1 messenger RNA. Leucine supplementation also increased the circulating levels of interleukin-6 and leptin but did not affect the tumour necrosis factor-α and monocyte chemotactic protein-1 concentrations. Ketone bodies were increased in rats consuming a leucine-rich diet, but we observed no changes in cholesterol or triglycerides concentrations. Caloric restriction reduced the liver expression of peroxisome proliferator

activated receptor-α and glucose-6-phosphatase, whereas leucine supplementation increased the liver expression of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMG-CoA) reductase and sterol regulatory element-binding transcription factor 1. A leucine-rich diet during caloric restriction preserved whole body protein mass and improved markers of protein anabolism. In addition, leucine modulated the hepatic lipid metabolism. These results indicate that increased leucine intake may be useful in preventing excessive protein waste in conditions of large weight loss.
Keywords: IGF-1; albumin; branched-chain amino acids; caloric restriction; interleukin-6; supplementation

C - Artigo 3 - Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats.

ZAMPIERI, T.T.;**PEDROSO, J.A.**; FURIGO, I.C.; TIRAPEGUI, J.O; DONATO, J.Jr. Oral Leucine Supplementation Is Sensed by the Brain but neither Reduces Food Intake nor Induces an Anorectic Pattern of Gene Expression in the Hypothalamus. **Plos One**, v. 13, n.8, p. 12, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0084094.
Fator de impacto JCR (2014): 3,234

Abstract: Leucine activates the intracellular mammalian target of the rapamycin (mTOR) pathway, and hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. Although central infusion of leucine reduces food intake, it is still uncertain whether oral leucine supplementation is able to affect the hypothalamic circuits that control energy balance. We observed increased phosphorylation of p70s6k in the mouse hypothalamus after an acute oral gavage of leucine. We then assessed whether acute oral gavage of leucine induces the activation of neurons in several hypothalamic nuclei and in the brainstem. Leucine did not induce the expression of Fos in hypothalamic nuclei, but it increased the number of Fos-immunoreactive neurons in the area postrema. In addition, oral gavage of leucine acutely increased the 24 h food intake of mice. Nonetheless, chronic leucine supplementation in the drinking water did not change the food intake and the weight gain of ob/ob mice and of wild-type mice consuming a low- or a high-fat diet. We assessed the hypothalamic gene expression and observed that leucine supplementation increased the expression of enzymes (BCAT1, BCAT2 and BCKDK) that metabolize branched-chain amino acids. Despite these effects, leucine supplementation did not induce an anorectic pattern of gene expression in the hypothalamus. In conclusion, our data show that the brain is able to sense oral leucine intake. However, the food intake is not modified by chronic oral leucine supplementation. These results question the possible efficacy of leucine supplementation as an appetite suppressant to treat obesity.

D- Artigo 4-Leptin resistance is not the primary cause of weight gain associated with reduced sex hormone levels in female mice

DA SILVA, R.P.; ZAMPIERI, T.T.; **PEDROSO, J.A.**; NAGAISHI, V.S.; RAMOS-LOBO, A.M; FURIGO, I.C.; CÂMARA, N.O.; FRAZÃO, R.; DONATO, J.Jr. Leptin resistance is not the primary cause of weight gain associated with reduced sex hormone levels in female mice.**Endocrinology**, n. 155, v. 11, p. 226-236, 2014. DOI: 10.1210/en.2014-1276.
Fator de impacto JCR (2014): 4,159

Abstract: Several studies have shown that estrogens mimic leptin's effects on energy balance regulation. However, the findings regarding the consequences of reduced sex hormone levels on leptin sensitivity are divergent. In the present study, we employed different experimental paradigms to elucidate the interaction between estrogens, leptin, and energy balance regulation. We confirmed previous reports showing that ovariectomy caused a reduction in locomotor activity and energy expenditure leading mice to obesity and glucose intolerance. However, the acute and chronic anorexigenic effects of leptin were preserved in ovariectomized (OVX) mice despite their increased serum leptin levels. We studied hypothalamic gene expression at different time points after ovariectomy and observed that changes in the expression of genes involved in leptin resistance (suppressors of cytokine signaling and protein-tyrosine phosphatases) did not precede the early onset of obesity in OVX mice. On the contrary, reduced sex hormone levels caused an up-regulation of the long form of the leptin receptor (LepR), resulting in increased activation of leptin signaling pathways in OVX leptin-treated animals. The up-regulation of the LepR was observed in long-term OVX mice (30 d or 24 wk after ovariectomy) but not 7 days after the surgery. In addition, we observed a progressive decrease in the coexpression of LepR and estrogen receptor-α in the hypothalamus after the ovariectomy, resulting in a low percentage of dual-labeled cells in OVX mice. Taken together, our findings suggest that the weight gain caused by reduced sex hormone levels is not primarily caused by induction of a leptin-resistance state.

E - Artigo 5 - SOCS3 deficiency in leptin receptor expressing cells mitigates the development of pregnancy-induced metabolic changes.

ZAMPIERI, T.T.; RAMOS-LOBO, A.M.; FURIGO, I.C; **PEDROSO, J.A.**; BUONFIGLIO, D.C.; DONATO, J.Jr.SOCS3 deficiency in leptin receptor expressing cells mitigates the development of pregnancy-induced metabolic changes. **Molecular Metabolism**, v. 4, n. 3, p. 237-245. 2014. DOI: 10.1016/j.molmet.2014.12.005.
Fator de impacto JCR (2014):5,36

Abstract. Objetive: During pregnancy, women normally increase their food intake and body fat mass, and exhibit insulin resistance. However, an increasing number of women are developing metabolic imbalances during pregnancy, including excessive gestational weight gain and gestational diabetes mellitus. Despite the negative health impacts of pregnancy-induced metabolic imbalances, their molecular causes remain unclear. Therefore, the present study investigated the molecular mechanisms responsible for orchestrating the metabolic changes observed during pregnancy. Methods: Initially, we investigated the hypothalamic expression of key genes that could influence the energy balance and glucose homeostasis during pregnancy. Based on these results, we generated a conditional knockout mouse that lacks the suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) only in leptin receptor-expressing cells and studied these animals during pregnancy. Results: Among several genes involved in leptin resistance, only SOCS3 was increased in the hypothalamus of

pregnant mice. Remarkably, SOCS3 deletion from leptin receptor-expressing cells prevented pregnancy-induced hyperphagia, body fat accumulation as well as leptin and insulin resistance without affecting the ability of the females to carry their gestation to term. Additionally, we found that SOCS3 conditional deletion protected females against long-term postpartum fat retention and streptozotocin-induced gestational diabetes. Conclusions: Our study identified the increased hypothalamic expression of SOCS3 as a key mechanism responsible for triggering pregnancy-induced leptin resistance and metabolic adaptations. These findings not only help to explain a common phenomenon of the mammalian physiology, but it may also aid in the development of approaches to prevent and treat gestational metabolic imbalances. Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin.

F - Artigo 6 - Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin.

FURIGO I.C. KIM, K.W.; NAGAISHI, V.S.; RAMOS-LOBO, A.M.; ALENCAR, A.;**PEDROSO, J.A.**; METZGER, M.; DONATO, J.Jr.Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. **Brain Research**, v. 1566, p. 47-49, 2014. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.04.018.
Fator de impacto JCR (2014): 5,36

Abstract. Estrogens and prolactin share important target tissues, including the gonads, brain, liver, kidneys and some types of cancer cells. Herein, we sought anatomical and functional evidence of possible crosstalk between prolactin and estrogens in the mouse brain. First, we determined the distribution of prolactin-responsive neurons that express the estrogen receptor α (ERα). A large number of prolactin-induced pSTAT5-immunoreactive neurons expressing ERα mRNA were observed in several brain areas, including the anteroventral periventricular nucleus, medial preoptic nucleus, arcuate nucleus of the hypothalamus, ventrolateral subdivision of the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH), medial nucleus of the amygdala and nucleus of the solitary tract. However, although the medial preoptic area, periventricular nucleus of the hypothalamus, paraventricular nucleus of the hypothalamus, retrochiasmatic area, dorsomedial subdivision of the VMH, lateral hypothalamic area, dorsomedial nucleus of the hypothalamus and ventral premammillary nucleus contained significant numbers of prolactin-responsive neurons, these areas showed very few pSTAT5-immunoreactive cells expressing ERα mRNA. Second, we evaluated prolactin sensitivity in ovariectomized mice and observed that sex hormones are required for a normal responsiveness to prolactin as ovariectomized mice showed a lower number of prolactin-induced pSTAT5 immunoreactive neurons in all analyzed brain nuclei compared to gonad-intact females. In addition, we performed hypothalamic gene expression analyses to determine possible post-ovariectomy changes in components of prolactin signaling. We observed no significant changes in the mRNA expression of prolactin receptor, STAT5a or STAT5b. In summary, sex hormones exert a permissive role in maintaining the brain's prolactin sensitivity, most likely through post-transcriptional mechanisms.
Keywords: Behavior; Estradiol; Hypothalamus; Intracellular signaling; STAT5.

ANEXOS

A - Anexo 1

Interesse				(bp)
AgRP	NM_001271806.1	CTTTGGCGGAGGTGCTAGAT	AGGACTCGTGCAGCCTTACAC	75
NPY*	Mm03048253_m1	-	-	107
POMC	NM_001278581.1	GAGGCCACTGAACATCTTTGTC	GCAGAGGCAAAACAAGATTGG	253
PTP1B	NM_011201.3	GGCGTGGTCATGCTCAAC	GCCAATACTGGGCACATTTTAA	61
PTPN2	NM_008977.3	GTGATCCATTGCAGTGCG	TTCCATCAGAACAAGACAGGTAT	75
PTPRε*	Mm00448493_m1	-	-	68
SH2B1	NM_001081459.2	CCATGGTGTCTTCTTGGTAC	GTCCCTCCTCATTTAGTGAC	113
SOCS3*	Mm00545913_s1	-	-	76

B - Anexo 2- Anticorpos utilizados no *Western Blot*

anticorpo	fornecedor	nº de catálogo
SOCS3	Cell Signaling	#2923S
GAPDH	Santa Cruz	SC-25778
pIR β	Santa Cruz	SC-25103
pAKT (S473)	Cell Signaling	#3787S