UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

RAFAELA FADONI ALPONTI

**Aminopeptidase neutra, dipeptidil peptidase IV, CD13, CD26 e
Fos no hipotálamo e hipocampo de ratos com obesidade induzida por glutamato
monossódico e privados de alimento**

SÃO PAULO
2008

RAFAELA FADONI ALPONTI

**Aminopectidase neutra, dipeptidil peptidase IV, CD13, CD26 e
Fos no hipotálamo e hipocampo de ratos com obesidade induzida por glutamato
monossódico e privados de alimento**

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Neurociências e Comportamento
Área de Concentração: Neurociências e Comportamento
Orientador: Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira
Co-orientadora: Maria Inês Nogueira, Profa. Associada

SÃO PAULO
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Vendrame, Rafaela Fadoni Alponi

Aminopectase neutra, dipeptidil peptidase IV, CD13, CD26e Fos no hipotálamo e hipocampo de ratos com obesidade induzida por glutamato monossódico e privados de alimentos / Rafaela Faldoni Alponi Vendrame; orientador Paulo Flávio Silveira. --São Paulo, 2008.

168 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Obesidade 2. Peptídeos 3. Glutamatos 4. Sistema Nervoso Central I. Título.

RC628

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafaela Fadoni Alporti

Aminopeptidase neutra, dipeptidil peptidase IV, CD13, CD26 e Fos no hipotálamo e hipocampo de ratos com obesidade induzida por glutamato monossódico e privados de alimento.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Psicologia da Universidade de São Paulo para
a obtenção do grau de Mestre em
Neurociências e Comportamento

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha filha **Alice**, por ser a inspiração e o motivo pelo qual quero seguir adiante, procurando fazer sempre o melhor e ser exemplo a essa pequenina que ainda vai nascer.

Aos meus pais, **Ademir e Maria Terezinha**, por me ensinarem diariamente como conseguir entendimento e compreensão em minha caminhada. Por sempre acreditarem e confiarem em mim. Agradeço por excederem, sempre, minhas expectativas.

À minha querida irmã, **Letícia**, pelo amor existente em nossa relação. Por ser amiga, companheira e eterna para mim.

Ao meu amor, **Antonio Vendrame Filho**, por entender inúmeras vezes minha ausência. Por não me deixar desistir, fazendo com que as dificuldades fossem vistas como grande aprendizado. Pelo amor constante, pela paciência e, principalmente, por me mostrar que este dia chegaria com êxito.

Ao Prof. Dr. **Paulo Flávio Silveira**, por ter contribuído em muito do que sou hoje. Por ter me mostrado que a busca pelo conhecimento pode ser muito mais prazerosa do que imaginamos. Pela paciência, confiança, pelas conversas e também pelas merecidas broncas.

À Profa. Dra. **Maria Inês Nogueira**, por ter me acolhido de forma muito carinhosa desde o primeiro contato. Pelas palavras doces e sábias, e pela colaboração na realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me conceder uma vida maravilhosa, me permitir viver essa experiência e propiciar o convívio com pessoas tão iluminadas e especiais. Por todas as dificuldades impostas, as quais me fizeram valorizar ainda mais esse trabalho.

Ao meu amigo querido **Leonardo Zambotti Villela**, por sua paciência e carinho durante todos esses anos de convívio, por todas as discussões sobre esse trabalho e pelos “puxões de orelha”.

À querida amiga **Simone Cristina Yamasaki**, por todas as conversas e risadas, mas principalmente, pela capacidade de me tranquilizar durante a realização deste trabalho.

Aos amigos **Juliana Marton Barone** e **Valter Alegre**, muito queridos, que tornam o dia a dia no laboratório muito mais divertido.

Aos amigos **André Vieira** e **Vanessa Pereira**, os mais novos membros da nossa “família” do laboratório.

À **Camila Eduardo Marinho**, amiga querida, que tanto me ajudou, me aconselhou e torceu por mim.

À **Carolina Akkari Torres**, por compartilhar todos os momentos da sua vida e por permitir que os meus também fossem compartilhados. Pela maneira como sempre me incentivou e valorizou. E, principalmente, por me considerar uma verdadeira irmã.

Aos amigos **Camila Castellan**, **Paula Burckhardt**, **Vivian Konigame** e **Renato Pereira** por todas as conversas e risadas durante a transferência ou a corrida do blotting.

Aos amigos **Milene Schmidt Luna**, **Leandro de Magalhães** e **Gustavo Yuzo Ujikawa**, por tornarem o dia a dia e principalmente os almoços mais agradáveis durante esses anos.

Aos integrantes da Unidade de Inflamação, do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, **Cristina Maria Fernandes**, **Renata do Amaral Olivo**, **Marlos Sampaio**, **Márcio Matsubara**, **Sérgio Augusto de Lima**, **Pollyana Saito**, **Neide Galvão do Nascimento**, **Silvia Zamuner**, **Élbio Leiguez Júnior**, minha segunda “família”, por todo carinho, pelas risadas, conversas e auxílio nos experimentos.

Aos amigos queridos **Vanessa Moreira** e **Eduardo Purgatto**, dois anjos que apareceram na minha vida, pela disponibilidade e pelo dom de ajudar. Pela grande amizade e pelo apoio.

Aos novos e queridos amigos do Laboratório de Neurociência do ICB-III, **Luciano Gonçalves**, **Silvia Honda**, **Wilma Allemadi**, **Cleyton Rodrigo Sobrinho**, **Renata Vasconcelos**, **Renata Frazão Vanderlei Rocha**, **Leila Grussoni**, **Paula Ito** e **Luiz Fernando Takase**, por terem me acolhido de forma tão carinhosa, fazendo com que me sentisse a vontade. Por todos os “cafés” e risadas.

À **Joana Darc Carvalho Vieira** e **Sônia Geiger**, secretárias do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, pela dedicação e auxílio.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, **Wilson de Barros D Àvila, Wanda Regina Carrella da Silva (in memoriam), Maria Zelma da Silva, Maria Aparecida da Silva** e todos os demais que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa**, pelo auxílio financeiro e pela bolsa concedida.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo auxílio financeiro que tornou possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Programa de pós-graduação Neurociências e Comportamento** do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

RESUMO

ALPONTI, R.F. **Aminopectidase neutra, dipeptidil peptidase IV, CD13, CD26 e Fos no hipotálamo e hipocampo de ratos com obesidade induzida por glutamato monossódico e privados de alimento.** 2008. 168 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Alterações na atividade de peptidases no sistema nervoso central (SNC) de adictos a narcóticos, abstinentes dependentes de opióides, diabéticos e indivíduos com desequilíbrio hidrosalino, têm sido achados instigantes no contexto atual dos conhecimentos sobre o balanço energético. Neste sentido, são particularmente interessantes o fenômeno da proteólise irrestrita e o envolvimento de diversos peptídeos do SNC, especialmente no hipotálamo e hipocampo, como as incretinas, neuropeptídeo Y, peptídeo YY, peptídeos derivados da pro-opiomelanocortina (melanocortinas e beta-endorfinas), somatostatina, vasopressina e angiotensinas. O presente estudo avaliou a hipótese de que aminopectidases que têm alguns desses peptídeos como substratos, a aminopectidase neutra (APN) (sensível – PSA, e insensível – APM/CD13, à puromicina) e a dipeptidil peptidase IV (DPPIV/CD26) (sensível - DPPIV-DS, e insensível - DPPIV-DI à diprotina), poderiam relacionar-se com a obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG) e com o estado de privação alimentar. Foram analisadas as expressões gênica e protéica da CD13 e CD26, as atividades enzimáticas de PSA, APM, DPPIV-DS e DPPIV-DI em fração solúvel e de membrana solubilizada, a ativação celular (imuno-reatividade a Fos), a distribuição imuno-histoquímica regional de CD13 e CD26 no hipotálamo e hipocampo e as correlações entre atividades peptidásicas, massa corporal, índice de Lee, massa dos depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal, comprimento naso-anal e glicemia de ratos obesos MSG e normais, sob regime de privação ou alimentação normal. Comparativamente aos controles, os animais MSG apresentaram: (i) aumento da massa absoluta de gordura retroperitoneal, índice de Lee, expressão protéica CD13 membranal do hipocampo, expressão protéica policlonal CD26 membranal do hipotálamo, atividade DPPIV-DI e expressão protéica monoclonal CD26 membranal do hipocampo; e (ii) diminuição da massa corporal absoluta, comprimento naso-anal, expressão gênica de CD13, expressão protéica membranal de CD13, expressão protéica policlonal de CD26 solúvel e membranal, atividades PSA solúvel e DPPIV-DI solúvel e membranal hipotalâmicas e DPPIV-DS membranal do hipocampo. A privação de alimento também influencia alguns destes parâmetros. As correlações entre os parâmetros biométricos confirmaram características deste modelo de obesidade e adicionalmente sugeriram que a deficiência e a sobrecarga relativas de captação de glicose, respectivamente pela gordura periepididimal e retroperitoneal, poderiam estar associadas ao desenvolvimento do diabetes melito tipo 2 no obeso MSG. Confirmou-se a identidade da proteína CD13 com a atividade peptidásica APM. A DPPIV-DI foi identificada como a CD26 canônica. Em geral, o presente estudo evidenciou o envolvimento das atividades PSA, DPPIV-DI e -DS hipotalâmicas (mas não da APM) e das proteínas CD13 e CD26, na regulação endócrina do balanço energético (provavelmente via atuação sobre neuropeptídeo Y, somatostatina e opióides). No hipocampo, o padrão destas alterações foi compatível com efeito deletério sobre memória, aprendizado (PSA e APM) e comportamento emocional (DPPIV-DI e DS). CD13 e CD26 apresentaram ampla distribuição no hipotálamo, a qual, em condições normais, foi coincidente com a imuno-reatividade à Fos nos núcleos supraóptico, periventricular, retroquiasmático e arqueado. Nestas áreas, relacionadas ao controle do balanço energético, ocorreram alterações densitométricas da imuno-reatividade a CD13, CD26 e Fos em função da obesidade MSG e/ou da privação de alimento. Em suma, proteínas com atividades de aminopectidase neutra

ou dipeptidil peptidásica do tipo IV e/ou homólogas à CD13 ou CD26 são fatores fisiopatológicos e alvos farmacológicos potenciais de distúrbios do metabolismo energético.

Palavras-chaves: peptidases, peptídeos, obesidade, glutamato monossódico, restrição alimentar, Fos, sistema nervoso central

ABSTRACT

ALPONTI, R.F. Hypothalamic and hippocampal neutral aminopeptidase, dipeptidyl peptidase IV, CD13, CD26 and Fos in glutamate monosodium induced obesity and food deprivation in rats. 2008. 168 f. Dissertation (Master in Neurosciences and Behavior) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Alterations of peptidase activity levels in the central nervous system (CNS) in drug addicts, abstinent opioid-dependent, diabetic and subjects with disrupted hydrosaline equilibrium, have been arousing findings in the context of current knowledge about regulatory mechanisms of food intake and energy balance. In this sense, the involvement of leptin, ghrelin, insulin and other peptides in the CNS, including incretins, neuropeptide Y, peptide YY, pro-opiomelanocortins (melanocortins and β -endorphin), somatostatin and vasopressin, which are susceptible to hydrolysis by aminopeptidases (APs), mainly in the hypothalamus and hippocampus, are particularly interesting. The present work evaluated if aminopeptidase activities involved in the hydrolysis of these peptides, i.e. neutral AP (APN) (sensitive- or insensitive-puromycin AP, PSA or APM/CD13, respectively) and dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) (sensitive- or insensitive-diprotin dipeptidyl peptidase, DPPIV-DS or DPPIV-DI, respectively), are associated with monosodium glutamate (MSG) induced obesity and food deprivation. It was analysed the gene and protein expressions of CD13 and CD26, catalytic activities of PSA, APM, DPPIV-DS and DPPIV-DI in soluble and membrane-bound fractions, cellular activation (Fos immunoreactivity) and regional immunohistochemistry distribution of CD13 and CD26, in hypothalamus and hippocampus, and inter-relations among these peptidase activities, body mass, Lee index, mass of epididymal and retroperitoneal fat pad, naso-anal length and glycemia in normal and obese MSG rats under normal or deprived feeding regimens. Relative to control, MSG presented: (i) increased retroperitoneal mass, Lee index, CD13 protein expression in membrane-bound fraction of hippocampus, CD26 polyclonal protein expression in membrane-bound fraction of hypothalamus, DPPIV-DI activity and CD26 monoclonal protein expression in membrane-bound fraction of hippocampus; and (ii) reduction of body mass, naso-anal length, CD13 gene expression, CD13 protein expression in membrane-bound fraction, CD26 polyclonal protein expression in soluble and membrane-bound fraction, PSA activity in soluble fraction and DPPIV-DI activity in soluble and membrane-bound fractions of hypothalamus, and DPPIV-DS in membrane-bound fraction of hippocampus. Food deprivation also influenced some of these parameters. The correlations between biometric parameters confirmed the characteristics of this obesity model and further suggested that disability and overload on the uptake of glucose, respectively by the epididymal and retroperitoneal fat, could be linked to the development of diabetes mellitus type 2 in obese MSG. CD13 protein identity with APM peptidase activity was confirmed. DPPIV-DI was identified as the canonical CD26 protein. In general, the present work revealed the involvement of PSA, DPPIV-DI and DS hypothalamic activities (but not the APM) and the CD13 and CD26 proteins, in endocrine regulation of energy balance (probably through action on neuropeptide Y, somatostatin and opioids). In the hippocampus, the patterns of these changes were consistent with deleterious effects on memory, learning (PSA and APM) and emotional behavior (DPPIV-DI and DS). CD13 and CD26 presented wide distribution in hypothalamus, which, in normal conditions, is coincident with Fos immunoreactivity in the supraoptic, periventricular, retrochiasmatic and arcuate nuclei. In these areas, related to the control of energy balance, densitometric changes of CD13, CD26 and Fos immunoreactivity occurred according to the obesity MSG and/or food deprivation. Briefly, proteins presenting neutral aminopeptidase or dipeptidyl peptidase IV

activities and/or CD13 or CD26 homologous are physiopathological factors and potential pharmacological targets of energetic metabolism disturbances.

Key-words: peptidases, peptides, obesity, food restriction, Fos, monossodium glutamate, central nervous system

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
ADHD	transtorno do déficit de atenção/hiperatividade
AgRP	proteína relacionada ao gene “agouti”
AH	hipotálamo anterior
Ang	angiotensina
AP	aminopeptidase
APM	aminopeptidase neutra de membrana insensível a puromicina
APN	aminopeptidase neutra
ArcNH	núcleo arqueado
AVP	vasopressina
BSA	albumina sérica bovina
C	grupo de animais controles normais
C-P	grupo de animais normais privados de alimento
CART	“cocaine and amphetamine-regulated transcript”
CCK	colecistocinina
CD13	grupo de diferenciação 13
CD26	grupo de diferenciação 26
CMD	quimiocina derivada de macrófago
CN-A	comprimento naso-anal do animal
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
DG	giro dentado hipocampal
DMH	núcleo hipotalâmico dorsomedial
DMSO	dimetil-sulfóxido
DPPIV	dipeptidil peptidase IV
DPPIV-DI	dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina
DPPIV-DS	dipeptidil peptidase IV sensível à diprotina
DTT	DL-ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	ensaio imunoenzimático
EPM	erro padrão da média
FM	fração de membrana solubilizada
FS	fração solúvel
GAL	galanina
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GH	hormônio do crescimento
GHRH	hormônio liberador do hormônio de crescimento
GIP	peptídeo insulínico dependente de insulina ou peptídeo inibidor gástrico
GLP1	peptídeo glucagon-símile tipo 1
GLP2	peptídeo glucagon-símile tipo 2
HC	hipocampo
HCRT	hipocretinas
HT	hipotálamo
IMC	índice de massa corporal
ip	intraperitônio
IRAPs	aminopeptidases reguladas por insulina
KPBS	tampão fosfato de potássio
LDH	desidrogenase láctica
LA	hipotálamo lateral anterior
LH	hipotálamo lateral
LRb	receptores de leptina
MC	massa corporal do animal
ME	eminência mediana
MHC	moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
MSG	ácido L-glutâmico sal monossódico ou grupo de animais tratados com ácido L-glutâmico sal monossódico (glutamato monossódico)
MSG-P	grupo de animais tratados com glutamato monossódico e privados de alimento
MSH	hormônio melanócito-estimulante
NADH	β -nicotinamida adenina di-nucleotídeo, forma reduzida
NPY	neuropeptídeo Y
NTS	núcleo do trato solitário
OX	orexinas
oxM	oxintomodulinas
Pe	núcleo periventricular hipotalâmico
PBS	tampão fosfato
POMC	pro- α -melanocortina
PP	polipeptídeo pancreático
PSA	aminopetidase neutra sensível a puromicina
PVN	núcleo paraventricular
PYY	peptídeo YY

RCh	núcleo retroquiasmático
RT-PCR	reação em cadeia de polimerase com a enzima transcriptase reversa
sc	subcutânea
SCh	núcleo supraquiasmático
SDS	sódio dodecil sulfato
SNC	sistema nervoso central
SO	núcleo supraóptico
SRIF	somatostatina
TGI	trato gastrointestinal
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
UP	picomoles de substrato hidrolisado por minuto
VMH	núcleo hipotalâmico ventromedial

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Principais peptídeos, relacionados com a regulação do metabolismo energético, susceptíveis de hidrólise pelas atividades de aminopeptidase neutra (APN) e dipeptidil peptidase IV (DPPIV).....37
- Tabela 2** - Massa corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, massa dos depósitos de gordura periepididimal e retroperitonal e glicemia de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....64
- Tabela 3** - Influência da adsorção em Bio-beads sobre a capacidade hidrolítica da fração de membrana solubilizada hipotalâmica e hipocampal sobre L-Ala- β -naftilamida (APN total) e H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida (DPPIV total).....67
- Tabela 4** - Efeito da puromicina (0,02 mM) sobre a hidrólise dos substratos L-Ala- β -naftilamida e H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida pelas frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) dos tecidos hipotalâmico e hipocampal e pelo plasma de animais controles normais.....70
- Tabela 5** - Efeito da diprotina A (0,1 mM) sobre as atividades de aminopeptidase neutra sensível (PSA) e insensível (APM) à puromicina e sobre a hidrólise do substrato H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida pelas frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) dos tecidos hipotalâmico e hipocampal e pelo plasma.....71
- Tabela 6** - Atividades (UP mg proteína⁻¹) de aminopeptidase neutra sensível (PSA) e insensível à puromicina (APM) e de dipeptidil peptidase IV sensível (DPPIV-DS) e insensível à diprotina (DPPIV-DI) em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) do hipotálamo de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....72
- Tabela 7** - Atividades (UP mg proteína⁻¹) de aminopeptidase neutra sensível (PSA) e insensível (APM) à puromicina e de dipeptidil peptidase IV sensível (DPPIV-DS) e insensível (DPPIV-DI) à diprotina em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) do hipocampo de animais controles normais (C), normais privado de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....73
- Tabela 8** - Atividades (UP mg proteína⁻¹) de aminopeptidase neutra sensível (PSA) e insensível (APM) à puromicina e de dipeptidil peptidase IV sensível (DPPIV-DS) e insensível (DPPIV-DI) à diprotina no plasma de animais controles normais (C), normais privado de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....74
- Tabela 9** - Análise de correlação linear combinatória pareada de todos os parâmetros sob estudo nos diferentes tratamentos.....77

Tabela 10 – Extensão dos núcleos analisados ao longo do eixo ântero-posterior. Os valores representam os níveis posteriores ao bregma.....	92
Tabela 11 – Densidade de CD13-ir no SNC de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....	93
Tabela 12 – Densidade de CD26-ir no SNC de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....	95
Tabela 13 – Densidade de Fos-ir no SNC de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....	99
Tabela 14 - Sumário das alterações encontradas nos parâmetros biométricos.....	103
Tabela 15 - Sumário das alterações encontradas para a aminopeptidase neutra hipotalâmica.....	110
Tabela 16 - Sumário das alterações encontradas para a aminopeptidase neutra hipocampal.....	113
Tabela 17 - Sumário das alterações encontradas para a aminopeptidase neutra plasmática.....	115
Tabela 18 - Sumário das alterações encontradas para a dipeptidil peptidase IV hipotalâmica.....	121
Tabela 19 - Sumário das alterações encontradas para a dipeptidil peptidase IV hipocampal.....	123
Tabela 20 - Sumário das alterações encontradas para a dipeptidil peptidase IV plasmática.....	125

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Delineamento experimental.....	47
Figura 2. Aparência do depósito de gordura periepididimal (em destaque) do animal tratado com MSG (similar ao do animal controle).....	65
Figura 3. Aparência do depósito de gordura retroperitoneal (em destaque) do animal controle (A) e do animal tratado com MSG (B).....	65
Figura 4. Atividade da desidrogenase láctica (média $\pm$ EPM) das frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) no hipotálamo (HT) e hipocampo (HC) do rato.....	66
Figura 5. CD26 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) (média $\pm$ EPM) quantificado por ELISA nas frações solúvel (FS) e de membrana (FM) do hipotálamo de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....	80
Figura 6. CD26 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) (média $\pm$ EPM) quantificado por ELISA nas frações solúvel (FS) e de membrana (FM) do hipocampo de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....	80
Figura 7. Análise de Western blotting da CD13 nas frações solúvel (FS) e de membrana (FM) do hipotálamo dos animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....	83
Figura 8. Análise de Western blotting da expressão da CD13 na fração de membrana (FM) do hipotálamo e hipocampo dos animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....	83
Figura 9. Análise de Western blotting da expressão da CD26 na fração solúvel (FS) do hipotálamo e hipocampo dos animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....	84
Figura 10. Análise de Western blotting da expressão da CD26 na fração de membrana (FM) do hipotálamo e hipocampo dos animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....	84
Figura 11. Visualização sob luz ultravioleta dos RNAs totais extraídos do hipotálamo (HT) e do hipocampo (HC) dos animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).....	86

Figura 12. Expressão do mRNA da CD13 no hipotálamo (HT) e hipocampo (HC) dos animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P), detectada por reação em cadeia de polimerase via transcrição reversa (RT-PCR).....87

Figura 13. Expressão do mRNA da CD26 no hipotálamo e hipocampo dos animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P), detectada por reação em cadeia de polimerase via transcrição reversa (RT-PCR).....88

Figura 14. Imuno-reatividade a CD13 (CD13-ir) observada em cortes coronais do encéfalo de rato.....94

Figura 15. Imuno-reatividade a CD26 (CD26-ir) observada em cortes coronais do encéfalo de rato.....96

Figura 16. Imuno-reatividade a CD26 (CD26-ir) observada em cortes coronais do encéfalo de rato.....97

Figura 17. Fotomicrografia de cortes coronais (40 um) do encéfalo de rato. Evidenciando neurônios Fos-ir considerados na contagem.....98

Figura 18. Imuno-reatividade a Fos (Fos-ir) observada em cortes coronais do encéfalo de rato.....100

Figura 19. Imuno-reatividade a Fos (Fos-ir) observada em cortes coronais do encéfalo de rato.....101

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Peptídeos na sinalização e controle do estado nutricional e balanço energético	23
1.2. Peptidases: APN/CD13 e DPPIV/CD26	31
1.2.1. Aminopeptidase neutra (APN)	33
1.2.2. DPPIV	34
1.3. Privação de alimento	39
1.4. Indução da obesidade pelo glutamato monossódico (MSG)	40
1.5. Atividade neuronal e glial e proteínas da família do gene c-fos	41
2. OBJETIVOS	43
2.1. Objetivo geral	43
2.2. Objetivos específicos	43
3. ESTRATÉGIAS	45
FIGURA 1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1. Animais e tratamentos	48
4.2. Parâmetros biométricos	49
4.3. Perfusão, retirada de sangue, obtenção e fixação do tecido encefálico	49
4.4. Preparação das frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM)	50
4.5. Medida da desidrogenase láctica (LDH)	51

	20
4.6. Proteína e glicemia -----	52
4.7. Quantificação fluorimétrica das peptidases -----	52
4.8. Ensaio imunoenzimático (ELISA) de CD26 -----	54
4.9. Western blotting de CD13 e CD26-----	54
4.10. Extração do RNA total e RT-PCR para CD13 e CD26 -----	55
4.10.1. Extração do RNA total -----	55
4.10.2. Análise do RNA total -----	56
4.10.3. RT-PCR -----	57
4.11. Histologia -----	58
4.11.1. Imuno-histoquímica de Fos, CD13 e CD26 -----	58
4.11.2. Coloração de Nissl-----	59
4.11.3. Microdensitometria da imuno-reatividade à Fos, CD13 e CD26-----	60
4.12. Análise estatística -----	60
5. RESULTADOS -----	62
5.1. Parâmetros biométricos e glicemia -----	62
5.2. Atividade da desidrogenase láctica -----	62
5.3. Atividades peptidásicas da FM adsorvida em Bio-beads -----	63
5.4. Atividades peptidásicas -----	68

5.5. Correlações entre os parâmetros biométricos, glicemia e atividades peptidásicas. -	75
5.6. ELISA de CD26 na FS e FM -----	79
5.7. Western blotting da CD13 e CD26 na FS e FM -----	81
5.8. Avaliação da qualidade do RNA -----	85
5.9. Expressão gênica da CD13 e CD26 -----	85
5.10. Distribuição imuno-histoquímica e alterações densitométricas de CD13, CD26 e Fos entre os diferentes tratamentos-----	89
6. DISCUSSÃO-----	102
6.1. Validação do procedimento de obtenção das frações solúvel e de membrana e interferência do Triton X-100 na quantificação das atividades peptidásicas em fração de membrana -----	102
6.2. Parâmetros biométricos e glicemia -----	103
6.3. Atividade catalítica e expressões protéica e gênica de aminopeptidase neutra sensível e insensível à puromicina, CD13, dipeptidil peptidase IV sensível e insensível à diprotina e CD26-----	106
6.3.1. Aminopeptidase neutra -----	109
6.3.1.1. Aminopeptidase neutra hipotalâmica -----	110
6.3.1.2. Aminopeptidase neutra hipocampal-----	113
6.3.1.3. Aminopeptidase neutra plasmática-----	115
6.3.1.4. Distribuição e análise densitométrica da imuno-reatividade a CD13 -----	117
6.3.2. Dipeptidil peptidase IV -----	119
6.3.2.1. Dipeptidil peptidase IV hipotalâmica -----	120

6.3.2.2. Dipeptidil peptidase IV hipocampal -----	123
6.3.2.3. Dipeptidil peptidase IV plasmática-----	125
6.3.2.4. Distribuição e análise densitométrica da imuno-reatividade a CD26 -----	126
6.3.3. Correlações entre as atividades enzimáticas da aminopeptidase neutra sensível e insensível à puromicina e dipeptidil peptidase IV sensível e insensível à diprotina A--	129
7. Distribuição e análise densitométrica da imuno-reatividade a CD26 -----	130
8. Aspectos comparativos da ativação neuronal e glial e da distribuição de CD13 e CD26 na obesidade induzida por MSG e na privação alimentar -----	131
9. Quadro geral dos resultados obtidos e implicações sugeridas -----	134
10. PERSPECTIVAS -----	135
11. CONCLUSÕES-----	136
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	138

1. INTRODUÇÃO

Considerando que concorrem para o balanço energético a proteólise irrestrita e uma ampla variedade de peptídeos do sistema nervoso central (SNC) susceptíveis de hidrólise pelas atividades de aminopeptidase neutra (APN) e de dipeptidil peptidase IV (DPPIV), o presente estudo foi conduzido com o objetivo de contribuir para a avaliação de alguns parâmetros biométricos e suas correlações na obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG) e na privação alimentar e, em especial, para evidenciar o envolvimento, nestas situações, de peptidases com atividades APN e DPPIV e da ativação celular no hipotálamo e hipocampo.

A obesidade, ou sobrepeso mórbido, é um estado metabólico em que excesso de gordura acumula-se nos tecidos periféricos, incluindo o tecido adiposo branco, músculos e fígado. Trata-se de patologia pandêmica e prototípica da conjunção de fatores causais biológicos e psicossociais. Desde a descoberta da leptina, o produto do gene *ob* (ZHANG et al. 1994), os estudos desta patologia convergem para a tentativa de evidenciar os substratos moleculares e sinalizadores metabólicos relacionados, principalmente, com a motivação para a ingestão de alimento. Atualmente, há evidências de que as alterações nas vias endócrinas e neurais implicadas na obesidade devem ser comuns a outros estados patológicos como a bulimia, a anorexia e a caquexia (INUI e MEGUID 2003, KLEIN e WALSH 2003, ZIGMAN e ELMQUIST 2003, WEISLO et al. 2004, ILLMAN et al. 2005).

1.1. Peptídeos na sinalização e controle do estado nutricional e balanço energético

Basicamente, duas teorias, a glicostática e a lipostática, foram propostas para explicar a interação entre periferia-SNC no controle do balanço energético. Essas teorias apoiam-se no fundamento de que fatores circulantes como a glicose (teoria glicostática) e os lipídeos (teoria lipostática) são gerados em proporção ao armazenamento de gordura e/ou estado nutricional. Esses fatores atuam como sinais para o SNC, elicitando mudanças na ingestão e no gasto energético, tendo, então, efeitos moduladores sobre a síntese e secreção de insulina e leptina (LAM et al. 2005, LÓPEZ et al. 2007). Na verdade, as evidências experimentais mostram que os mecanismos homeostáticos envolvidos nesta manutenção são variados e redundantes. No entanto, embora cada uma destas teorias não possa isoladamente explicar todos esses mecanismos, ambas evidenciam uma nítida convergência na consideração do hipotálamo (HT) como o centro regulador desses mecanismos (HORVATH 2005). O sensoramento do estado nutricional, a ingestão de alimento e o balanço energético são controlados, além do HT, por interações entre o tronco cerebral, centros corticais e, periféricamente, o estômago, intestino, fígado, tireóide e tecido adiposo (MARKUS 2005, NÄSLUND e HELLSTRÖM 2007). A hipótese do “centro dual” preconizava que o HT lateral (LH) seria um centro parassimpático relacionado à fome, oposto ao núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH), que seria simpático e relacionado à saciedade (BRAY 1984, WYNNE et al. 2005). Atualmente, sabe-se que a rede neural hipotalâmica envolvida nestas funções abrange o núcleo dorsomedial (DMH), o núcleo paraventricular (PVN) e o núcleo arqueado (ArcNH) (COTA et al. 2006). O PVN integra diversas vias de sinalização, inclusive vias aferentes de outras regiões do cérebro, incluindo o ArcNH e o núcleo do trato solitário (NTS), este último é a principal via de entrada de sinais vindos do trato gastrointestinal (TGI) (WYNNE et al. 2005, NÄSLUND e HELLSTRÖM 2007). O DMH recebe projeções do VMH, LH e ArcNH, e envia projeções ao PVN, o que sugere sua função como um centro integrador (BERNARDIS e BELLINGER 1998, WYNNE et al. 2005). O ArcNH é tido como o principal local de

influxo de sinais periféricos, mediando informações sobre necessidade e estoque metabólicos (NÄSLUND e HELLSTRÖM 2007). A ativação do eixo HT-hipófise-adrenal, na qual estão envolvidos aminoácidos (aa) excitatórios, é também reconhecida como responsável pelos efeitos deletérios da hipersecreção de glicocorticóides na obesidade e em patologias neurodegenerativas. Neste sentido, o hipocampo (HC) também se apresenta como uma região possivelmente relevante nestas patologias, já que concentra a maioria relativa dos receptores de glicocorticóides do SNC (RABER 1998).

Diferentes peptídeos exercem significativos efeitos no controle do estado nutricional e do balanço energético. Os sistemas peptidérgicos, proeminentemente viscerais, com reconhecido envolvimento neste controle, são, especialmente, a colecistocinina (CCK), as incretinas (peptídeo insulínico dependente de glicose – GIP, e os peptídeos glucagon-símbios tipos 1 e 2 - GLP-1 e GLP-2), oxintomodulinas (OXM) e grelina (WYNNE et al. 2005, WREN e BLOOM 2007). Estes peptídeos apresentam amplo repertório de efeitos, alguns dos quais mediados pelo SNC e outros diretamente induzidos por ação autócrina ou parácrina. No SNC, outros peptídeos apresentam o mesmo envolvimento, tais como o neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo YY (PYY), polipeptídeo pancreático (PP), galanina (GAL), orexinas ou hipocretinas (OX 1 e OX 2 ou HCRT 1 e HCRT 2), peptídeo CART, hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e os peptídeos derivados da pro-ópiomelanocortina (POMC) (melanocortinas e beta-endorfinas) (WYNNE et al. 2005, ARORA e ANUBHUTI 2006, DHILLO 2007). Embora não seja um sistema peptidérgico, aqui se inclui o sistema endocanabinóide, por seus efeitos relevantes sobre a fome e saciedade. Particularmente, no contexto do envolvimento dos opióides endógenos e dos endocanabinóides emerge, ainda, a similaridade entre alguns fatores neurobiológicos da adição às drogas e da obesidade (COTA et al. 2006). Entre outras características, a relação entre opióides e comportamento alimentar parece ser um aspecto conservado durante a história evolutiva, haja visto que a naloxana, antagonista opióide, inibe

a ingestão de alimento tanto em mamíferos, quanto em lesmas ou amebas (VOLKOW e WISE 2005).

A grelina, predominantemente produzida no estômago, é também encontrada centralmente, inclusive no HT (BROGLIO et al. 2003, WYNNE et al. 2005). Em indivíduos obesos, a grelina circulante apresenta-se em níveis mais baixos que em indivíduos magros, o que se supõe ser uma resposta secundária à superalimentação (NÄSLUND e HELLSTRÖM 2007). Têm sido detectados dois grupos distintos de células responsivas à leptina e grelina no ArcNH, um co-expressa POMC e CART e é anorexígena, enquanto a outra é orexígena e co-expressa NPY e proteína relacionada ao gene “agouti” (AgRP) (ZIGMAN e ELMQUIST 2003, WYNNE et al. 2005, ARORA e ANUBHUTI 2006). O GLP-1 e GLP-2, análogos do glucagon, e a OXM também têm sido encontrados no SNC, porém, até o momento, exclusivamente em pequenas populações de células nervosas no NTS, aparentemente a via neural relacionando o sistema sensorial visceral do tronco cerebral aos núcleos hipotalâmicos envolvidos na homeostase energética (LARSEN et al. 2003, WYNNE et al. 2005, ARORA e ANUBHUTI 2006).

O glucagon, o GLP-1 e o GLP-2 atuam sobre a ingestão de nutrientes, motilidade gastrointestinal, secreção pancreática, proliferação celular e apoptose, absorção e assimilação de nutrientes e estimulação da secreção de insulina através de diferentes membros de uma família específica de receptores acoplados à proteína G (BRUBAKER e DRUCKER 2002). Está bem estabelecido que o glucagon é secretado em resposta à deficiência de glicose, elevando o nível glicêmico circulante. Esta ação do glucagon ocorre pela ativação da glicogênio fosforilase e inibição da glicogênio sintase (RODRIGUEZ-GIL et al. 1989). Já o GLP-1 atua, entre outras coisas, na estimulação da expressão gênica da insulina, trofismo das células beta, inibição da secreção de glucagon e promoção da saciedade, os quais normalizam os níveis de glicose. Foi mostrado que o GLP-1 é rapidamente metabolizado por DPPIV,

resultando num metabólito antagonista do receptor do GLP-1 (KIEFFER et al. 1995, BAGGIO e DRUCKER 2007). Por isso, uma importante possibilidade farmacológica na terapêutica da obesidade, que já vem sendo aplicada para o diabetes melito tipo 2 (HOLST e DEACON 1998, POSPISILIK et al. 2003, BRANDT et al. 2005, GREEN et al. 2006, IDRIS e DONNELLY 2007, WAJCHENBERG 2007), refere-se ao uso dos inibidores da atividade DPPIV, também conhecidos como gliptinas (GREEN et al. 2007). Duas gliptinas começaram a ser comercializadas no Brasil em 2007: Galvus (Vildagliptina, desenvolvido pela Novartis) e Januvia (Sitagliptina, desenvolvido pela Merck Sharp & Dohme). Estudos clínicos mostram que, tanto o Galvus ([[(2S)-{[(3-hidroxiadamantan-1-il)amino]acetil}-pirrolidina-2-carbonitrila]) quanto o Januvia (7[(3R)-3-amino-1-oxo-4-(2,4,5-trifluorfenil)butil]-5,6,7,8-tetraidro-3-(trifluormetil)-1,2,4-triazol[4,3-a] pirazina (1:1), monoidratado, fosfato), quando administrados em pacientes com diabetes tipo 2, sob dieta controlada, promovem um aumento pós-prandial de GLP-1, concomitantemente com um decréscimo nos níveis de glicose e glucagon (GALLWITZ 2007b, HE et al. 2007). No entanto, o GIP (YIP e WOLFE 2000, MEIER et al. 2004), relacionado à superfamília do glucagon, também é susceptível de hidrólise pela DPPIV (KIEFFER et al. 1995, DEACON 2004, BAGGIO e DRUCKER 2007, GALLWITZ 2007a,b). GLP-1 e GIP respondem por aproximadamente metade da secreção de insulina estimulada por nutrientes (MEIER et al. 2004). O Januvia, além de promover o aumento dos níveis de GLP-1 em pacientes com diabetes tipo 2, também promove o aumento nos níveis de GIP (GALLWITZ 2007b). Porém, não foi explorada a relação da DPPIV com o GLP-1 e o GIP no que se refere a um possível envolvimento com a obesidade. Também, não está explorada a relação da DPPIV com a formação de PYY(3-36) a partir do PYY(1-36). Por outro lado, sabe-se que vários potenciais substratos da DPPIV estão relacionados com esquizofrenia, doença bipolar, ansiedade, depressão, epilepsia, estresse e dor, e que um inibidor (AMAC) da DPPIV apresenta efeitos antipsicóticos, em camundongo (LAUTAR et

al. 2005). Já foi sugerido, inclusive, que inibidores de DPPIV, ou análogos de endorfina resistentes à DPPIV, têm uso clínico potencial como analgésicos (SAKURADA et al. 2003). Vale mencionar que a saliva venenosa do lagarto *Heloderma horridum* (monstro de gila) também deu origem a um análogo (exenatide) do GLP-1, resistente à DPPIV, à venda desde o segundo semestre de 2007, pela Emi Lilly e Amylin Pharmaceuticals, com o nome comercial Byetta. Novos alvos moleculares para o tratamento da obesidade incluem esse sistema pré-pró-glucagon.

A leptina, uma proteína de 145 aa, tem sua produção regulada principalmente pela insulina (HAVEL 2000) e é secretada pelo tecido adiposo em proporção aos estoques de gordura. Após sua liberação, a leptina age central e periféricamente, sinalizando a saciedade, ligando-se aos seus receptores (LRb) (ZIGMAN e ELMQUIST 2003, KERSHAW e FLIER 2004, WYNNE et al. 2005). A leptina tem alguns efeitos sobre o metabolismo de glicose similares e outros opostos aos da insulina (ANDERWALD et al. 2002). Sabe-se que a leptina ativa os neurônios POMC/CART e inibe os neurônios NPY/AgRP (ZIGMAN e ELMQUIST 2003, WYNNE et al. 2005, ARORA e ANUBHUTI 2006). Os neurônios responsivos à leptina no ArcNH influenciam a atividade de outros centros efetores hipotalâmicos, como o PVN e o LH, além de afetarem neurônios do complexo dorsal do vago que contêm peptídeos orexígenos e anorexígenos, como as OX, a CCK e o GLP-1. Além disso, a leptina também exerce efeito sobre o apetite via tronco encefálico, atuando sobre seus receptores localizados no NTS (WYNNE et al. 2005). No entanto, a expectativa de intervenção no quadro da obesidade, com base em efeitos anorexígenos diretos da administração exógena de leptina, foi desestimulada pela constatação de que a maioria dos indivíduos obesos têm elevado nível de leptina e que esta não promove perda de apetite e massa corporal nestes indivíduos, ao contrário do que ocorre em indivíduos deficientes em leptina. Esta resistência à leptina vem sendo atribuída a mecanismos endócrinos de retroalimentação e ao papel de uma molécula

inibidora (SOCS3) das vias de sinalização dos receptores LRb (MÜNZBERG e MYERS 2005, WYNNE et al. 2005).

O NPY é um dos neuro-hormônios da família de polipeptídeos pancreáticos, a qual ainda tem como membros o PP e o PYY, todos eles possuindo uma cadeia de 36 aa e produzidos pela expressão de três genes distintos, mas compartilhando uma hélice estendida com três prolinas, "PP-fold", como propriedade característica da estrutura terciária. Os subtipos conhecidos de receptores para NPY e PYY são Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 e Y6 (GORRELL 2005, WYNNE et al. 2005, ARORA e ANUBHUTI 2006, CHEN et al. 2007). Enquanto a insulina age no SNC suprimindo a fome, o NPY tem efeito oposto. O NPY parece ser liberado somente de neurônios, enquanto o PP e o PYY têm sido encontrados, predominantemente, em células endócrinas do intestino (BERGLUND et al. 2003, KONTUREK et al. 2003). Sabe-se que o jejum decresce o nível plasmático de insulina e aumenta a síntese e liberação de NPY hipotalâmico, por meio de algum mecanismo dependente da diminuição dos níveis de insulina (SCHWARTZ et al. 1992, WILLIAMS et al. 2004, WYNNE et al. 2005, ARORA e ANUBHUTI 2006). Um crescente número de evidências indica que a grelina e o PYY sejam protagonistas fundamentais na regulação da fome e saciedade (ASAKAWA et al. 2003, FUNAHASHI et al. 2003, HORVATH et al. 2003, NEARY et al. 2003).

O PYY é assim denominado por possuir resíduos de tirosina (Y) na porção carboxi-terminal, tendo sido encontrado também no SNC (HAGAN 2002, BALLANTYNE 2006). Os baixos níveis de PYY e GLP-1 em indivíduos obesos poderiam induzir o descontrole da ingestão de alimento e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da obesidade. O PYY tem sido detectado endogenamente em duas formas, PYY(1-36) e PYY(3-36). O PYY(1-36) liga-se ao Y1 e Y2 com igual afinidade, enquanto o PYY(3-36) liga-se seletivamente ao Y2. O ArcNH expressa o subtipo Y2, pré-sináptico e o Y1, pós-sináptico (WYNNE et al. 2005). Então, a clivagem dipeptídica N-terminal transforma um agonista não seletivo Y, em outro

altamente seletivo para Y2, receptor principalmente pré-sináptico, e em um inibidor natural da liberação, por neurônios pré-sinápticos do ArcNH, de NPY (NÄSLUND e HELLSTRÖM 2007). Os receptores Y1 e Y2 diferenciam-se principalmente quanto a localização, o que justifica o fato de agonistas do receptor Y1 agirem como anisiolíticos, enquanto os agonistas de Y2 agem como anorexígenos (BERGLUND et al. 2003). Como o PYY tem uma prolina na penúltima posição, há poucas enzimas capazes de gerar PYY (3-36) a partir do PYY (1-36) e, entre aquelas avaliadas *in vitro*, a DPPIV é a que mostrou maior especificidade (GRANDT et al. 1993, BATTERHAM et al. 2003), restando avaliar se assim atuaria fisiologicamente.

Pouco se sabe sobre o envolvimento direto da somatostatina (SRIF), vasopressina (AVP) e angiotensinas (Ang) na obesidade. Está estabelecido que a SRIF inibe o hormônio do crescimento (GH) (FROHMAN et al. 1990). Periféricamente, a SRIF inibe a secreção e liberação de glucagon e insulina (STROWSKI et al. 2000). Sabe-se que a secreção espontânea de GH e sua resposta a diversos estímulos está reduzida em obesos (ISIDRO et al. 2004) e que a secreção de GH está aumentada na privação alimentar (NØRRELUND et al. 2002). Quanto a AVP, sabe-se que decresce a ingestão de alimento (BRAY 2000). Resistência à AVP ocorre em indivíduos com diabetes melito mal controlado, resultando em perda de volume plasmático (AOYAGI et al. 2007). Já a AngII está aumentada no plasma de obesos (SEGURA e RUILOPE 2007) e sabe-se que a conversão da AngII em AngIII resulta em estímulo para a liberação de AVP (ZINI et al. 1996). A AngII e seus metabólitos, como a AngIII (SPETH e KARAMYAN 2008), aumentam a lipogênese (JONES et al. 1997).

Alterações cinéticas influenciam substancialmente a ação de peptídeos (SONG e HEALY 1999). Por sua vez, alguns peptídeos alteram seu próprio metabolismo ou de outros peptídeos (HUI et al. 1982). Ainda, alguns dos efeitos farmacológicos da administração de peptídeos podem resultar da inibição competitiva sobre enzimas de degradação (inibindo a degradação de peptídeos endógenos) mais que da interação direta com um receptor (LaBELLA et al.

1985, BRACCI et al. 2003). Poucas proteases contribuem para a hidrólise peptídica completa até aa (KADOWAKI e KANAZAWA 2003), sendo as exopeptidases as principais enzimas capazes de liberar aa livres como produto final. Endo- e exopeptidases hidrolisam vários peptídeos envolvidos direta ou indiretamente no controle do estado nutricional e do balanço energético.

1.2. Peptidases: APN/CD13 e DPPIV/CD26

As enzimas capazes de romper ligações peptídicas são conhecidas indistintamente como peptidases ou proteases. Embora o termo protease seja amplamente empregado, o termo peptidase é recomendado para descrever o subconjunto de hidrolases de peptídeos (sub-classe E.C 3.4./ Int. Union of Biochem. Mol. Biol. - IUBMB).

As peptidases compreendem dois grupos de enzimas: endopeptidases e exopeptidases. As endopeptidases também são chamadas de proteinases (seu uso restringe-se às endopeptidases que clivam ligações internas em proteínas) ou oligopeptidases, quando clivam ligações internas exclusivamente em peptídeos.

As peptidases foram classificadas em conformidade com os tipos de catálise e de especificidade. Esta classificação pelos tipos catalíticos vem sendo ampliada pela classificação por famílias, com base no relacionamento evolutivo entre as peptidases (BARRETT et al. 1998). A classificação pela especificidade considera a posição da ligação peptídica clivada dentro da cadeia do peptídeo (ou proteína) e é adotada pela "Enzyme Nomenclature Commission", embora as carboxipeptidases e endopeptidases estejam

subdivididas pelo tipo de catálise. As exopeptidases clivam os peptídeos em regiões próximas ao N- ou C- terminal. As endopeptidases quebram ligações peptídicas no interior da cadeia.

Quanto à funcionalidade, as peptidases são capazes de ativar e/ou inativar hormônios, fatores de crescimento, transmissores e diferentes mediadores (MANTOVANI et al. 2000). Processos fisiopatológicos vêm sendo relacionados a alterações sutis no controle de atividades peptidásicas (VAN HAL et al. 1993, LAMBEIR et al. 2001, HATANAKA et al. 2002, LI et al. 2005); algumas estão envolvidas no controle do balanço hidromineral (SILVEIRA et al. 2004, MOLINARO et al. 2006), na adição a drogas (IRAZUSTA et al. 2003, de GORTARI et al. 2005, LARRINAGA et al. 2005) e no diabetes melito induzido por estreptozotocina (ZAMBOTTI-VILLELLA et al. 2007a, ZAMBOTTI-VILLELLA et al. 2007b, ZAMBOTTI-VILLELLA et al. 2008).

De um modo geral, peptídeos envolvidos com a sinalização intercelular são inicialmente degradados fora da célula, principalmente por peptidases unidas à membrana (O'CUINN 1998). Peptidases solúveis podem também atuar sobre peptídeos recaptados (internalizados como parte do complexo peptídeo-receptor, como no caso de alguns hormônio-peptídeos nas células-alvo) ou na hidrólise de pré-pró-peptídeos (GIBSON et al. 1989, HWANG et al. 2007). As vias citoplasmáticas são conhecidas por realizarem o metabolismo protéico e o processamento de peptídeos antigênicos (HEEMELS e PLOEGH 1995), este último fenômeno constituindo um tema de grande impacto (MURATA et al. 1999, PRECKEL et al. 1999, WICKNER et al. 1999, CALBO et al. 2000, KURIHARA et al. 2000, BHUTANI et al. 2007). Esses peptídeos são gerados ao lado dos produtos do metabolismo intracelular de proteínas, principalmente pela via da ubiquitina-proteasoma (HOCHSTRASSER 1996, VOGES et al. 1999, BHUTANI et al. 2007). A maioria dos oligopeptídeos formados pelo proteasoma é degradada com a contribuição de peptidases, gerando aa livres a serem usados em nova síntese protéica ou na produção de energia.

Dentre as exopeptidases, as APs (EC 3.4.), alfa-aminoacil-peptídeo-hidrolases, são aquelas que catalisam a remoção do extremo amino-terminal da cadeia peptídica. Desde sua primeira detecção (MARKS et al. 1968), diversas APs foram identificadas em tecido encefálico de mamíferos (O'CUINN 1998, GORRELL 2005, LARRINAGA et al. 2005, BJELKE et al. 2006).

1.2.1. Aminopeptidase neutra (APN)

A atividade APN catalisa a remoção de resíduos de aa neutros (SANDERINK et al. 1988, SHIPP e LOOK 1993). Essa atividade é reconhecida como um marcador importante de células da linhagem mielomonocítica em distúrbios hematopoiéticos malignos (ZIABER et al. 2000, ALFALAH et al. 2006) e foi descrita em uma grande variedade de outras células de mamíferos como idêntica à CD13 (LOOK et al. 1989, LOHN et al. 2002, CHEN et al. 2007). A atividade APN está envolvida no processamento de peptídeos relacionados ao MHC I e II (LARSEN et al. 1996) e clivagem de citocinas (COWBURN et al. 2006). Os substratos naturais conhecidos da APN incluem a interleucina-8, substância P, SRIF, AngIII, AVP, lisil-bradicinina e neuropeptídeos como a dinorfina, leu- e met- encefalina e endorfina (MIZUTANI et al. 1993, SAFAVI e HERSH 1995, PALTER et al. 2001, SONG e MARVIZON 2003, BAUVOIS e DAUZONNE 2006, LUAN e XU 2007). A APN purificada de placenta humana hidrolisa ativamente, in vitro, vários peptídeos imunomoduladores.

No SNC têm sido considerados dois tipos de atividades APN. Uma delas é sensível à puromicina (APN-PS ou PSA - EC 3.4.11.14) e está presente em frações solúvel e de membrana (MCDERMOTT et al. 1985, DYER et al. 1990, CONSTAM et al. 1995,

LARRINAGA et al. 2005). Neuropeptídeos que estão envolvidos diretamente no controle da homeostase energética, como a β -endorfina e as encefalinas, são substratos da PSA (APPLEYARD et al 2003, ARORA e ANUBHUTI 2006, COTA et al. 2006). Esses neuropeptídeos estão aumentados em indivíduos obesos, estimulando a ingestão de alimento (APPLEYARD et al 2003, ARORA e ANUBHUTI 2006, COTA et al. 2006). A outra atividade APN é predominantemente de membrana e insensível à puromicina (APN-PI ou APM - EC 3.4.11.2) (GIROS et al. 1986, LARRINAGA et al. 2005), a qual apresenta identidade com a CD13 (MAHONEY et al. 2007). A atividade PSA de membrana do SNC parece apresentar um direcionamento intracelular de seu sítio ativo (MCLELLAN et al. 1988). A atividade PSA solúvel, no córtex frontal de ratos administrados cronicamente com morfina, decresce depois da retirada da droga (IRAZUSTA et al. 2003), sendo que o mesmo decréscimo foi observado na avaliação postmortem de humanos adictos a heroína (LARRINAGA et al. 2005). Os vários peptídeos relacionados com a regulação do metabolismo energético, susceptíveis de hidrólise pela atividade APN, estão relacionados na Tabela 1.

1.2.2. DPPIV

A atividade DPPIV, nas formas solúvel (não classificada pelo "Enzyme Nomenclature Commission") e unida à membrana (EC 3.4.14.5), pertence ao grupo restrito de enzimas que, especificamente, reconhecem a prolina em peptídeos (CUNNINGHAM e O'CONNOR 1997, GORRELL 2005). Dada a sua estrutura cíclica peculiar, a prolina impõe restrições estruturais para degradação e confere propriedades biológicas particulares a peptídeos e proteínas nos

quais está presente. Dentre estas propriedades, está a proteção contra a degradação enzimática. A DPPIV remove dipeptídeos da porção N-terminal de peptídeos contendo Xaa-Pro ou Xaa-Ala (GILMARTIN e O'CUINN 1999, MENTLEIN 1999, ROSENBLUM e KOZARICH 2003, GORRELL 2005, BJELKE et al. 2006, UNNIAPPAN et al. 2006), sendo inativa sobre Xaa-Pro-Pro ou Xaa-Pro-Hyp (MENTLEIN 1999, GORRELL 2005). Dentre os peptídeos clivados *in vitro* pela DPPIV estão o GLP-1, GLP-2, GIP, PYY(1-36), NPY (1-36), a endorfina-2, dinorfina, substância P e o hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH) (MEDEIROS e TURNER 1994, MENTLEIN 1999, GHERSI et al. 2001, BATTERHAM et al 2002, GABRILOVAC et al. 2003, SAKURADA et al. 2003, SAKURADA 2004, GORRELL 2005, BJELKE et al. 2006, UNNIAPPAN et al. 2006). Um grande número de quimiocinas, citocinas e peptídeos sinalizadores também compartilham uma ligação Xaa-Pro altamente conservada na porção N-terminal (MAE et al. 1999). A DPPIV é a única enzima conhecida com a capacidade para clivar, em pH neutro, este N-terminal Xaa-Pro de quimiocinas como a CCL5 (RANTES), fator-1 derivado de estroma e quimiocina derivada de macrófago (CMD) (MANTOVANI et al. 2000). A forma membranal da DPPIV apresenta identidade com a CD26, sendo assim relacionada com a ativação de células T, ligando adenosina deaminase à superfície destas células e, então, protegendo-as da inibição de sua proliferação (PETHIYAGODA et al. 2000, GORRELL et al. 2001).

Apesar de ser intensamente estudada em vários outros sistemas (HILDEBRANDT et al. 2000), são escassas as informações sobre a atividade DPPIV no SNC (SMYTH e O'CUINN 1994, FRERKER et al. 2007). Quanto a sua funcionalidade no SNC, até o momento foi apenas sugerida sua relação com o controle da psicose e da dor (RONÁI et al. 1999, LAUTAR et al. 2005, SAKURADA et al. 2003). Atualmente, a DPPIV (a canônica EC 3.4.14.5, idêntica à serino protease membranal CD26) já não é a única proteína conhecida capaz de clivar dipeptídeos Xaa-Pro ou Xaa-Ala na porção N-terminal, já que outras

moléculas, exibindo vários graus de homologia estrutural e atividade similar à DPPIV, vêm sendo descobertas. As proteínas DPP2 (MAES et al. 2007), DPP6 (NADAL et al. 2003), DPP8, DPP9 (ABBOTT et al. 2000, OLSEN e WAGTMANN 2002, BJELKE et al. 2006, FRERKER et al. 2007) e DPP10 (QI et al. 2003, JERNG et al. 2004, 2005) são as formas relacionadas à DPPIV até aqui detectadas no SNC. A DPP2 possui baixa similaridade estrutural com a proteína DPPIV, porém possui atividade catalítica DPPIV, cuja eficiência diminui drasticamente quanto maior for o comprimento da cadeia peptídica do substrato (MAES et al. 2007). O sítio ativo de serina é substituído pela glicina na DPP10, resultando na perda de atividade DPPIV. O resíduo serina é também substituído na DPP6, a qual não apresenta atividade peptidásica. A DPP8 e a DPP9 possuem, respectivamente, sítios ativos 74% e 69% similares ao da DPPIV (Gly-Trp-Ser-Tyr-Gly) (QI et al. 2003, BJELKE et al. 2006, FRERKER et al. 2007). A DPP8 hidrolisa substratos da DPPIV como Ala-Pro, Arg-Pro and Gly-Pro. Contradizendo resultados prévios que sugeriram a inatividade enzimática da DPP9 (KIN et al. 2001), estudos recentes mostraram que a DPP9 tem atividade de DPPIV, com pH e sensibilidade a inibidores similares àquelas da DPPIV e DPP8 (QI et al. 2003, BJELKE et al. 2006, FRERKER et al. 2007). Os vários peptídeos relacionados com a regulação do metabolismo energético, susceptíveis de hidrólise pela atividade DPPIV, estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais peptídeos susceptíveis de hidrólise pelas atividades de aminopeptidase neutra (APN) e dipeptidil peptidase IV (DPPIV) e relacionados com a regulação do equilíbrio energético.

	Peptídeo	Localização		Função	
		SNC	Periférico	SNC (somente relacionada com o controle energético)	Periférico
APN	Vasopressina (BAVOUIS e DAUZONNE 2006, LUAN e XU 2007)	Neurônios magnocelulares do PVN e núcleo supraóptico (SO) e neuro-hipófise (KESSLER et al. 2007)	Plasma (KESSLER et al. 2007)	Modula a ingestão de alimento (BRAY 2000)	Vasoconstrição e antidiurese (KESSLER et al. 2007)
	Met- e Leu-encefalina (IRAZUSTA et al. 2003, LARRINAGA et al. 2005)	Neurônios do ArcNH e HC (SIMMONS e CHAYKIN 1996, ARORA e ANUBHUTI 2006, DRAKE et al. 2007)	Coração, músculo, rim e intestino (DENNING et al. 2008)	Modula o comportamento alimentar e processos de aprendizagem e memória (SIMMONS e CHAYKIN 1996, DRAKE et al. 2007)	Regulação cardíaca, dor e crescimento celular (DENNING et al. 2008)
	Somatostatina (MIZUTANI et al. 1993, MA et al. 2003)	Neurônios do PVN, ArcNH, HC e NTS (BURGOS-RAMOS et al. 2008)	Pâncreas, intestino e estômago	Modula a secreção de GH e a neuroproteção (BURGOS-RAMOS et al. 2008)	Modula a secreção de insulina e glucagon (STROWSKI et al. 2000)
	Angiotensina III (PADIA et al. 2008)	Neurônios de vários núcleos (BANEGAS et al. 2006)	Plasma e tecido adiposo (JONES et al. 1997)	Modula a vasopressina (ZINI et al. 1996) e controla a pressão sanguínea (BANEGAS et al. 2006) e a ingestão de água (BLUME et al. 2005)	Regula a lipogênese (JONES et al. 1997) e controla a pressão sanguínea (BANEGAS et al. 2006)

DPIV	Peptídeo glucagon-símile 1 (BURCELIN et al. 2007)	Neurônios do NTS (ARORA e ANUBHUTI 2006)	Pâncreas e intestino (ARORA e ANUBHUTI 2006)	Efeito anoréxico (ARORA e ANUBHUTI 2006)	Homeostase da glicose, esvaziamento gástrico, secreção da insulina e regulação da ingestão de alimento (ARORA e ANUBHUTI 2006)
	Neuropeptídeo Y (FRERKER et al. 2007)	Neurônios do ArcNH, PVN, interneurônios do HC (WYNNE et al. 2005)	Plasma	Modula a ingestão de alimento e influencia a depressão e a ansiedade (REDROBE et al. 2002, WYNNE et al. 2005)	Modula a ingestão de alimento
	Peptídeo YY (MEDEIROS e TURNER 1994)	Neurônios do NTS (GLAVAS et al. 2008)	Intestino e plasma (le ROUX e BLOOM 2005)	Efeito anoréxico (UENO et al. 2008)	Modula a ingestão de alimento e retardamento do esvaziamento gástrico (MEDEIROS e TURNER 1994, le ROUX e BLOOM 2005)
APN/DPIV	β -endorfina (FURUHASHI et al. 1988)	Neurônios do ArcNH e PVN (ARORA e ANUBHUTI 2006)	Plasma (OBUCHOWICZ e OBUCHOWICZ 1997)	Modula o comportamento alimentar (ARORA e ANUBHUTI 2006, COTA et al. 2006)	Modula o comportamento alimentar, o estresse e a analgesia (OBUCHOWICZ e OBUCHOWICZ 1997, JANSON e STEIN 2003, BILKEI-GORZO et al. 2008)

1.3. Privação de alimento

A privação de alimento, por períodos que variam entre 24 - 72 h, vem sendo aplicada experimentalmente, há quase duas décadas, para avaliar alterações de diversos fatores neuroendocrinológicos que interagem no balanço nutricional e energético, tendo sua eficiência amplamente comprovada, neste sentido, pelos resultados relatados em diversas publicações (CAGAMPANG et al. 1990, HIRSCHBERG et al. 1991, FRANKISH et al. 1993, SCHWARTZ et al. 1993, OLCHOVSKY et al. 1993, SUZUKI et al. 1995, PRESSE et al. 1996, ISHIKAWA et al. 1997, LOPEZ et al. 2000, FUJIKI et al. 2001, KASTIN et al. 2001, ZAMMARETTI et al. 2001, CHELIKANI et al. 2004, CRANE et al. 2007).

As respostas à privação alimentar são geralmente iniciadas por mudanças hormonais em resposta a diminuição dos níveis de glicose e aa na circulação (FINN e DICE 2006). Dentre as alterações hormonais ocorridas durante a privação alimentar estão a diminuição dos níveis de insulina e leptina, o aumento do glucagon (estímulo da gliconeogênese e da glicogenólise), do GH (estímulo da lipogênese) (SPIEGELMAN e FLIER 2001, FINN e DICE 2006) e da grelina (CAMIÑA *et al.* 2003). Uma das principais alterações durante a privação alimentar ocorre na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Há uma regulação negativa desse eixo, caracterizada pela diminuição da concentração plasmática de tireotrofina, um mecanismo adaptativo importante para conservação da energia durante períodos de escassez alimentar (BOELEN *et al.* 2008).

Durante a privação alimentar há aumento na proteólise e na lipólise, fornecendo aa, ácidos graxos e glicerol que serão utilizados na gliconeogênese e no metabolismo energético (KETTELHUT et al. 1994, FINN e DICE 2006). Sabe-se que o GH está relacionado a esses processos, porém não está claro de que forma esse hormônio atua (SAKHAROVA et al.

2008). Estão descritas algumas vias clássicas pelas quais ocorre a hidrólise de proteínas: a dependente de ATP (sistema ubiquitina-proteasoma, por exemplo); a lisossomal; e a independente de ATP (KETTELHUT et al. 1994), da qual fazem parte algumas proteases como a tripeptidil peptidase III (TPPIII), capaz de realizar algumas das funções do proteasoma (ANTÓN e VILLASEVIL 2008), bem como leucina aminopeptidase, cistil aminopeptidase, aminopeptidase básica e aminopeptidase neutra (SHIPP e LOOK 1993, MATSUI et al. 2006, DANZIGER 2008, HWANG e HOOK 2008).

O sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) é responsável pela hidrólise de proteínas do músculo esquelético durante a privação alimentar. Dentre seus substratos estão proteínas importantes para a progressão do ciclo celular, transcrição gênica e crescimento (FINN e DICE 2006). Quanto às vias lisossomais, existem duas que são superestimuladas durante a privação alimentar: a macroautofágica e a autofágica mediada por chaperonas. A macroautofagia ocorre principalmente durante um curto período de privação alimentar e consiste no seqüestro de uma porção do citosol que contém proteínas e/ou organelas pelo autofagossomo. O autofagossomo se funde com o endossomo, formando o anfisomo, o qual se funde com o lisossomo e adquire enzimas lisossomais que degradam os componentes internos. Na autofagia mediada por chaperonas, que ocorre durante períodos longos (a partir de 10 dias) de privação alimentar, os substratos desse sistema formam um complexo substrato/chaperona/cochaperona que se liga a um receptor na membrana lisossomal e, então, o substrato é internalizado e sofrerá ação de diversas enzimas lisossomais (FINN e DICE 2006).

1.4. Indução da obesidade pelo glutamato monossódico (MSG)

O HT desempenha papel central no controle da ingestão de alimento e homeostase energética. Está comprovado, também, que a destruição de centros hipotalâmicos específicos induz o que, classicamente, se definiu como obesidade hipotalâmica (BRAY et al. 1981, WYNNE et al. 2005). A administração neonatal de ácido L-glutâmico sal monossódico (glutamato monossódico - MSG) é reconhecida por produzir lesões no ArcNH e na ME (LEIGH et al. 1992, DOLNIKOFF et al. 2001). Após repetidas doses de MSG, os animais tornam-se obesos na vida adulta, segundo parâmetros biométricos como o índice de Lee (BERNARDIS e PATTERSON 1968, NAKAGAWA et al. 2000) e a medida de hipertrofia adipocítica (NEMEROFF et al. 1978, DOLNIKOFF et al. 2001). O índice de Lee é a razão entre a massa corporal e o comprimento naso-anal (BERNARDIS e PATTERSON 1968, NAKAGAWA et al. 2000). A hipertrofia adipocítica pode ser reconhecida por meio da medida de massa dos depósitos de gordura periepídídima e retroperitoneal (BERNARDIS e PATTERSON 1968, MACHO et al. 2000). Em relação aos animais normais, aqueles que recebem tratamento com MSG vêm sendo descritos como apresentando menor crescimento e massa corporal absolutos, enquanto são maiores os depósitos de gordura e a massa corporal relativamente ao tamanho (KAUFHOLD et al. 2002). Este modelo experimental de obesidade induzida por MSG é caracterizado pela ausência de hiperfagia (BUNYAN et al. 1976) e decréscimo da secreção de GH (BLOCH et al. 1984, SHAPIRO et al. 1986), bem como hiperinsulinemia (SCALLET e OLNEY 1986), corticosteronemia e leptinemia (PERELLO et al. 2004).

1.5. Atividade neuronal e glial e proteínas da família do gene c-fos

O monitoramento da expressão de proteínas da família do gene c-Fos tem sido consagrado como meio de avaliar uma ativação específica a diferentes estímulos. O proto-oncogene c-Fos pertence à família de genes que acoplam sinais intracelulares transitórios com alterações de longa duração na função neuronal, sendo expresso em múltiplas regiões do SNC (SHENG e GREENBERG 1990). Também outras células, inclusive gliais, expressam o proto-oncogene c-Fos (YU et al. 1995, STEINER et al. 2002). Em condições normais, sua expressão é reduzida, mas logo após um estímulo eficaz, sua expressão é rapidamente induzida (SAGAR et al. 1988, KRUKOFF 1993, JASMIN et al. 1994, ROWLAND et al. 1996, TRAUB et al. 1996, DINARDO e TRAVERS 1997). A proteína Fos, uma fosfo-proteína nuclear ligada ao DNA, é o produto da expressão do proto-oncogene c-Fos, o qual interage com outro gene de expressão precoce, c-Jun, para regular a transcrição gênica (KRUIJER et al. 1985, SAGAR et al. 1988, SHENG e GREENBERG 1990, MORGAN e CURRAN 1991). Como a proteína Fos é nuclear, técnicas de imuno-histoquímica irão corar apenas os núcleos das células ativadas. É conhecido que a atividade celular medida pela imuno-reatividade a Fos é afetada nos núcleos hipotalâmicos supramamilar e dorsomedial de camundongos obesos e na parte mediana do núcleo perifornical hipotalâmico de camundongos privados de alimento (HUANG e WANG 1998). Camundongos privados de alimento também apresentam ativação do ArcNH, porém esse efeito é revertido após re-alimentação (BECSKEI et al. 2008). Tanto animais magros quanto animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, quando privados de alimento por 24 horas, apresentam aumento de neurônios imuno-reativos a Fos no ArcNH e diminuição dessa imuno-reatividade no LH e DMH (LIN e HUANG 1999). Os animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, que não foram submetidos a privação alimentar, apresentam alterações na imuno-reatividade a Fos em importantes áreas do hipotálamo, como LH, DMH e núcleo perifornical hipotalâmico (LIN e HUANG 1999), aparentemente num padrão consistente com seus efeitos obesogênicos (WANG et al. 1999).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo pretende analisar alguns parâmetros biométricos e suas correlações na obesidade induzida por MSG e na privação alimentar e, em especial, evidenciar o envolvimento, nestas situações, das peptidases APN e DPPIV e da ativação hipotalâmica e hipocampal.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar se os parâmetros biométricos: massa corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, massa dos depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal e glicemia, bem como suas inter-relações, são modificados na obesidade induzida por MSG e na privação alimentar;
2. Avaliar se as atividades enzimáticas PSA, APM e DPPIV, em fração solúvel e de membrana de HT e HC, assim como a expressão gênica e protéica da CD13 e CD26, são alteradas na obesidade induzida por MSG e na privação alimentar;
3. Avaliar se as atividades enzimáticas PSA e APM, e DPPIV, em fração solúvel e de membrana de HT e HC, são correspondentes, respectivamente, as proteínas CD13 e CD26;
4. Avaliar a distribuição regional da imuno-reatividade à CD13 e CD26 no HT e no HC e se há alteração desta distribuição na obesidade induzida por MSG e na privação alimentar;

5. Avaliar se há alteração do padrão regional de ativação (imuno-reatividade à Fos) do HT e HC, na obesidade induzida por MSG e na privação alimentar;
6. Avaliar se há coincidências entre as alterações da ativação celular e da imuno-reatividade à CD13 e à CD26 na obesidade induzida por MSG e na privação alimentar.

3. ESTRATÉGIAS

1. Comparar as medidas de massa corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, massa dos depósitos de gordura periepídídima e retroperitoneal e glicemia nos animais tratados MSG, tratados com MSG e privados de alimentos e nos animais normais privados de alimento, relativamente aos animais controle normais;
2. Avaliar a eficácia do fracionamento para obtenção das frações solúvel e de membrana solubilizada dos tecidos hipotalâmico e hipocámpal, por meio da medida de atividade de desidrogenase láctica;
3. Determinar o teor protéico das frações solúvel e de membrana solubilizada dos tecidos hipotalâmico e hipocámpal;
4. Quantificar as atividades enzimáticas PSA, APM e DPPIV das frações solúvel e de membrana do HT e HC, utilizando substratos derivados de β -naftilamida, e caracterizá-las, utilizando os inibidores puromicina e diprotina A;
5. Comparar as atividades enzimáticas PSA, APM e DPPIV do HT e HC de animais tratados com MSG, tratados com MSG e privados de alimento e nos animais normais privados de alimento, em relação aos animais controles normais;
6. Quantificar, por ELISA, a concentração de CD26 nas frações solúvel e de membrana solubilizada do HT e HC nos animais tratados com MSG, tratados com MSG e privados de alimento e nos animais normais privados de alimento, relativamente aos animais controles normais;
7. Comparar a expressão protéica, por Western blotting, da CD13 e CD26 nos animais tratados com MSG, tratados com MSG e privados de alimento e nos animais normais privados de alimento, relativamente aos animais controles normais;

8. Comparar a expressão gênica, por reação de polimerase em cadeia com a enzima transcriptase reversa (RT-PCR), da CD13 e CD26 nos animais tratados com MSG, tratados com MSG e privados de alimento e nos animais normais privados de alimento, comparativamente aos animais controles normais;
9. Determinar e comparar, por imuno-histoquímica, a localização da CD13 e CD26 no HT e HC nos animais tratados com MSG, tratados com MSG e privados de alimento e nos animais normais privados de alimento, comparativamente aos animais controles normais;
10. Comparar a ativação do HT e HC, por meio da expressão imuno-histoquímica da proteína Fos nos animais tratados com MSG, tratados com MSG e privados de alimento e nos animais normais privados de alimento, relativamente aos animais controles normais.

Figura 1. Delineamento experimental

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e tratamentos

Ratos machos Wistar, de diferentes ninhadas, foram, imediatamente após o nascimento, misturados e colocados, cada 10 filhotes e uma mãe lactante, em uma caixa de polipropileno (comprimento x largura x altura 56×35×19 cm), com comida e água de torneira *ad libitum*, a qual foi alojada em uma estante ventilada (Alesco Ind. Com. Ltda, Brasil), sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($65 \pm 1\%$) e fotoperíodo 12:12 claro/escuro (início do período claro às 6:00 am).

Após 24 h do nascimento, os filhotes passaram a receber, diariamente, entre 7:30 – 9:00 h do período claro, injeção subcutânea (sc), na região cervical, em bolus, de 4 mg ácido L-glutâmico sal monossódico por g de massa corporal, num volume máximo de 0,2 mL de salina 0,9% (animais MSG), ou o mesmo volume de salina 0,9% (animais controles normais - C), até completarem 10 dias de idade. Aos 22 dias de idade os filhotes foram desmamados, retirando-se a fêmea lactante das caixas (KAUFHOLD et al. 2002). Aos 90 dias de idade os animais foram utilizados para os experimentos previstos.

A privação de alimento foi feita transferindo-se os animais, aos pares, para gaiolas para jejum, mantendo-os sem alimento e com água *ad libitum* durante 72 h, a partir das 7:30 – 9:00 h do período claro. Tais grupos foram denominados da seguinte forma: MSG-P, animais tratados com MSG e que, posteriormente, foram privados de alimento; e C-P, animais que receberam injeção subcutânea de salina 0,9% e que, posteriormente, foram privados de alimento.

Os animais e protocolos experimentais deste estudo estão em conformidade com a COBEA - BRASIL e foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Butantan sob o nº 291/06.

4.2. Parâmetros biométricos

Foram mensurados a massa corporal (g) (MC), comprimento naso-anal (cm) (CN-A), bem como a massa (g) dos depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal. O índice de Lee foi calculado pela equação $[MC^{0,33}(\text{em g})/CN-A(\text{cm})]$ (BERNARDIS & PATTERSON 1968, NAKAGAWA et al. 2000).

4.3. Perfusão, retirada de sangue, obtenção e fixação do tecido encefálico

Os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina (100 mg/mL) e cloridrato de xilazina (100 mg/mL) por injeção intraperitoneal (ip) de 0,2 mL/100 g MC entre 4:00 – 6:30 h durante a fase clara. Antes de prosseguir a perfusão, 3 mL de amostras individuais de sangue foram imediatamente obtidas do ventrículo esquerdo de cada rato, utilizando uma seringa heparinizada. Então, esta mesma agulha foi acoplada a uma cânula de polietileno, iniciando-se o lavado vascular, mediante a perfusão com solução 0,9% NaCl em 50 mM tampão fosfato, pH 7,4, 5 – 10 min, fluxo de 12 – 15 mL/min, rompendo-se, também, a aurícula direita, para permitir a drenagem do sangue e da solução de lavagem, assim eliminando o sangue e evitando a formação de coágulos. Subseqüentemente, a aorta

descendente foi clampeada para assegurar uma melhor perfusão das estruturas encefálicas. Este procedimento finaliza, nesta etapa, exceto para os animais destinados à imuno-histoquímica (três animais de cada grupo), os quais continuaram a ser perfundidos, por mais 5 - 10 min, sob mesmo fluxo, a 4°C, com solução fixadora composta de 4% de paraformaldeído em 4% de borato de sódio (borax), pH 9,5.

Após a perfusão, os animais foram decapitados em guilhotina e os encéfalos imediatamente retirados, para uso imediato nos procedimentos de imuno-histoquímica, Western blotting e RT-PCR, ou congelados em gelo seco e armazenados (no máximo por 10 dias) a – 80°C, até o uso nos ensaios de atividade enzimática e medida de proteína.

As amostras individuais de sangue dos animais foram imediatamente centrifugadas a 3.000 X g, a 4 °C, por 20 min (microcentrífuga H-240 Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltd, Twaian) para obtenção do plasma. O plasma foi armazenado a – 80°C, até o uso nos ensaios de atividade enzimática e teor protéico.

4.4. Preparação das frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM)

Após dissecação manual, os tecidos hipotalâmico e hipocampal foram imediatamente homogeneizados em 10 mM tampão Tris-HCl, pH 7,4, por 3 min a 800 rpm com homogeneizador (Tecnal modelo Te-099) com haste de teflon e potter de vidro e, então, ultracentrifugados (Hitachi model HIMAC CP60E) a 100.000 X g por 35 min. A razão de volume de tampão (mL) para massa úmida (g) foi de 4:1. Os sobrenadantes resultantes dessa ultracentrifugação (correspondentes a FS) foram usados para medir as atividades peptidásicas, teor protéico, atividade de desidrogenase láctica, ELISA e Western blotting. Para evitar

contaminação com a FS, o pellet resultante foi lavado três vezes com 10 mM tampão Tris-HCl, pH 7,4. Então, este pellet foi re-homogeneizado por 3 min a 800 rpm em 10 mM tampão Tris-HCl, pH 7,4, contendo 0,1% Triton X-100 e ultracentrifugado a 100.000 X g por 35 min. Os sobrenadantes assim obtidos (correspondentes a FM) foram usados para medir as atividades peptidásicas, teor protéico, atividade de desidrogenase láctica, ELISA e Western blotting.

Para avaliar a eventual influência do Triton X-100 nas atividades peptidásicas sob estudo na FM, pools desta fração do HT e HC de quatro animais controles normais, foram divididos em duas partes, uma adsorvida por 2 h com Bio-beads (100 mg/ml) e outra sem adsorver. Em ambas, foram medidas as atividades peptidásicas e o teor protéico.

Todos os passos acima descritos foram realizados a 4°C.

4.5. Medida da desidrogenase láctica (LDH)

Como marcador do procedimento de fracionamento descrito no item 4.4, determinou-se a atividade de LDH, pelo método de BERGMAYER e BRENT (1972), incubando-se 3 µL de FS ou FM, em triplicata, com 297 µL de NADH (β -nicotinamida adenina di-nucleotídeo, forma reduzida) dissolvida em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 1,6 mM de piruvato e 200 mM NaCl. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços (Corning, Co., USA), utilizando leitura dos incubados a 340 nm, nos tempos de 0 e 10 min, em espectrofotômetro leitor de microplaca Bio-Tek Power Wave X® (Bio-Tek Instruments, EUA). O decréscimo dos valores obtidos, em relação ao tempo zero, foram extrapolados pela comparação com a curva-padrão de NADH, dissolvido em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4,

contendo 200 mM NaCl. A atividade da LDH foi expressa em mmol de NADH oxidado/min/mg de proteína.

4.6. Proteína e glicemia

O teor protéico (homogenatos, FS e FM) foi medido a 630 nm, em triplicata, pelo kit Bio-Rad (BRADFORD 1976), usando espectrofotômetro leitor de microplaca Bio-Tek Power Wave X® e, como padrão, albumina sérica bovina (BSA) dissolvida no mesmo diluente da amostra.

A glicemia foi mensurada na segunda gota de sangue, obtida, sem pressionar, de discreto corte na ponta da cauda, no aparato Accu-Chek Advantage® (Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S/A).

4.7. Quantificação fluorimétrica das peptidases

As atividades peptidásicas foram quantificadas pela medida de liberação de 4-metoxi- β -naftilamina (para DPPIV) ou β -naftilamina (para a APN) (SILVEIRA et al. 2004). Essa liberação representa o resultado da incubação, por 30 min, 37°C, em microplacas, recicladas em lavadora ELX 50/8 (Bio-Tek, USA), de volumes entre 10 - 100 μ L de FS ou FM ou plasma, com volumes (suficientes para completar 300 μ L de volume total) de substratos previamente aquecidos e diluídos para 0,125 mM (APN), ou para 0,2 mM (DPPIV), em 0,05

M do tampão correspondente, contendo 0,1 mg/mL de BSA. O conteúdo de compostos de naftilamina foi estimado fluorimetricamente (fluorímetro leitor de microplaca Bio-Tek FL600FA) no comprimento de onda de 460/40 nm de emissão, com uma excitação de 360/40 nm. O maior valor do incubado, correspondente ao tempo zero, ou na ausência da amostra, foi descontado (branco) e a fluorescência relativa convertida em picomoles de β -naftilamina ou metoxi- β -naftilamina pela comparação com as respectivas curvas-padrão (β -naftilamina ou metoxi- β -naftilamina dissolvidas na mesma solução utilizada na incubação). As atividades peptidásicas foram expressas em picomoles de substrato hidrolisado por minuto (UP) por miligrama de proteína tendo, como pré-condição, a existência da relação linear do ensaio fluorimétrico em função do tempo de hidrólise e do conteúdo protéico. Como as medidas de atividade enzimática têm caráter comparativo, não foi considerada a possível interferência da degradação inespecífica durante a homogenização.

Os seguintes substratos e condições foram utilizados:

4.7.1. *APN*, L-Ala- β -naftilamida (solubilizada em 0,012 N HCl) em tampão fosfato, pH 7,4, contendo 1 mM DL-ditiotreitol (DTT) na presença e ausência de 0,02 mM de puromicina. Assim, duas atividades APN diferentes foram mensuradas: aquela resultante do ensaio na presença de puromicina (atividade insensível à puromicina *APM*) e aquela resultante da subtração dos valores obtidos na presença de puromicina, daqueles obtidos na ausência de puromicina (atividade sensível à puromicina *PSA*).

4.7.2. *DPPIV*, H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida (solubilizada em dimetil-sulfóxido [DMSO]) em tampão Tris-HCl, pH 8,3, na presença e na ausência de 0,1 mM de diprotina A. Assim duas atividades DPPIV diferentes foram mensuradas: aquela resultante do ensaio na presença de diprotina A (atividade insensível à diprotina A *DPPIV-DI*) e aquela resultante da

subtração dos valores obtidos na presença de diprotina A, daqueles obtidos na ausência de diprotina A (atividade sensível à diprotina A *DPPIV-DS*).

4.8. Ensaio imunoenzimático (ELISA) de CD26

A concentração de CD26 foi medida, espectrofotometricamente, a 450 nm, em duplicata, usando o kit Human sCD26 Elisa que utiliza anticorpo monoclonal contra CD26 (EC 3.4.14.5), em pools de FS e FM, do HT e HC, de quatro animais de cada tratamento, tendo como padrão a enzima CD26 humana purificada (que acompanha o kit) dissolvida no tampão de reação.

4.9. Western blotting de CD13 e CD26

As amostras de FS e FM do HT e HC (100 µg de proteína/poço) foram separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, otimizada para a separação de proteína na faixa de peso molecular da CD13 e CD26 (SCHÄGGER e VON JAGOW 1987). As porcentagens de poliacrilamida dos géis foram as seguintes: 10% para o gel de separação e 4% para o gel de empilhamento (stacking) (LAEMMLI 1970, KAWAI et al. 2003). Foram usados os padrões de massa molecular SDS-PAGE para análise das amostras por extrapolação.

As proteínas separadas foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose, por 1 h a 100 V. As membranas foram incubadas, por 1 h, em solução

bloqueadora e, por 1 h, com anti-CD13 policlonal de coelho (1:1.000 em solução bloqueadora), ou com anti-CD26 policlonal de coelho (1:2.500 em solução bloqueadora), ou com anti- β -actina (1:1.000 em solução bloqueadora). As membranas foram lavadas cinco vezes, por 5 min, com solução de lavagem (tampão fosfato, 0,2% de Tween-20) e incubadas, por 1 h, com anticorpo IgG anti-coelho, produzido em cabra, complexado à peroxidase de raiz forte (1:5.000 em solução bloqueadora). As membranas foram lavadas, por cinco ciclos de 5 min, com solução de lavagem (tampão fosfato, 0,2% de Tween-20). As membranas foram incubadas com 2 mL da solução de quimioluminescência (SuperSignal West Pico Trial Kit), por 3 min, a temperatura ambiente (20°C) e, depois, foram expostas ao filme (Kodak Biomax MS film, Z36300-6, Sigma), por 1 min.

As densidades das bandas imuno-reativas foram determinadas pelo densitômetro GS 700 (Bio Rad Laboratories, EUA) utilizando o programa de análise Molecular Analyst® (Bio Rad Laboratories, EUA) e normalizadas a partir das densidades das bandas de β -actina.

4.10. Extração do RNA total e RT-PCR para CD13 e CD26

4.10.1. Extração do RNA total

Imediatamente após a remoção, os tecidos hipotalâmico e hipocampal frescos foram macerados sobre gelo e homogeneizados a temperatura ambiente (20°C) com Trizol na proporção de 100:1 (mg de tecido: mL de Trizol) (homogeneizador Tecnal modelo Te-099) com haste de teflon e potter de vidro e, subseqüentemente, transferidos para um tubo de

polipropileno. Sequencialmente, 1 mL de clorofórmio foi adicionado para cada 0,5 mL de homogenato, misturando-se 20 vezes por inversão, após a adição do reagente. A suspensão final foi resfriada, por 8 min a 4°C e, posteriormente, centrifugada (Micro-centrífuga CT-14000R, Cientec, Brasil) a 12.000 X g, por 20 min, a 4°C. Após a centrifugação, observou-se a formação de três camadas: a superior, ou fase aquosa, composta por RNA; a intermediária, composta por DNA; e a inferior, ou fase fenol. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, misturada com 250 µL de álcool isopropílico e, depois, colocada a -80°C, por 1 h, para precipitação do RNA. A sedimentação foi realizada a 12.000 X g, por 15 min, e o pellet resultante foi dissolvido em 0,5 mL etanol 75%, homogeneizado e centrifugado a 8.500 X g, por 5 min, a 4°C. O sobrenadante resultante foi descartado, o pellet foi seco a temperatura de 20°C e ressuspensionado em 0,015 mL de água autoclavada. A suspensão foi homogeneizada, aquecida a 55°C, por 5 min, e armazenada a -80°C.

4.10.2. Análise do RNA total

O RNA total isolado foi quantificado espectrofotometricamente (espectrofotômetro Bio-Tek Power Wave X®) e avaliado, quanto à pureza, pela razão entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm. A qualidade do RNA total foi avaliada pela presença das bandas correspondentes ao RNA ribossomal 25S e 18S, obtidas na eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), preparado em tampão Tris/acetato de sódio/EDTA 1x, pH 8,0, sob voltagem constante (80 V), visualizadas por meio de coloração com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/ mL) sob luz ultravioleta.

4.10.3. RT-PCR

A transcrição reversa (RT) e a reação de polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas utilizando SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq. A síntese do cDNA foi feita a partir de RNA total (500 ng) (termociclador PerkinElmer 2400, PerkinElmer, EUA), em um ciclo a 55°C, por 20 min, e um ciclo a 94°C, por 2 min, para uma pré-desnaturação da fita. Para a amplificação por PCR foram realizados 30 ciclos: para APM/CD13 e para a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (controle) – 15 s a 94°C, 30 s a 55°C, 1 min a 72°C, seguido de uma extensão final a 72°C por 7 min; para CD26 - 15 s a 94°C, 30 s a 50°C, 1 min a 72°C, seguido de uma extensão final a 72°C por 7 min. Os primers utilizados foram:

1- CD26 de rato (EC 3.4.14.5)

CD26 sense - 5'-GCACAAGAGCTAATAACACCACT'-3',

CD26 anti-sense – 5'-TGAAGGAGAACTATGATGCCCAGAATG-3' (nº de acesso ao GenBank: NM_012789);

2- APM/CD13 de rato (EC 3.4.11.2)

APM/CD13 sense – 5'-GCCCATTCCGTATCTCAAAA-3',

APM/CD13 anti-sense – 5'-AAGTAGGCGAAGAGGGGTGT-3' (DRINGEN et al. 2001) (nº de acesso ao GenBank: NM_031012); e, como controle positivo, utilizamos o GAPDH, cujos primers foram: GAPDH sense – 5'-TTCAACGGCACAGTCAAGGC-3', GAPDH anti-sense – 5'-CACCAGCATCACCCATTG-3' (ALONSO et al. 2007) (nº de acesso ao GenBank: NM_017008).

As densidades das bandas foram determinadas pelo densitômetro GS 700 (Bio Rad Laboratories, EUA) utilizando o programa de análise Molecular Analyst® (Bio Rad Laboratories, EUA) e normalizadas a partir das densidades das bandas de GAPDH.

4.11. Histologia

Os encéfalos perfundidos e pré-fixados, conforme descrito no item 4.3., foram pós-fixados numa solução de paraformaldeído 4% contendo sacarose 20% (p/v), durante 4 h. Após esse período, foram armazenados em solução crioprotetora (tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,4, contendo sacarose 20% - KPBS) por mais 24 h. Então, os encéfalos foram crio-seccionados em cortes coronais de 40 µm de espessura (a partir do Bregma -1,32, no sentido rostro-caudal), utilizando-se criomicrotomo de congelamento (Leica SM 2000R, Leica, Alemanha). Cinco séries de cortes foram coletadas para cada animal, em placa de acrílico (25 poços, TPP, Suíça) com a solução anti-congelante (PBS 0,1 M, pH 7,4, contendo sacarose 20% e etilínoglicol) e armazenadas a -20°C. Três séries de cortes foram submetidas aos procedimentos discriminados a seguir:

4.11.1. Imuno-histoquímica de Fos, CD13 e CD26

Ao serem removidos da solução de KPBS, onde inicialmente ficaram armazenados, cortes coronais foram submetidos a três lavagens. Na primeira, foram lavados em nova solução KPBS (2 x 10 min); na segunda, com peróxido de hidrogênio 0,1% (1 x 10 min) e, na terceira, novamente em KPBS (2 x 10 min). Em seguida, foram incubados em soluções com anticorpos primários, produzidos em coelho, anti-c-Fos, ou anti-CD13, ou anti-CD26, por 48 h. Estas soluções compõe-se de KPBS, Triton X-100 (0,3% em KPBS), soro normal de cabra (3% em KPBS) e, respectivamente, anticorpo anti-Fos policlonal (1:10.000 em KPBS), ou anti-CD13

policlonal (1:1.000 em KPBS), ou anti-CD26 policlonal (1:1.000 em KPBS). Durante a incubação, os cortes permaneceram em microtubos de 1,5 mL, posicionados em agitador protegido da luz. Após a incubação, os cortes foram submetidos a lavagens em KPBS (2 x 10 min) e, posteriormente, incubados em solução com anticorpo secundário biotinilado, anti-coelho, produzido em cabra, por 60 min. Esta solução compõe-se de KPBS, Triton X-100 (0,3% em KPBS) e anticorpo secundário biotinilado (1:500 em KPBS). Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens com KPBS (2 x 10 min) e incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC Kit Vectastain Elite Standard) (diluídos em KPBS, 1:500), por 60 min. Depois, os cortes foram submetidos a lavagens com KPBS (2 x 10 min) e, em seguida, à reação de imunoperoxidase com solução de 3,3-diaminobenzidina (0,05% em KPBS) sulfato de níquel amônio (0,05% em KPBS) e peróxido de hidrogênio (0,01% em KPBS). Para neutralizar esta reação, os cortes foram submetidos a lavagens com KPBS (2 x 10 min).

Após montagem dos cortes em lâminas previamente cobertas com poli-L-lisina, estes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 95%-I, 95%-II, 100%-I, 100%-II, 100%-III, 3 min cada) e diafanizados em xilol (xilol-I, 3 min e xilol-II, 30 min). Após os processos de desidratação e diafinização, as lâminas foram recobertas com Eukitt e lamínula.

4.11.2. Coloração de Nissl

Cortes coronais foram submetidos ao processo de desidratação, iniciando-se com a água e, em seguida, por uma seqüência crescente de concentrações de etanol (50%, 70%, 95%-I,

95%-II - 3 min cada, 100%-I, 100%-II, 100%-III – 5 min cada) e diafanização em xilol (xilol-I, 5 min e xilol-II, 10 min). Em seguida, os cortes foram reidratados do xilol (xilol-II, 3 min) até a água, passando por imersões em concentrações decrescentes de etanol (100%-III, 100%-II, 100%-I – 3 min cada, 95%-II, 95%-I, 70%, 50% - 2 min cada). O procedimento seguinte foi a imersão em tionina (20 s), seguida de 4 mergulhos em água destilada, para retirada do excesso de corante. Os cortes foram desidratados novamente, da água até o xilol, 3 min em cada, para posterior montagem com Eukitt e lamínula.

4.11.3. Microdensitometria da imuno-reatividade à Fos, CD13 e CD26

A captura das imagens e as análises microdensitométricas (densidade populacional) dos cortes coronais foram realizadas com o microscópio Nikon Eclipse E-1000, equipado com a câmera digital CoolSNAP®, utilizando o programa Image-Pro-Plus 4.0® (Media Cybernetics). Os resultados quantitativos da expressão de Fos, CD13 e CD26 são referentes à frequência de estruturas coradas e não a concentrações absolutas destes compostos. A frequência de estruturas coradas foi obtida na área de cada núcleo analisado nos diferentes tratamentos, de acordo com o atlas do encéfalo de ratos (PAXINOS e WATSON 2007).

4.12. Análise estatística

Os dados quantitativos foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente usando os programas computacionais GraphPad InStat™, GraphPad Prism™ e Prism 3.0. A análise de regressão foi utilizada para obter as curvas-padrão de albumina, β -naftilamina, metoxi- β -naftilamina e NADH, bem como a correlação linear entre os parâmetros sob estudo. O teste t de Student foi utilizado para comparar pares de valores. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico mínimo de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros biométricos e glicemia

Os valores da massa corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, massa dos depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal e glicemia estão apresentados na Tabela 2. Quando comparados ao grupo C, os tratamentos MSG e MSG-P induziram uma diminuição significativa na massa corporal. O comprimento naso-anal dos animais MSG e MSG-P foi menor em relação a C. Já o índice de Lee foi maior em MSG e MSG-P e menor em C-P, em relação a C. Ocorreu aumento na massa absoluta dos depósitos de gordura retroperitoneal relativa à massa absoluta corporal, em MSG e MSG-P, comparativamente a C. A massa absoluta do depósito de gordura periepididimal não apresentou valores significativamente alterados em função dos tratamentos aplicados, porém a massa percentual deste depósito de gordura periepididimal relativa à massa corporal absoluta foi maior em MSG que em C. Os valores de glicemia não tiveram alteração significativa em função dos tratamentos aplicados.

Na Figura 2, observa-se a aparência típica do depósito de gordura periepididimal dos animais tratados com MSG (MSG e MSG-P), que foi similar aos animais C e C-P.

A Figura 3A mostra a aparência do depósito de gordura retroperitoneal dos animais C e C-P, enquanto a Figura 3B mostra a aparência distinta desse depósito nos animais MSG.

5.2. Atividade da desidrogenase láctica

A Figura 4 mostra que a atividade de LDH foi maior em FS que em FM de ambas as áreas: em FS, $1,1655 \pm 0,16$ (HT) e $1,706 \pm 0,4$ (HC); em FM, $0,6185 \pm 0,08$ (HT) e $0,6407 \pm 0,1$ (HC).

5.3. Atividades peptidásicas da FM adsorvida em Bio-beads

Na Tabela 3, observa-se a menor atividade DPPIV total na FM do HT adsorvida, comparativamente a não adsorvida. No HC, houve diminuição da atividade APN total na FM não adsorvida em relação à adsorvida.

Tabela 2 - Massa corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, massa dos depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal e glicemia de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

	C	C-P	MSG	MSG-P
Massa Corporal (mc) (g)	370 ± 14,65 (7)	339 ± 14,2 (7)	325 ± 9,45* (8)	292 ± 10,25** (7)
Comprimento Naso-anal (cn-a) (cm)	23,6 ± 0,4 (7)	24,2 ± 0,2 (7)	20,8 ± 0,2*** (8)	19,5 ± 0,2*** (7)
Índice de Lee (MC ^{0,33} / CN-A) (g / cm)	0,29 ± 0,0027 (7)	0,28 ± 0,0055* (7)	0,32 ± 0,0035*** (8)	0,33 ± 0,0055*** (7)
Gordura Periepididimal (g)	5,45 ± 0,86 (7)	4,0 ± 0,24 (7)	7,04 ± 0,65 (8)	5,67 ± 0,48 (7)
Gordura Periepididimal (% relativa à massa corporal)	1,47 ± 0,23% (7)	1,18 ± 0,07% (7)	2,16 ± 0,20%* (8)	1,94 ± 0,16% (7)
Gordura Retroperitoneal (g)	3,27 ± 0,50 (7)	2,95 ± 0,23 (7)	5,97 ± 0,55** (8)	4,97 ± 0,51* (7)
Gordura Retroperitoneal (% relativa à massa corporal)	0,88 ± 0,13% (7)	0,87 ± 0,07% (7)	1,83 ± 0,17%** (8)	1,70 ± 0,17%** (7)
Glicemia (mg/dL)	99,1 ± 9,0 (7)	84,3 ± 9,7 (7)	110 ± 14,5 (7)	88,6 ± 9,4 (7)

Valores são média ± EPM.

Número de animais entre parênteses.

Os valores apresentados em cada coluna foram obtidos dos mesmos animais.

***p<0,0001, **p<0,004 e *p<0,05, em relação a C (teste t-Student não pareado, bicaudal).

Figura 2. Aparência do depósito de gordura periepididimal (em destaque) do animal tratado com MSG (similar ao do animal controle).

Figura 3. Aparência do depósito de gordura retroperitoneal (em destaque) do animal controle (A) e do animal tratado com MSG (B).

Figura 4. Atividade da desidrogenase láctica (média $\pm$ EPM) das frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) no hipotálamo (HT) e hipocampo (HC) do rato. Número de animais entre parênteses.

* $p < 0,01$ relativamente a FM do mesmo tecido (teste t-Student não pareado, bicaudal).

Tabela 3 - Influência da adsorção em Bio-beads sobre a capacidade hidrolítica da fração de membrana solubilizada hipotalâmica e hipocampal sobre L-Ala- β -naftilamida (APN total) e H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida (DPPIV total).

Substrato	Atividade (UP mg proteína ⁻¹)			
	Hipotálamo		Hipocampo	
	Adsorvido	Sem adsorver	Adsorvido	Sem adsorver
L-Ala-β-naftilamida	19681,32 $\pm$ 770,01	23138,28 $\pm$ 944,43	23422,56 $\pm$ 441,33	27995,25 $\pm$ 419,75*
H-Gly-Pro-4-metoxi-β-naftilamida	103,40 $\pm$ 3,5	226,72 $\pm$ 14,7*	31,15 $\pm$ 1,7	92,88 $\pm$ 28,28

Valores são média $\pm$ EPM

Pool de 4 animais (medidas em duplicata).

UP = pmoles de substrato hidrolizado. min⁻¹

*p<0,02 relativamente à fração de membrana do mesmo tecido adsorvida (teste t-Student não pareado, bicaudal).

5.4. Atividades peptidásicas

Na Tabela 4, observa-se a influência da puromicina sobre a hidrólise dos substratos sintéticos L-Ala- β -naftilamida (APN total) e H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida (DPPIV total) pelos tecidos hipotalâmico e hipocampal e pelo plasma. Na FS do HT e HC, a atividade sobre L-Ala- β -naftilamida foi totalmente inibida pela puromicina. Já na FM do HT e HC, observa-se a presença de atividade sobre L-Ala- β -naftilamida insensível à puromicina. A partir desses resultados, adotou-se, no presente trabalho, a seguinte nomenclatura: PSA, para a atividade APN sensível à puromicina, e APM, para a atividade APN insensível à puromicina. A puromicina também apresentou efeito inibidor (menor que sobre L-Ala- β -naftilamida) sobre a hidrólise do substrato H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida pela FS e FM do HT e HC, mas induziu um ligeiro aumento na hidrólise promovida pelo plasma.

Na Tabela 5, observa-se o efeito da diprotina A sobre a PSA, a APM e a atividade hidrolítica sobre H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida (DPPIV total). Na FS e FM do HT e HC, assim como no plasma, a diprotina aumentou a atividade PSA. Na FM do HC e no plasma, a diprotina diminuiu a atividade APM. Na FS e FM do HT e HC e no plasma, a diprotina diminuiu a hidrólise do substrato H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida. Baseado no perfil da hidrólise de H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida, na presença de diprotina, adotou-se, no presente estudo, a seguinte nomenclatura: DPPIV-DS, para a atividade DPPIV sensível à diprotina A, e DPPIV-DI, para a atividade DPPIV insensível à diprotina A.

As Tabelas 6 e 7 mostram que, no HT e HC, em C, a atividade PSA na FS é 7-10 vezes mais elevada que na FM, a atividade PSA na FM é cerca de 4 vezes mais elevada que APM e as atividades DPPIV-DS e DI na FS não diferem. A Tabela 6 mostra que a atividade DPPIV-DS é cerca de 3 vezes menor que DPPIV-DI na FM do HT de C. Na Tabela 7 observa-se que

na FM do HC de C ocorre o inverso, i.e. a atividade DPPIV-DS é cerca de 10 vezes maior que DPPIV-DI.

A Tabela 6 mostra que houve diminuição da atividade PSA na FS do HT em C-P e MSG, em relação a C. Os animais MSG-P apresentaram significativa redução da atividade DPPIV-DS na FS do HT comparativamente a C. A atividade DPPIV-DI foi menor na FS do HT em MSG-P e na FS e FM do HT em MSG, em relação a C. Não houve diferença significativa nos diferentes tratamentos (C-P, MSG e MSG-P) quanto à atividade APM na FM e FS do HT, em relação a C.

A Tabela 7 mostra que não houve diferença significativa da atividade APM da FM e FS do HC entre os diferentes tratamentos (C, C-P, MSG e MSG-P), mas houve um aumento significativo na atividade PSA na FM do HC em MSG-P, em relação a C. A atividade DPPIV-DS diminuiu na FS do HC em MSG-P, em relação a C. Já na FM, a atividade DPPIV-DS foi menor em C-P e MSG, relativamente a C. A atividade DPPIV-DI aumentou na FM do HC em C-P, MSG e MSG-P, em relação a C.

Na Tabela 8, observa-se, no plasma de C, que a atividade APM foi cerca de 2 vezes maior que a PSA, enquanto a DPPIV-DI foi cerca de 5 vezes maior que DPPIV-DS. Não houve diferença significativa das atividades PSA, APM e DPPIV-DS do plasma entre os diferentes tratamentos (C, C-P, MSG e MSG-P). Já a atividade DPPIV-DI diminuiu no plasma em MSG-P.

Tabela 4 - Efeito da puromicina sobre a hidrólise dos substratos L-Ala- β -naftilamida e H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida pelas frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) dos tecidos hipotalâmico e hipocampal e pelo plasma de animais controles normais.

		Substrato	
		L-Ala- β -naftilamida	H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida
Atividade (% relativa à ausência de puromicina)	HIPOTÁLAMO	FS	NE
			50 $\pm$ 4,77% ^{***} (5)
		FM	5,95 $\pm$ 1,17% ^{***} (4)
			71,4 $\pm$ 15,3% ^{**} (5)
	HIPOCAMPO	FS	NE
			54,93 $\pm$ 2,79% ^{**} (5)
	FM	7,13 $\pm$ 2,8% ^{**} (3)	
		58,9 $\pm$ 11% [*] (5)	
	PLASMA	73,65 $\pm$ 22,18% (6)	112,03 $\pm$ 22,18% ^{***} (5)

Valores são média $\pm$ EPM.

Valor sem puromicina=100%

Concentração final de puromicina no incubado = 0,02 mM

Número de animais entre parênteses.

NE = não detectável por essa metodologia

*p<0,02, **p<0,003 e ***p<0,0008 em relação ao valor obtido sem puromicina (test t Student pareado, bicaudal).

Tabela 5 - Efeito da diprotina A sobre as atividades de aminopeptidase neutra sensível (PSA) e insensível (APM) à puromicina e sobre a hidrólise do substrato H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida pelas frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) dos tecidos hipotalâmico e hipocampal e pelo plasma.

Substrato	Atividade (% relativa à ausência de diprotina)				
	Hipotálamo		Hipocampo		Plasma
	FS	FM	FS	FM	
PSA	152,6 $\pm$ 19,49% ^{**} (6)	150,47 $\pm$ 19,49% ^{**} (5)	158,07 $\pm$ 50,46% [*] (7)	142,76 $\pm$ 29,6% [*] (7)	154,75 $\pm$ 67,62% [*] (3)
APM	NE	99,07 $\pm$ 25,05% (7)	NE	38,26 $\pm$ 19,08% [*] (3)	56,83 $\pm$ 16,8% [*] (5)
H-Gly-Pro-4-metoxi-β-naftilamida	52,51 $\pm$ 14,45% ^{**} (6)	73,67 $\pm$ 11,28% ^{**} (6)	59,97 $\pm$ 24,47% [*] (6)	36,1 $\pm$ 25,4% ^{**} (7)	72,41 $\pm$ 25,94% [*] (5)

Valores são média $\pm$ EPM

Valor sem diprotina = 100%

Concentração final de diprotina A no incubado = 0,016 mM

Número de animais entre parênteses.

NE = não detectável por essa metodologia

*p<0,05, **p<0,01 em relação ao valor obtido sem diprotina (test t Student pareado, bicaudal).

Tabela 6 - Atividades (UP mg proteína⁻¹) de aminopeptidase neutra sensível (PSA) e insensível (APM) à puromicina e de dipeptidil peptidase IV sensível (DPPIV-DS) e insensível (DPPIV-DI) à diprotina em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) do hipotálamo de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

		PSA	APM	DPPIV-DS	DPPIV-DI
C	FS	48852,07 ± 6256,3 (5)	NE	55,81 ± 9,07 (5)	39,88 ± 8,38 (5)
	FM	4704,31 ± 748,4 (6)	1030,73 ± 188,82 (7)	103,23 ± 23,7 (6)	288,78 ± 44,23 (6)
C-P	FS	22119,9 ± 2957,9 ^{**} (6)	NE	46,82 ± 15,33 (3)	28,73 ± 6,2 (5)
	FM	4790,72 ± 937,28 (6)	1843,8 ± 595,11 (6)	174,33 ± 29,64 (5)	311,23 ± 90,78 (5)
MSG	FS	28121,1 ± 4344,4 [*] (7)	NE	28,52 ± 5,89 (3)	19,74 ± 2,75 [*] (6)
	FM	4327,12 ± 1024,8 (5)	1566,15 ± 361,13 (8)	61,53 ± 14,36 (6)	49,88 ± 11,13 [*] (4)
MSG-P	FS	29048,08 ± 7941,9 (6)	NE	21,91 ± 10,68 [*] (4)	11,75 ± 2,49 [*] (5)
	FM	4990,38 ± 751,11 (6)	820,42 ± 106,17 (5)	58,48 ± 17,27 (3)	146,84 ± 64,63 (3)

Valores são média ± EPM.

Número de animais entre parênteses.

NE= não detectável por essa metodologia

UP=pmoles de substrato hidrolizado. min⁻¹

*p<0,05 e **p<0,009 em relação a C (teste t-Student não pareado, bicaudal).

Tabela 7 - Atividades (UP mg proteína⁻¹) de aminopeptidase neutra sensível (PSA) e insensível (APM) à puromicina e de dipeptidil peptidase IV sensível (DPPIV-DS) e insensível (DPPIV-DI) à diprotina em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) do hipocampo de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

		PSA	APM	DPPIV-DS	DPPIV-DI
C	FS	34775,23 ± 6721,7 (6)	NE	23,47 ± 8,73 (4)	37,51 ± 8,73 (4)
	FM	5225,5 ± 613,62 (7)	1510,07 ± 193,27 (6)	86,07 ± 23,54 (5)	7,96 ± 5,09 (6)
C-P	FS	36205,56 ± 8004,1 (7)	NE	51,77 ± 10,79 (6)	32,60 ± 11,41 (4)
	FM	6181,63 ± 855,85 (7)	1494,84 ± 114,01 (6)	21 ± 9,81* (4)	37,5 ± 14,97* (3)
MSG	FS	46109,25 ± 9457 (8)	NE	30 ± 5,16 (5)	25,5 ± 5,7 (4)
	FM	5238,6 ± 799,6 (7)	1338,37 ± 250,05 (7)	6,55 ± 2,02* (3)	131,48 ± 33,15** (4)
MSG-P	FS	52988,61 ± 9208,7 (5)	NE	15,33 ± 1,4* (3)	23,63 ± 5,48 (3)
	FM	11233,22 ± 2224,4* (7)	2336,5 ± 664,9 (5)	51,03 ± 20,64 (5)	43,75 ± 6,25** (4)

Valores são média ± EPM.

Número de animais entre parênteses.

NE= não detectável por essa metodologia

UP= pmoles de substrato hidrolizado. min⁻¹

*p<0,05 e **p<0,003 em relação a C (teste t-Student não pareado, bicaudal)

Tabela 8 - Atividades (UP mg proteína⁻¹) de aminopeptidase neutra sensível (PSA) e insensível (APM) à puromicina e de dipeptidil peptidase IV sensível (DPPIV-DS) e insensível (DPPIV-DI) à diprotina no plasma de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

	PSA	APM	DPPIV-DS	DPPIV-DI
C	425,74 ± 167,02 (4)	777,83 ± 234,27 (6)	364,12 ± 81,41 (5)	1533,57 ± 178,75 (4)
C-P	144,69 ± 37,99 (3)	377,58 ± 58 (6)	421,92 ± 150,24 (4)	1879,47 ± 149,5 (5)
MSG	159,99 ± 34,48 (4)	691,81 ± 186,54 (7)	320,33 ± 74,18 (5)	1969,84 ± 256,87 (5)
MSG-P	249,21 ± 53,56 (3)	302,7 ± 27,15 (5)	501,51 ± 85,75 (4)	1019,46 ± 95,65* (5)

Valores são média ± EPM.

Número de animais entre parênteses.

UP= pmoles de substrato hidrolizado. min⁻¹

*p<0,04 em relação a C (teste t-Student não pareado bicaudal)

5.5. Correlações entre os parâmetros biométricos, glicemia e atividades peptidásicas.

A Tabela 9 mostra os resultados da prospecção de correlações significativas por análise de regressão linear de todas as combinações pareadas possíveis dos parâmetros sob estudo.

Nos animais normais houve correlação entre comprimento naso-anal vs massa corporal (positiva), gordura periepididimal vs massa corporal (positiva), gordura retroperitoneal vs massa corporal (positiva), glicemia vs índice de Lee (negativa), gordura retroperitoneal vs glicemia (negativa) e gordura retroperitoneal vs gordura periepididimal (positiva). É notável que destas correlações detectadas nos animais normais nenhuma se mantém em animais obesos MSG. Nos animais normais privados de alimento destas se mantém a correlação entre gordura retroperitoneal vs gordura periepididimal (positiva). Nos animais obesos MSG privados de alimento se mantêm as correlações entre gordura periepididimal vs massa corporal (positiva) e glicemia vs índice de Lee (positiva). A correlação entre índice de Lee e comprimento naso-anal (negativa) só existe em animais normais privados de alimento. A correlação entre índice de Lee e massa corporal existe em animais normais privados de alimento (positiva) e obesos MSG privados de alimento (positiva). A correlação entre gordura periepididimal vs índice de Lee (positiva) só existe em obesos MSG privados de alimento.

Nos animais normais não houve correlação entre os parâmetros biométricos e glicemia vs atividades peptidásicas plasmáticas e entre as próprias atividades peptidásicas plasmáticas. Nos animais MSG ocorreu correlação entre DPPIV-DI plasmática vs massa corporal (positiva) e PSA plasmática vs comprimento naso-anal (positiva). A privação de alimento nos animais normais determinou correlações entre APM plasmática vs massa corporal (negativa), PSA plasmática vs comprimento nasoanal (positiva), APM plasmática vs índice de Lee (negativa), APM plasmática vs gordura retroperitoneal (negativa) e PSA plasmática vs

DPPIV-DS plasmática (negativa). Nos animais obesos MSG a privação de alimento determinou correlações positivas entre DPPIV-DI plasmática vs massa corporal, DPPIV-DI plasmática vs índice de Lee e DPPIV-DI plasmática vs gordura periepididimal.

Nos animais normais ocorreram correlações positivas entre DPPIV-DI FS HT vs massa corporal, DPPIV-DI FM HT vs massa corporal, APM FM HC vs massa corporal, PSA FS HT vs DPPIV-DI FS HT e DPPIV-DI FM HC vs PSA FM HC, e negativas entre DPPIV-DI FS HT vs comprimento naso-anal, DPPIV-DI FS HT vs gordura periepididimal, DPPIV-DI FM HT vs gordura periepididimal, DPPIV-DI FS HT vs gordura retroperitoneal, DPPIV-DI FM HT vs gordura retroperitoneal. Nos animais MSG ocorreram correlações entre DPPIV-DI FM HT vs comprimento naso-anal (negativa), PSA FS HC vs comprimento naso-anal (positiva), DPPIV-DI FM HT vs índice de Lee (positiva), DPPIV-DS FM HT vs gordura periepididimal (negativa), PSA FS HT vs gordura retroperitoneal (positiva) e APM FM HC vs PSA FM HC (positiva). Nos animais normais a privação alimentar determinou correlações negativas entre DPPIV-DI FM HC vs massa corporal, DPPIV-DI FS HC vs índice de Lee, e positivas entre DPPIV-DS FM HT vs gordura retroperitoneal, DPPIV-DS FM HT vs PSA FM HT, DPPIV-DI FM HT vs PSA FM HT, DPPIV-DI FM HT vs DPPIV-DS FM HT e DPPIV-DI FS HC vs PSA FS HC. A privação alimentar nos animais MSG determinou correlações entre DPPIV-DI FS HT vs massa corporal (negativa), PSA FS HC vs glicemia (positiva), DPPIV-DI FM HC vs gordura periepididimal (positiva) e DPPIV-DI FM HC vs PSA FM HC (positiva).

Tabela 9 - Análise de correlação linear combinatória pareada de todos os parâmetros sob estudo nos diferentes tratamentos.

	Massa Corporal			
	C	C-P	MSG	MSG-P
Comprimento Naso-anal	$s = 31,57 \pm 10,43$ $p < 0,03$; $r^2 = 0,65$	A	A	A
Índice de Lee	A	$s = 2454 \pm 354,3$ $p < 0,002$; $r^2 = 0,90$	A	$s = 0,0004 \pm 0,0001$ $p < 0,03$; $r^2 = 0,66$
Gordura Periepididimal	$s = 0,055 \pm 0,009$ $p < 0,002$; $r^2 = 0,88$	A	A	$s = 0,04 \pm 0,006$ $p < 0,0009$; $r^2 = 0,91$
Gordura Retroperitoneal	$s = 0,032 \pm 0,005$ $p < 0,002$; $r^2 = 0,89$	A	A	A
DPPIV-DI FS HT	$s = 0,935 \pm 0,214$ $p < 0,008$; $r^2 = 0,79$	A	A	$s = -3,58 \pm 1,18$ $p < 0,04$; $r^2 = 0,70$
DPPIV-DI FM HT	$s = 0,279 \pm 0,079$ $p < 0,03$; $r^2 = 0,76$	A	A	A
APM FM HC	$s = 0,067 \pm 0,022$ $p < 0,05$; $r^2 = 0,70$	A	A	A
DPPIV-DI FM HC	A	$s = -1,225 \pm 0,4235$ $p < 0,05$; $r^2 = 0,67$	A	A
APM PLASMA	A	$s = -0,227 \pm 0,076$ $p < 0,05$; $r^2 = 0,70$	A	A
DPPIV-DI PLASMA	A	A	$s = 0,016 \pm 0,0046$ $p < 0,03$; $r^2 = 0,75$	$s = 0,053 \pm 0,0088$ $p < 0,002$; $r^2 = 0,88$
Comprimento Naso-anal				
Índice de Lee	A	$s = -28,29 \pm 8,032$ $p < 0,02$; $r^2 = 0,71$	A	A
DPPIV-DI FS HT	$s = -0,021 \pm 0,007$ $p < 0,03$; $r^2 = 0,65$	A	A	A
DPPIV-DI FM HT	A	A	$s = -0,0039 \pm 0,0016$ $p < 0,04$; $r^2 = 0,54$	A
PSA FS HC	A	A	$s = 0,00001 \pm 0,000005$ $p < 0,04$; $r^2 = 0,55$	A
PSA PLASMA	A	$s = 0,0031 \pm 0,0010$ $p < 0,03$; $r^2 = 0,66$	$s = 0,0006 \pm 0,0002$ $p < 0,04$; $r^2 = 0,53$	A
Índice de Lee				
Glicemia	$s = -1586 \pm 420$ $p < 0,015$; $r^2 = 0,74$	A	A	$s = 1142 \pm 322$ $p < 0,02$; $r^2 = 0,71$
Gordura Periepididimal	A	A	A	$s = 72,18 \pm 21,29$ $p < 0,02$; $r^2 = 0,70$
DPPIV-DI FM HT	A	A	$s = 0,00009 \pm 0,00003$ $p < 0,04$; $r^2 = 0,57$	A
DPPIV-DI FS HC	A	$s = -0,00022 \pm 0,00007$ $p < 0,04$; $r^2 = 0,61$	A	A
APM PLASMA	A	$s = -0,00009 \pm 0,00002$ $p < 0,02$; $r^2 = 0,80$	A	A
DPPIV-DI PLASMA	A	A	A	$s = 0,0003 \pm 0,00000006$ $p < 0,008$; $r^2 = 0,79$
Glicemia				
Gordura Retroperitoneal	$s = -10,85 \pm 2,634$ $p < 0,01$; $r^2 = 0,77$	A	A	A

PSA FS HC	A	A	A	s= 2207 ± 558,4 p<0,02; r ² = 0,80
Gordura Periepididimal				
Gordura Retroperitoneal	s= 0,570 ± 0,043 p<0,0001; r ² = 0,97	s= 0,983 ± 0,17 p<0,003; r ² = 0,87	A	A
DPPIV-DI FS HT	s= -0,050 ± 0,016 p<0,03; r ² = 0,65	A	A	A
DPPIV-DS FM HT	A	A	s= -0,024 ± 0,009 p<0,05; r ² = 0,53	A
DPPIV-DI FM HT	s= -0,017 ± 0,005 p<0,03; r ² = 0,73	A	A	A
DPPIV-DI FM HC	A	A	A	s= 0,023 ± 0,0047 p<0,02; r ² = 0,89
DPPIV-DI PLASMA	A	A	A	s= 0,002 ± 0,0004 p<0,003; r ² = 0,87
Gordura Retroperitoneal				
PSA FS HT	A	A	s= 0,0001 ± 0,00003 p<0,02; r ² = 0,75	A
DPPIV-DI FS HT	s= -0,029 ± 0,009 p<0,03; r ² = 0,65	A	A	A
DPPIV-DS FM HT	A	s= 0,0073 ± 0,0020 p<0,04; r ² = 0,81	A	A
DPPIV-DI FM HT	s= -0,010 ± 0,002 p<0,02; r ² = 0,83	A	A	A
APM PLASMA	A	s= -0,003801 ± 0,0012 p<0,04; r ² = 0,70	A	A
PSA FS HT				
DPPIV-DI FS HT	s= 343,2 ± 102 p<0,04; r ² = 0,80	A	A	A
PSA FM HT				
DPPIV-DS FM HT	A	s= 0,024 ± 0,006 p<0,03; r ² = 0,85	A	A
DPPIV-DI FM HT	A	s= 0,070 ± 0,022 p<0,05; r ² = 0,77	A	A
DPPIV-DS FM HT				
DPPIV-DI FM HT	A	s= 0,307 ± 0,064 p<0,02; r ² = 0,88	A	A
PSA FS HC				
DPPIV-DI FS HC	A	s= 0,002 ± 0,0006 p<0,03; r ² = 0,65	A	A
PSA FM HC				
APM FM HC	A	A	s= 0,250 ± 0,085 p<0,04; r ² = 0,62	A
DPPIV-DI FM HC	s= 0,006 ± 0,002 p<0,04; r ² = 0,72	A	A	s= 0,006 ± 0,0016 p<0,04; r ² = 0,83
PSA PLASMA				
DPPIV-DS PLASMA	A	s= -1,393 ± 0,213 p<0,008; r ² =0,93	A	A

Análise de regressão linear, software Prisma® 3.0

s: slope; p: probabilidade; r²: coeficiente de determinação; A: correlação ausente.

Os parâmetros que não apresentaram correlação não foram mencionados.

5.6. ELISA de CD26 na FS e FM

A Figura 5 mostra que, em C, o teor de CD26 na FM é 3 vezes maior que na FS do HT. A Figura 6 mostra que, no HC de C, o teor de CD26 é cerca de 7 vezes mais elevado em FS que em FM.

A quantificação de CD26 (μg de CD26/ mg de proteína total) por ELISA evidenciou um teor diminuído em MSG ($54 \pm 2,08$) e MSG-P ($152,12 \pm 10,08$) na FS do HT, em relação a C ($239,46 \pm 27$) (Figura 5). Na FM, observa-se uma diminuição no teor de CD26 em C-P ($83,48 \pm 27,11$), em relação a C ($594,10 \pm 111,82$) (Figura 5).

Na Figura 6, observa-se que o teor de CD26 aumentou na FS do HC em C-P ($212,44 \pm 7,14$) e diminuiu em MSG-P ($61 \pm 4,32$), em relação a C ($118,40 \pm 2,87$). Já na FM, o teor de CD26 aumentou em C-P ($260,88 \pm 3,01$), MSG ($701,06 \pm 11,40$) e MSG-P ($581,82 \pm 41,64$), em relação a C ($17,96 \pm 4,44$).

Figura 5. CD26 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) (média $\pm$ EPM), quantificado por ELISA, nas frações solúvel (FS) e de membrana (FM) do hipotálamo de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

Número de animais entre parênteses.

* $p < 0,04$, ** $p < 0,003$ em relação a C, na mesma fração (Teste t-Student não pareado bi-caudal).

Figura 6. CD26 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) (média $\pm$ EPM), quantificado por ELISA, nas frações solúvel (FS) e de membrana (FM) do hipocampo de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

Número de animais entre parênteses.

*** $p < 0,0005$ em relação a C, na mesma fração (Teste t-Student não pareado bi-caudal).

5.7. Western blotting da CD13 e CD26 na FS e FM

A Figura 7 mostra que, em C, a expressão de CD13 do HT foi cerca de 250 vezes maior em FM que em FS. A Figura 8 mostra que, em C, a expressão de CD13 do HC em FS é 4 vezes maior em FM. As Figuras 9 e 10 mostram que, em C, a expressão de CD26 do HT e do HC é cerca de 2-4 vezes maior em FM que em FS.

As Figuras 7(i) e 7(ii) mostram as bandas imuno-reativas para CD13, respectivamente, na FS e FM do HT. A análise densitométrica destas bandas mostrou que houve aumento na expressão de CD13 na FS em C-P ($0,209 \pm 0,021$), MSG ($0,844 \pm 0,078$) e MSG-P ($0,215 \pm 0,054$), em relação a C ($0,009 \pm 0,002$), como pode ser observado na Figura 7(iii). Já na FM, houve diminuição na expressão de CD13 em C-P ($0,330 \pm 0,025$), MSG ($0,134 \pm 0,023$) e MSG-P ($0,35 \pm 0,075$), em relação a C ($2,260 \pm 0,712$) (Figura 7iv).

Nas Figuras 8(i) e 8(ii) observa-se as bandas imuno-reativas para CD13, respectivamente, na FS e FM do HC. A análise densitométrica destas bandas mostrou que houve aumento na expressão de CD13 na FS em C-P ($1,57 \pm 0,184$), assim como na FM em C-P ($0,262 \pm 0,005$), MSG ($0,120 \pm 0,014$) e MSG-P ($0,295 \pm 0,085$), em relação a C (FS, $0,520 \pm 0,125$; FM, $0,044 \pm 0,001$), como pode ser observado nas Figuras 8(iii) e 8(iv), respectivamente.

As Figuras 9(i) e 9(ii) mostram as bandas imuno-reativas para CD26, respectivamente na FS e FM do HT. A análise densitométrica destas bandas mostrou que em C-P ($0,313 \pm 0,048$) e MSG-P ($0,606 \pm 0,094$) há aumento na expressão protéica de CD26 na FS do HT, em relação a C ($0,123 \pm 0,002$) (Figura 9iii). Os animais MSG ($2,056 \pm 0,31$) apresentaram aumento da expressão protéica de CD26 na FM do HT, em relação a C ($0,470 \pm 0,071$) (Figura 9iv).

As bandas imuno-reativas para CD26 na FS e FM do HC podem ser observadas, respectivamente nas Figuras 10(i) e 10(ii). A análise densitométrica destas bandas mostrou que houve diminuição na expressão protéica de CD26 na FS em C-P ($0,066 \pm 0,002$), MSG ($0,119 \pm 0,043$) e MSG-P ($0,240 \pm 0,046$), em relação a C ($0,441 \pm 0,053$) (Figura 10iii). Na Figura 10(iv), observa-se a diminuição da expressão protéica de CD26 na FM em MSG ($0,152 \pm 0,023$) e MSG-P ($0,321 \pm 0,017$), em relação a C ($0,802 \pm 0,184$).

Figura 7. Análise de Western blotting da CD13 nas frações solúvel (FS) e de membrana (FM) do hipotálamo dos animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P). **(i) e (ii):** cem µg de proteína de FS e FM de hipotálamo foram separadas por SDS-PAGE e submetidas ao procedimento de Western blotting, utilizando o anticorpo anti-CD13 policlonal de coelho. **(iii) e (iv):** quantificação, por densitometria, das bandas de CD13, normalizadas a partir da banda de β-actina. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0009$ em relação a C, na mesma fração (Teste t-Student não pareado bicaudal).

Figura 8. Análise de Western blotting da CD13 nas frações solúvel (FS) e de membrana (FM) do hipocampo dos animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P). **(i) e (ii):** cem µg de proteína de FS e FM de hipocampo foram separadas por SDS-PAGE e submetidas ao procedimento de Western blotting, utilizando o anticorpo anti-CD13 policlonal de coelho. **(iii) e (iv):** quantificação, por densitometria, das bandas de CD13, normalizadas a partir da banda de β-actina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação a C, na mesma fração (Teste t-Student não pareado bicaudal).

Figura 9. Análise de Western blotting da CD26 nas frações solúvel (FS) e de membrana (FM) do hipotálamo dos animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P). (i) e (ii): cem μ g de proteína de FS e FM do hipotálamo foram separadas por SDS-PAGE e submetidas ao procedimento de Western blotting, utilizando o anticorpo anti-CD26 policlonal de coelho. (iii) e (iv): quantificação, por densitometria, das bandas de CD26, normalizadas a partir da banda de β -actina. *p<0,02 e **p<0,009 em relação a C, na mesma fração (Teste t-Student não pareado bicaudal).

Figura 10. Análise de Western blotting da CD26 nas frações solúvel (FS) e de membrana (FM) do hipocampo dos animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P). (i) e (ii): cem μ g de proteína de FS e FM do hipocampo foram separadas por SDS-PAGE e submetidas ao procedimento de Western blotting, utilizando o anticorpo anti-CD26 policlonal de coelho. (iii) e (iv): quantificação, por densitometria, das bandas de CD26, normalizadas a partir da banda de β -actina. *p<0,05 e **p<0,01 em relação a C, na mesma fração (Teste t-Student não pareado bicaudal).

5.8. Avaliação da qualidade do RNA

O método utilizado para a extração de RNA proporcionou qualidade adequada, como mostra a Figura 11, na qual podem ser observadas duas bandas correspondentes aos RNAs ribossomais, 25S e 18S.

5.9. Expressão gênica da CD13 e CD26

A Figura 12 mostra, em C, que a expressão gênica de CD13 foi cerca de 2 vezes maior no HT que no HC. A Figura 13 mostra, em C, que a expressão gênica de CD26 foi 2 vezes menor no HT que em HC.

Nas Figuras 12(i) e 12(ii) observam-se as bandas de expressão do mRNA da CD13 no HT e HC, respectivamente. A análise densitométrica destas bandas mostra que MSG ($0,743 \pm 0,094$) e MSG-P ($0,551 \pm 0,030$) apresentaram diminuição na expressão do mRNA da CD13 no HT, em relação a C ($1,7 \pm 0,121$) (Figura 12iii). C-P ($0,931 \pm 0,027$) e MSG-P ($1,20 \pm 0,031$) apresentaram aumento na expressão do mRNA da CD13 no HC, em relação a C ($0,760 \pm 0,051$) (Figura 12iv).

Nas Figuras 13(i) e 13(ii) observam-se as bandas de expressão do mRNA da DPPIV no HT e HC, respectivamente. A análise densitométrica destas bandas mostra o aumento da expressão do mRNA da CD26 no HT em C-P ($0,653 \pm 0,066$), em relação a C ($0,466 \pm 0,015$) (Figura 13iii). Nenhum grupo apresentou diferença estatística na expressão do mRNA da CD26 no HC, em relação a C ($0,896 \pm 0,252$) (Figura 13iv).

Figura 11. Visualização, sob luz ultravioleta, dos RNAs totais extraídos do hipotálamo (HT) e do hipocampo (HC) dos animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P). As bandas indicadas correspondem às subunidades 25S e 18S do RNA ribossomal (rRNA).

Figura 12. Expressão do mRNA da CD13 no hipotálamo (HT) e hipocampo (HC) de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P), detectada por reação em cadeia de polimerase, via transcrição reversa (RT-PCR). **(i) e (ii):** Eletroforese em gel de agarose dos produtos da RT-PCR. Os produtos obtidos por PCR foram visualizados por incorporação com brometo de etídeo. **(iii) e (iv):** quantificação, por densitometria, das bandas do produto da expressão do mRNA, normalizadas a partir da banda de GAPDH. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,008$ em relação a C, na mesma fração (Teste t-Student não pareado bicaudal).

Figura 13. Expressão do mRNA da CD26 no hipotálamo (HT) e hipocampo (HC) de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P), detectada por reação em cadeia de polimerase, via transcrição reversa (RT-PCR). (i) e (ii): Eletroforese em gel de agarose dos produtos da RT-PCR. Os produtos obtidos por PCR foram visualizados por incorporação com brometo de etídeo. (iii) e (iv): quantificação, por densitometria, das bandas do produto da expressão do mRNA, normalizadas a partir da banda de GAPDH. * $p < 0,05$ em relação a C, na mesma fração (Teste t-Student não pareado bicaudal).

5.10. Distribuição imuno-histoquímica e alterações densitométricas de CD13, CD26 e Fos entre os diferentes tratamentos

A coloração de Nissl confirmou a lesão de ArcNH e ME, típica do modelo de obesidade MSG (dados não mostrados).

Os animais C apresentaram imuno-reatividade à CD13 (CD13-ir) nos seguintes núcleos hipotalâmicos: ArcNH, periventricular (Pe), PVN, retroquiasmático (RCh) e SO. Não se observou CD13-ir no hipocampo dos animais C, assim como nos animais C-P, MSG e MSG-P. A Figura 14 ilustra um dos locais onde detectou-se alterações significativas de CD13-ir nos tratamentos C-P, MSG e MSG-P, em relação aos animais C, de acordo com a Tabela 11.

A Tabela 11 apresenta a densidade de CD13-ir nos diferentes tratamentos. Os animais MSG-P apresentaram menor número de CD13-ir no ArcNH (119 ± 29) e no Pe (23 ± 4), em relação aos animais C (ArcNH: 435 ± 29 ; Pe: 129 ± 25). O PVN e o ArcNH dos animais C-P apresentaram menor número de CD13-ir (PVN: 12 ± 2 ; ArcNH: 302 ± 25), em relação a C (PVN: 245 ± 20 ; ArcNH: 435 ± 29); CD13-ir foi ausente no RCh e no SO dos animais C-P. Os animais MSG apresentaram aumento de CD13-ir no SO (133 ± 25) e redução de CD13-ir no PVN (130 ± 11), em relação a C (SO: 69 ± 13 ; PVN: 245 ± 20).

Os animais C apresentaram imuno-reatividade à CD26 (CD26-ir) nos seguintes núcleos hipotalâmicos: ArcNH, DMH, Pe, PVN, RCh e SO. No hipocampo dos animais C observou-se CD26-ir no giro denteado (DG) e na fímbria (fi). A CD26-ir também foi detectada na pia máter (PM). As Figuras 15 e 16 ilustram os locais onde detectou-se alterações significativas da imuno-reatividade à CD26 (CD26-ir), em relação aos animais C, de acordo com a Tabela 12.

A Tabela 12 apresenta a densidade de CD26-ir nos diferentes tratamentos. Houve um aumento de CD26-ir no ArcNH (490 ± 34), DMH (27 ± 1), Pe (134 ± 20), PVN (88 ± 7) e RCh (41 ± 8) e diminuição de CD26-ir na PM (58 ± 7) nos animais C-P, em relação a C (ArcNH: 306 ± 11 ; DMH: 14 ± 1 ; Pe: 63 ± 12 ; PM: 425 ± 37 ; PVN: 47 ± 5 ; RCh: 12 ± 1). Nos animais C-P, a CD26-ir foi ausente no SO, DG e fi. Os animais MSG apresentaram aumento de CD26-ir no RCh (138 ± 11) e no SO (79 ± 1), e diminuição de CD26-ir no ArcNH (144 ± 16) e na PM (256 ± 21), comparativamente aos animais C (ArcNH: 306 ± 11 ; PM: 425 ± 37 ; RCh: 12 ± 1 ; SO: 8 ± 1). CD26-ir foi ausente no PVN, DG e fi dos animais MSG. Já os animais MSG-P apresentaram diminuição de CD26-ir na PM (51 ± 5) e aumento no Pe (144 ± 24), em relação a C (Pe: 63 ± 12 ; PM: 425 ± 37). A ausência de CD26-ir foi observada no DG, DMH, fi, PVN e RCh dos animais MSG-P.

Observou-se a presença de imuno-reatividade à Fos (Fos-ir) nos seguintes núcleos hipotalâmicos dos animais C: hipotálamo anterior (AH), ArcNH, DMH, Pe, PVN, RCh, SO e VMH. Não se observou Fos-ir no hipocampo dos animais C, assim como nos animais C-P, MSG e MSG-P. Na Figura 17 observa-se o aspecto das células Fos-ir consideradas na contagem. As Figuras 18 e 19 ilustram os locais onde detectou-se alterações significativas de Fos-ir, em relação aos animais C, de acordo com a Tabela 13.

A Tabela 13 apresenta a densidade de Fos-ir nos diferentes tratamentos. Os animais C-P, MSG e MSG-P apresentaram diminuição do número de Fos-ir no PVN (C-P: 135 ± 14 ; MSG: 66 ± 7 ; MSG-P: 30 ± 5) e RCh (C-P: 65 ± 7 ; MSG: 22 ± 4 ; MSG-P: 66 ± 11), em relação a C (PVN: 207 ± 16 ; RCh: 155 ± 20). Os animais C-P e MSG-P também apresentaram redução do número de Fos-ir no VMH (C-P: 74 ± 13 ; MSG-P: 118 ± 22), em relação a C (408 ± 80). A Fos-ir diminuiu no Pe e DMH dos animais MSG (Pe: 16 ± 1 ; DMH: 12 ± 2) e MSG-P (Pe: 16 ± 2 ; DMH: 239 ± 41), em relação a C (Pe: 120 ± 16 ; DMH: 577 ± 111). Os animais MSG também apresentaram redução de Fos-ir em AH (27 ± 5), comparativamente a C (63 ± 12). Os

animais MSG-P apresentaram redução de Fos-ir no ArcNH (101 ± 24), em relação a C (437 ± 68). A Fos-ir foi ausente no SO dos animais C-P, MSG e MSG-P, assim como no VMH dos animais MSG.

Tabela 10. Extensão das regiões analisadas quanto a imuno-reatividade a CD13, CD26 e Fos ao longo do eixo ântero-posterior do SNC. Os valores representam os níveis posteriores ao bregma, segundo Atlas Paxinos e Watson 2007.

Núcleo	Bregma
AH	-1,32 a -2,28
ArcNH	-1,71 a -4,36
CA1	-2,28 a -4,36
CA2	-2,28 a -4,36
CA3	-1,71 a -4,36
DG	-1,71 a -4,20
DMH	-2,28 a -3,84
Fi	-1,32 a -4,20
Pe	-1,32 a -3,48
PVN	-1,32 a -2,28
Py	-1,80 a -2,28
RCh	-1,32 a -2,52
SO	-1,32 a -2,52
VMH	-1,72 a -3,36

AH: área anterior do hipotálamo; ArcNH: núcleo arqueado hipotalâmico; CA1: campo CA1 do hipocampo; CA2: campo CA2 do hipocampo; CA3: campo CA3 do hipocampo; DG: giro denteado hipocampal; DMH: núcleo hipotalâmico dorsomedial; fi: fímbria hipocampal; Pe: núcleo periventricular hipotalâmico; PVN: núcleo paraventricular hipotalâmico; Py: camada de células piramidais do hipocampo; RCh: núcleo retroquiasmático hipotalâmico; SO: núcleo supraóptico hipotalâmico; VMH: núcleo hipotalâmico ventromedial.

Tabela 11. Densidade de CD13-ir no SNC de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

Regiões	C	C-P	MSG	MSG-P
ArcNH	435 ± 29 (3)	302 ± 25* (3)	344 ± 28 (3)	119 ± 29** (3)
Pe	129 ± 25 (3)	71 ± 5 (3)	132 ± 25 (3)	23 ± 4* (3)
PVN	245 ± 20 (3)	12 ± 2*** (3)	130 ± 11** (3)	138 ± 16* (3)
RCh	40 ± 8 (3)	A	76 ± 11 (3)	60 ± 11 (3)
SO	69 ± 13 (3)	A	173 ± 33* (3)	133 ± 25 (3)

Valores são média ± EPM.

Número de animais entre parênteses.

A = imuno-reatividade ausente

*p<0,05, **p<0,008 e ***p<0,0004 em relação a C (test t Student pareado, bicaudal).

ArcNH: núcleo arqueado hipotalâmico; Pe: núcleo periventricular hipotalâmico; PVN: núcleo paraventricular hipotalâmico; RCh: núcleo retroquiasmático hipotalâmico; SO: núcleo supraóptico hipotalâmico.

Figura 14. Imuno-reatividade à CD13 (CD13-ir) observada em cortes coronais do encéfalo de rato. Núcleo paraventricular (em destaque) do animal controle (A) e do animal controle privado de alimento (B) (aspecto semelhante a MSG e MSG privado de alimento). Bregma -1,44 mm. Barras = 30 μ m.

Tabela 12. Densidade de CD26-ir no SNC de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

Regiões	C	C-P	MSG	MSG-P
ArcNH	306 ± 11 (3)	490 ± 34 ^{**} (3)	144 ± 16 ^{**} (3)	292 ± 26 (3)
DG	147 ± 24 (3)	A	A	A
DMH	14 ± 1 (3)	27 ± 1 ^{**} (3)	10 ± 1 (3)	A
fi	31 ± 6 (3)	A	A	A
Pe	63 ± 12 (3)	134 ± 20 [*] (3)	52 ± 10 (3)	144 ± 24 [*] (3)
PM	425 ± 37 (3)	58 ± 7 ^{***} (3)	256 ± 21 [*] (3)	51 ± 5 ^{***} (3)
PVN	47 ± 5 (3)	88 ± 7 ^{**} (3)	A	A
RCh	12 ± 1 (3)	41 ± 8 [*] (3)	138 ± 11 ^{***} (3)	A
SO	8 ± 1 (3)	A	79 ± 1 ^{***} (3)	A

Valores são média ± EPM.

Número de animais entre parênteses.

A = imuno-reatividade ausente

*p<0,05, **p<0,009 e ***p<0,0001 em relação a C (test t Student pareado, bicaudal).

ArcNH: núcleo arqueado hipotalâmico; DG: giro denteado hipocampal; DMH: núcleo hipotalâmico dorsomedial; fi: fímbria; Pe: núcleo periventricular hipotalâmico; PVN: núcleo paraventricular hipotalâmico; RCh: núcleo retroquiasmático hipotalâmico; SO: núcleo supraóptico hipotalâmico.

Figura 15. Imuno-reatividade à CD26 (CD26-ir) observada em cortes coronais do encéfalo de rato. Pia máter (em destaque) do animal controle (A) e do animal MSG privado de alimento (B). Bregma -2.12 mm. Barras = 30 μ m.

Paxinos e Watson 2007

Figura 16. Imuno-reatividade à CD26 (CD26-ir) observada em cortes coronais do encéfalo de rato. Núcleo retroquiasmático (em destaque) do animal controle (A) e do animal MSG (B). Bregma -1.44 mm. Barras = 30 μ m.

Figura 17. Fotomicrografia de cortes coronais (40 μm) do encéfalo de rato. Evidenciando neurônios Fos-ir considerados na contagem (setas pretas).

Tabela 13. Densidade de Fos-ir no SNC de animais controles normais (C), normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

Regiões	C	C-P	MSG	MSG-P
AH	63 ± 12 (3)	51 ± 9 (3)	27 ± 5 [*] (3)	60 ± 7 (3)
ArcNH	437 ± 66 (3)	352 ± 31 (3)	347 ± 62 (3)	101 ± 24 ^{**} (3)
DMH	577 ± 111 (3)	443 ± 69 (3)	12 ± 2 ^{**} (3)	239 ± 41 [*] (3)
Pe	121 ± 16 (3)	78 ± 5 (3)	16 ± 1 ^{**} (3)	16 ± 2 ^{**} (3)
PVN	207 ± 16 (3)	135 ± 14 [*] (3)	66 ± 7 ^{**} (3)	30 ± 5 ^{***} (3)
RCh	155 ± 20 (3)	65 ± 7 [*] (3)	22 ± 4 ^{**} (3)	66 ± 11 [*] (3)
SO	25 ± 3 (3)	A	A	A
VMH	408 ± 80 (3)	74 ± 13 [*] (3)	A	118 ± 22 [*] (3)

Valores são média ± EPM.

Número de animais entre parênteses.

A = imuno-reatividade ausente

*p<0,05, **p<0,009 e ***p<0,0006 em relação a C (test t Student pareado, bicaudal).

AH: área anterior do hipotálamo; ArcNH: núcleo arqueado hipotalâmico; DMH: núcleo hipotalâmico dorsomedial; Pe: núcleo periventricular hipotalâmico; PVN: núcleo paraventricular hipotalâmico; RCh: núcleo retroquiasmático hipotalâmico; SO: núcleo supraóptico hipotalâmico; VMH: núcleo hipotalâmico ventromedial.

Figura 18. Imuno-reatividade à Fos (Fos-ir) observada em cortes coronais do encéfalo de rato. Núcleo retoquiasmático do animal controle (A) e do animal MSG (B) (aspecto semelhante ao encontrado nos animais normais e MSG, ambos privados de alimento). Bregma -1,60 mm. Barra = 30 μ m.

Paxinos e Watson 2007

Figura 19. Imuno-reatividade à Fos (Fos-ir) observada em cortes coronais do encéfalo de rato. Núcleo paraventricular do animal controle (A) e do animal MSG privado de alimento (B) (aspecto semelhante ao encontrado nos animais normais privados de alimento e obesos MSG). Bregma - 1,6 mm. Barras = 30 μ m.

6. DISCUSSÃO

6.1. Validação do procedimento de obtenção das frações solúvel e de membrana e interferência do Triton X-100 na quantificação das atividades peptidásicas em fração de membrana

Sendo a desidrogenase láctica um reconhecido marcador citosólico (HOSOKAWA et al. 1992, NORABERG et al. 2007), a obtenção de maior teor desta atividade enzimática em fração solúvel que em fração de membrana, de ambas as estruturas sob estudo, reflete a eficiência do procedimento de fracionamento adotado. Neste sentido, o rendimento mais adequado seria aquele em que fosse alcançada a maior diferença no teor de desidrogenase láctica entre as duas frações. Porém, há variações quanto ao teor celular de desidrogenase láctica, considerando-se que, obviamente, não se trata somente de um marcador, mas de enzima metabolicamente ativa. Sobretudo, até o momento, não há qualquer referência na literatura preconizando uma razão ideal de atividade desidrogenase láctica que deva ser adotada para aferir o rendimento ideal do processo de fracionamento empregado. Outro importante indicador da eficiência desse fracionamento foi a presença da atividade aminopeptidase neutra insensível à puromicina somente na fração de membrana do hipotálamo e hipocampo, a qual é uma atividade enzimática reconhecidamente restrita à fração de membrana de tecido cerebral (GILLESPIE et al. 1992, IRAZUSTA et al. 2003, LARRINAGA et al. 2005).

Uma vez que, após reduzir a presença do Triton X-100 por adsorção em Bio-beads, a atividade aminopeptidase neutra insensível à puromicina diminuiu no hipocampo e a atividade

dipeptidil peptidase IV diminuiu no hipotálamo, não se adotou este procedimento ao longo do presente estudo. A diminuição destas atividades, em ambos os tecidos, após a adsorção do Triton X-100, pode ser atribuída à susceptibilidade destas proteínas para a desnaturação e/ou proteólise durante o acréscimo de tempo demandado pelo protocolo de adsorção (2 horas), o qual retarda a armazenagem da fração de membrana a -80°C .

6.2. Parâmetros biométricos e glicemia

Tabela 14. Sumário das alterações encontradas nos parâmetros biométricos

	C-P	MSG	MSG-P
Massa Corporal	=	▼	▼
Comprimento Naso-anal	=	▼	▼
Índice de Lee	▼	▲	▲
Gordura Periepididimal	=	=	=
Gordura Periepididimal (% relativa à massa corporal)	=	▲	=
Gordura Retroperitoneal	=	▲	▲
Gordura Retroperitoneal (% relativa à massa corporal)	=	▲	▲
Glicemia	=	=	=

Aumento (▲), diminuição (▼) ou similaridade (=) em relação aos controles.

Animais: normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

Os animais obesos MSG apresentam a massa corporal absoluta e comprimento naso-anal menores, enquanto o índice de Lee é maior que nos animais controles normais. O maior índice de Lee reflete a adiposidade no modelo MSG porque a razão da massa corporal em relação ao comprimento naso-anal é maior nos animais obesos MSG que nos animais controles normais. O menor comprimento naso-anal dos animais obesos MSG deve-se ao decréscimo na secreção do GH (BLOCH et al. 1984, SHAPIRO et al. 1986). No presente estudo observa-se que o

índice de Lee decai durante a privação de alimento dos animais normais, mas não dos obesos MSG, sugerindo maior dificuldade dos obesos em perder massa corporal no jejum, comparativamente aos animais normais.

Além do índice de Lee, comprimento naso-anal e massa corporal, utilizou-se a massa dos depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal como parâmetros comparativos entre animais controles normais e obesos MSG. Há diversas classificações para os depósitos de tecido adiposo. Alguns autores classificam-no como abdominal subcutâneo e intra-abdominal (JENSEN 1997, CHAN et al. 2004), sendo este último subdividido em gordura omental (visceral), mesentérica e retroperitoneal (WAJCHENBERG 2000). Vários trabalhos apontam o excesso de gordura visceral como sendo o principal problema relacionado à obesidade e subsequente síndrome metabólica (JENSEN 1997, WAJCHENBERG 2000, WAJCHENBERG et al. 2002, CHAN et al. 2004, DESPRÉS e LEMIEUX 2006). A obesidade induzida pelo tratamento neonatal com MSG, em ratos, é caracterizada como hipertrófica; i.e. há um aumento no conteúdo das células de gordura (REMKE et al. 1988, MACHO et al. 2000), o que implicaria na diferença no aspecto dos depósitos de gordura retroperitoneal, observada no presente trabalho, entre os animais normais e os tratados com MSG. Os resultados do presente estudo não evidenciaram diferença quantitativa significativa na massa absoluta dos depósitos de gordura periepididimal entre os tratamentos, apesar deste depósito visualmente parecer espalhar-se por uma área maior nos animais MSG, em relação aos controles. Trata-se de um resultado importante, pois deve significar que a afirmação de outros autores (MACHO et al. 2000, RACEK et al. 2001) quanto ao aumento da massa periepididimal em ratos obesos MSG é baseada no valor percentual relativo à massa corporal absoluta destes animais, comparado com a massa percentual relativa desse mesmo depósito nos animais controles e/ou, ainda, no aspecto visual e na distribuição local e não em sua medida (massa) absoluta. Deixando de considerar a ausência de diferença do valor absoluto

da massa periepídidimal entre animais normais e obesos MSG perde-se uma importante informação acerca das características diferenciais dos depósitos de gordura e de uma possível causa para o desenvolvimento de intolerância à glicose e resistência à insulina (HIRATA et al. 1997, MACHO et al. 2000, DOLNIKOFF et al. 2001), neste modelo experimental, conforme discutido nos parágrafos seguintes. A captação de glicose pela gordura periepídidimal e, conseqüentemente, o acúmulo de triacilglicerol na gota lipídica podem ser naturalmente menos eficientes, comparativamente a gordura retroperitoneal, e/ou podem estar prejudicados nos animais obesos MSG aos 90 dias de idade; isto antes do estabelecimento efetivo e mais tardio do diabetes melito tipo 2 nestes animais, pois conforme mostrado no presente estudo estes foram normoglicêmicos nesta faixa etária.

Quanto ao depósito de gordura retroperitoneal, os animais MSG e MSG privados de alimento apresentaram maior massa desta gordura que os controles, apesar de terem uma menor massa corporal absoluta. Da mesma forma que nos controles, em relação aos normais privados de alimento, a massa corporal absoluta dos ratos obesos MSG foi similar a dos MSG privados de alimento, mostrando que o regime de privação adotado não tem efeito sobre este parâmetro.

Os níveis de glicemia nos animais normais privados de alimento, MSG e MSG privados de alimento também não apresentaram diferenças em relação aos animais controles normais. Isso mostra que no balanço geral há normalidade da captação da glicose nos animais MSG, independentemente da privação de alimento. Essa normalidade justificar-se-ia pela maior sensibilidade dos adipócitos do depósito de gordura retroperitoneal dos animais MSG à insulina. Dessa forma, os adipócitos desse depósito captariam mais glicose que os do depósito periepídidimal, servindo de substrato para a formação de triacilglicerol e levando a um aumento da gota lipídica nessa célula e da massa deste depósito de gordura, observada nos animais MSG em relação aos animais controles normais. Considerando que o depósito de

gordura periepididimal seria menos sensível à insulina, o aumento do depósito de gordura retroperitoneal e a sobrecarga de sua função é que devem contribuir para o estabelecimento tardio do diabetes melito tipo 2 na condição de obesidade induzida por MSG (HIRATA et al. 1997, DOLNIKOFF et al. 2001), ou seja o aumento da quantidade da gordura retroperitoneal seria decisivo para a deterioração da sensibilidade à insulina e diminuição na secreção desse hormônio, gradativamente elevando a glicemia (SCHAWARTZ e PORTE 2005). Corroborar esta possibilidade o fato de que os níveis glicêmicos dos animais controles normais correlacionam-se negativamente tanto com a massa dos depósitos de gordura retroperitoneal quanto com o índice de Lee. Então, embora o aumento nos níveis de glicose plasmática possa ser inicialmente acompanhado por um aumento compensatório na secreção de insulina, esta capacidade das células β pancreáticas tende a esgotar-se ao longo do tempo. Ainda, neste sentido, foram observadas correlações lineares positivas entre depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal nos animais controle normais e normais privados de alimento, as quais não existem nos animais tratados com MSG e MSG privados de alimento, constituindo mais um achado que corrobora a tendência ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 por resistência à insulina nos obesos e que pode ter origem nos depósitos de gordura retroperitoneal. A análise de correlação também foi veemente em demonstrar como são deterioradas as inter-relações normais entre os parâmetros estudados neste modelo de obesidade, pois nenhuma das correlações detectadas nos animais normais se mantém em animais obesos MSG.

6.3. Atividade catalítica e expressões protéica e gênica de aminopeptidase neutra sensível e insensível à puromicina, CD13, dipeptidil peptidase IV sensível e insensível à diprotina e CD26

Além das alterações na biossíntese, deve-se considerar a eventual influência, causada por modulação, retroalimentação e/ou alterações na proteólise da proteína correspondente, na interpretação das alterações da atividade catalítica da aminopeptidase neutra e dipeptidil peptidase IV observadas entre os diferentes tratamentos. Por exemplo, a afinidade da aminopeptidase A (EC 3.4.11.7) por substratos sintéticos aminoacil-MCAs é modulada por cálcio (GOTO et al. 2008); a atividade leucil-aminopeptidase (EC 3.4.11.1) é retroalimentada negativamente pelo teor de vasopressina, a qual promove a translocação de sua forma solúvel para a membrana (MASUDA et al. 2003).

Quanto as divergências no sentido das alterações da atividade catalítica e expressão protéica observadas no presente estudo, em função dos diferentes tratamentos, deve-se considerar que alterações de conformação e danos ao tráfego intracelular, por modificações pós-traducionais, tal como a perda de sítios de glicosilação da dipeptidil peptidase IV (FAN et al. 1997), podem afetar a atividade catalítica, sem implicar em alterações da expressão protéica. Por outro lado, as proteínas CD13 e CD26 não apresentam somente funções catalíticas, de modo que sua expressão protéica não necessariamente implicaria em atividade catalítica. Por exemplo, a proteína CD13 é receptora do coronavírus humano (HCoV-229E) (WENTWORTH e HOLMES 2001, LI et al. 2007), enquanto a CD26 vem sendo apontada como receptora de plasminogênio (GONZALEZ-GRONOW et al. 2008).

Quanto às divergências no sentido das alterações das expressões protéica e gênica observadas no presente estudo, em função dos diferentes tratamentos, deve-se notar, obviamente, que a análise de PCR adotada não distingue a expressão das formas solúvel e membranal das proteínas sob estudo. Além disso, entre outros fatores, as divergências podem ser resultantes de degradação do RNA, como, por exemplo, pelos chamados microRNAs (miRNA). O miRNA é a classe de genes reguladores mais abundantes, ao menos 44 desses genes foram encontrados distribuídos por 13 regiões do SNC de camundongos, incluindo o

hipotálamo e hipocampo (BAK et al. 2008). Estudos recentes indicam que muitos miRNAs podem causar o rápido decaimento do mRNA alvo, reduzindo a quantidade de proteína traduzida pelo mRNA (SHYU et al. 2008). Além da degradação de RNA por miRNA, as divergências no sentido das alterações das expressões protéica e gênica observadas podem ser causadas por splicing alternativo. Após a transcrição, as moléculas de mRNA sofrem retirada de íntrons e junção de éxons (splicing). Porém, em aproximadamente 74% dos genes codificadores de proteínas, o que ocorre é o splicing alternativo, ou seja, a retirada diferencial de seqüências específicas de éxons do mRNA maduro. Uma forma crucial de geração de diversidade protéica é a variação de splices de um único transcrito, que pode produzir isoformas protéicas com funções distintas ou antagonistas (BLAUSTEIN et al. 2007).

Sobretudo, na interpretação comparativa dos resultados da atividade catalítica, ELISA, Western blotting, PCR e imuno-histoquímica é preciso considerar as diferentes sensibilidades de cada metodologia e a escolha de prioridades para o presente estudo, em função da qual adotou-se a abordagem mais aprofundada (expressão gênica e protéica) da aminopeptidase neutra insensível à puromicina/CD13 (menos abundante no SNC que a aminopeptidase neutral sensível à puromicina, conforme mostra o presente estudo), tendo em vista a perspectiva de continuidade do presente estudo com a aminopeptidase neutral sensível à puromicina e a incerteza quanto a identidade definitiva da aminopeptidase neutra insensível à puromicina com a CD13 (EC 3.4.11.2) no SNC. O estudo da CD26 (EC 3.4.14.5) também foi priorizado porque não havia certeza da identidade desta proteína com a dipeptidil peptidase IV no SNC.

Estudos adicionais serão necessários para abordar as possibilidades supramencionadas. Porém, independentemente da identificação gênica e protéica das atividades catalíticas sob estudo e dos mecanismos que induzem as alterações observadas, as alterações da atividade catalítica, sob determinado tratamento ou situação fisiopatológica, têm significado próprio,

dada sua implicação em alterações na degradação de peptídeos substratos relacionados, o que repercute na funcionalidade destes.

6.3.1. Aminopeptidase neutra

A influência da puromicina sobre a hidrólise do substrato sintético L-Ala- β -naftilamida corrobora dados da literatura que apontam a existência de duas diferentes atividades de aminopeptidase neutra no SNC (IRAZUSTA et al. 2003, LARRINAGA et al. 2005). Uma delas é sensível à puromicina (PSA, EC 3.4.11.14) e está presente nas frações solúvel e de membrana, a outra é insensível à puromicina (APM, EC 3.4.11.2) e está localizada exclusivamente na fração de membrana. O presente estudo mostrou que o inibidor canônico de dipeptidil peptidase IV, diprotina A, também diferencia as atividades aminopeptidase neutra sensível e insensível à puromicina, uma vez que diminuiu ou não afetou a atividade aminopeptidase neutra insensível à puromicina, mas aumentou a atividade aminopeptidase neutra sensível à puromicina no hipotálamo, hipocampo e plasma. Os níveis de atividade catalítica da aminopeptidase neutra sensível e da insensível à puromicina de animais controles normais também diferem, predominando a aminopeptidase neutra sensível à puromicina em ambas as frações e tecidos e a aminopeptidase neutra insensível à puromicina no plasma. A atividade aminopeptidase neutra sensível à puromicina foi predominante na fração solúvel no hipotálamo e hipocampo, enquanto a expressão protéica de CD13 foi predominante na fração de membrana do hipotálamo e na fração solúvel do hipocampo, em animais controles normais. As proteínas aminopeptidase neutra sensível e a insensível à puromicina apresentam homologia estrutural (CONSTAM et al. 1995), mas não se sabia se seriam reconhecidas pelo

anticorpo anti-CD13, embora genes distintos sejam responsáveis pela transcrição dos mRNA da aminopeptidase neutra sensível e da insensível à puromicina em humanos. O gene da aminopeptidase neutra sensível à puromicina está localizado no cromossomo 17 (17q21) e o gene da aminopeptidase neutra insensível à puromicina (CD13) está no cromossomo 15 (15q25-q26) (RIEMANN et al. 1999). Os resultados do presente estudo referem-se à expressão do gene da aminopeptidase neutra insensível à puromicina (NM_001150). Nada se sabe sobre a regulação da transcrição e tradução das aminopeptidases neutra sensível e insensível à puromicina e CD13 no SNC de animais obesos, mas alguns estudos mostram que em células endoteliais a transcrição do gene da aminopeptidase neutra insensível à puromicina é regulada pelo proto-oncogene c-Maf (HEDGE et al. 1998, MAHONEY et al. 2007). O c-Maf, em linfócitos T CD4⁺, é modulado por um miRNA, o MiR-155 (RODRIGUEZ et al. 2007).

6.3.1.1. Aminopeptidase neutra hipotalâmica

Tabela 15. Sumário das alterações encontradas para a aminopeptidase neutra hipotalâmica

	Aminopeptidase neutra hipotalâmica					
	Atividade catalítica			Western blotting APM/CD13		APM/CD13 mRNA
	PSA FS	PSA FM	APM	FS	FM	
C-P	▼	=	=	▲	▼	=
MSG	▼	=	=	▲	▼	▼
MSG-P	=	=	=	▲	▼	▼

Aumento (▲), diminuição (▼) ou similaridade (=) em relação aos controles.

Animais: normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

APM: aminopeptidase neutra insensível a puromicina; PSA: aminopeptidase neutra sensível à puromicina; FS: fração solúvel; FM: fração de membrana.

Tendo em vista os resultados sumarizados na Tabela 15, observa-se, em relação aos animais controles normais, concordância entre a diminuição da expressão protéica de CD13 membranal e gênica da aminopeptidase neutra insensível à puromicina nos animais MSG e MSG privados de alimento, os quais não apresentaram alterações da atividade aminopeptidase neutra membranal insensível à puromicina. Dessa forma, confirma-se que a proteína membranal expressa no hipotálamo corresponde à aminopeptidase neutra insensível à puromicina e apresenta teor reduzido, principalmente em função da condição de obesidade MSG (concordância com a expressão gênica), o qual não tem reflexo detectável em sua atividade catalítica de aminopeptidase neutra. Comparativamente aos animais controles normais, o aumento da expressão protéica de CD13 na fração solúvel dos animais normais privados de alimento e MSG privados de alimento, concomitantemente com a diminuição da atividade aminopeptidase neutra sensível à puromicina, indica que são proteínas distintas; ambas moduladas de forma oposta em função da condição de privação de alimento. Outro dado que diferencia as proteínas aminopeptidase neutra sensível e a insensível à puromicina é que a sensível está aumentada e a insensível inalterada ou inibida pela diprotina. Então, os dados obtidos mostram a existência de duas proteínas hipotalâmicas homólogas relacionadas com a aminopeptidase neutra: a aminopeptidase neutra insensível à puromicina (CD13) unida à membrana e a aminopeptidase neutra sensível à puromicina (solúvel e unida à membrana). Ainda, sugerem haver outra proteína solúvel estruturalmente similar a aminopeptidase neutra insensível à puromicina/CD13, que deve ser codificada por outro gene. Há um relato sobre a existência de uma aminopeptidase purificada, exclusivamente do SNC, denominada aminopeptidase neural, que também é sensível à puromicina, abundante no citoplasma e com reação cruzada com anticorpo anti-aminopeptidase neutra sensível à puromicina, mas cineticamente diferente desta (HUI et al. 1998). A diminuição da expressão protéica de CD13 observada na fração membranal do hipotálamo nos animais privados de alimento, MSG e

MSG privados de alimento, sem alteração da atividade peptidásica, sugere que essa proteína possa atuar como receptor, sem função catalítica. Ainda, como algumas aminopeptidases que fazem parte do MHC II, seu sítio imuno-reativo pode estar bloqueado (VILLADANGOS et al. 1999, 2000).

A aminopeptidase neutra sensível à puromicina, na fração solúvel hipotalâmica (não investigada, no presente estudo, quanto à expressão protéica e gênica), foi aquela cuja atividade catalítica de aminopeptidase neutra mostrou-se afetada pela privação de alimento, tanto nos animais normais quanto nos obesos MSG. A redução da atividade aminopeptidase neutra sensível à puromicina, na fração solúvel do hipotálamo destes animais, em relação aos controles normais, deve diminuir a degradação de peptídeos envolvidos na regulação do balanço energético como, por exemplo, somatostatina, opióides endógenos e vasopressina (BRAY 2000, VOLKOFF et al. 2005, COTA et al. 2006, BAVOUIIS e DAUZONNE 2006). Então, a redução da aminopeptidase neutra sensível à puromicina nos animais MSG seria um dos fatores determinantes do maior teor de opióides (orexígenos) detectado em obesos (JAROSZ et al. 2007) e, conseqüentemente, contribuiria com o desequilíbrio energético. Esta redução da aminopeptidase neutra sensível à puromicina, em relação aos animais controles normais, seria independente do teor de gordura retroperitoneal, pois esta correlaciona-se positivamente com esta atividade enzimática na fração solúvel do hipotálamo dos animais MSG. No caso dos animais normais privados de alimento, a redução da atividade aminopeptidase neutra sensível à puromicina condiz com a necessidade de ingestão de alimento (efeito orexígeno do aumento do teor de opióides). Durante a privação alimentar ocorre redução do gasto energético, da expressão do mRNA da leptina (diminui cerca de 50-80%, após 24 h de privação alimentar), do teor de peptídeos anorexígenos e, por sua vez, aumento da liberação de peptídeos orexígenos, inclusive de opióides (BECK 2006, MORAN 2006, CRANE et al. 2007). Além disso, a diminuição da aminopeptidase neutra sensível à

puromicina, observada nos animais obesos MSG, resultaria no aumento do teor de vasopressina e de angiotensina III no SNC. Sabe-se que no plasma de obesos há teores de angiotensina II elevados em relação a indivíduos normais (SEGURA e RUILOPE 2007) e que a conversão da angiotensina II em angiotensina III resulta em estímulo para a liberação de vasopressina (ZINI et al. 1996). Inclusive, ambas (vasopressina e angiotensina III) são fatores promotores de vasoconstrição (WEIHPRECHT et al. 1991) que podem contribuir para o desenvolvimento de hipertensão em obesos.

6.3.1.2. Aminopeptidase neutra hipocampal

Tabela 16. Sumário das alterações encontradas para a aminopeptidase neutra hipocampal

	Aminopeptidase neutra hipocampal					
	Atividade catalítica			Western blotting APM/CD13		APM/CD13 mRNA
	PSA FS	PSA FM	APM	FS	FM	
C-P	=	=	=	▲	▲	▲
MSG	=	=	=	=	▲	=
MSG-P	=	▲	=	=	▲	▲

Aumento (▲) ou similaridade (=) em relação aos controles.

Animais: normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

APM: aminopeptidase neutra insensível a puromicina; PSA: aminopeptidase neutra sensível à puromicina; FS: fração solúvel; FM: fração de membrana.

Confrontando os resultados sumarizados nas Tabelas 15 e 16, confirma-se que a proteína expressa no hipocampo corresponde à aminopeptidase neutra insensível à puromicina, a qual apresenta teor aumentado em função da privação de alimento (inclui-se a expressão gênica) e da condição de obesidade MSG que, por sua vez, também não tem reflexo detectável em sua atividade catalítica de aminopeptidase neutra.

O aumento da atividade aminopeptidase neutra sensível à puromicina membranal no hipocampo dos animais MSG privados de alimento, em relação aos controles, favorece a degradação de somatostatina e opióides. O hipocampo é reconhecido como uma importante área na modulação de comportamentos alimentares relacionados ao estado emocional (WANG et al. 2006, DAVIDSON et al. 2007). Por outro lado, a obesidade tem sido relacionada a doenças neurodegenerativas como o Alzheimer, na qual há degeneração hipocampal (RAZAY et al. 2006, WHITMER 2007). Neste sentido, este aumento de aminopeptidase neutra membranal sensível à puromicina pode ter relação com a neurodegeneração nos animais MSG. Há cada vez mais evidências de que a obesidade também exerce efeitos adversos no desempenho cognitivo (ELIAS et al. 2003, GUNSTAD et al. 2006). Por exemplo, homens idosos obesos parecem apresentar mais dificuldade na memória e fluência verbal (ELIAS et al. 2003). Além disso, a incidência de transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (ADHD) é elevada em indivíduos obesos e está relacionada ao índice de massa corporal (ALTFAS 2002, FASSINO et al. 2003). A somatostatina tem um papel neuroprotetor (FORLONI et al. 1997) e está envolvida com os processos de memória e aprendizagem (BOEHM e BETZ 1997, NAKAGAWASAI et al. 2000), com a regulação da proteína β -amilóide e, conseqüentemente, com a doença de Alzheimer (PANCHAL et al. 2004, IWATA et al. 2005, SAITO et al. 2005). A encefalina e a dinorfina também têm grande importância nos processos de aprendizagem e memória (SIMMONS e CHAYKIN 1996, DRAKE et al. 2007). Ainda, a estimulação gástrica em sujeitos obesos ativa regiões cerebrais, inclusive o hipocampo, envolvidas no desejo obsessivo/compulsivo pela droga, observado em viciados, o que sugere que os circuitos cerebrais envolvidos na motivação do uso de drogas sejam similares àqueles envolvidos com a motivação da ingestão alimentar (WANG et al. 2006). Os opióides endógenos, além de estarem envolvidos com comportamento alimentar (COTA et al. 2006), participam dos mecanismos centrais envolvidos na dependência

fisiológica (COTA et al. 2006) e compartilham os mesmos receptores com os opióides exógenos (DRAKE et al. 2007). Os opióides modulam a plasticidade sináptica e regulam a neurogênese hipocampal em adultos (SIMMONS e CHAYKIN 1996, DRAKE et al. 2007). Em indivíduos obesos, os níveis plasmáticos de opióides estão aumentados em relação a indivíduos normais (ATKINSON 1987). Considerando estes dados, a correlação positiva entre aminopeptidase neutra solúvel sensível à puromicina do hipocampo e a glicemia nos animais MSG privados de alimento, significa diminuição desta atividade enzimática na hipoglicemia (animais privados de alimento = hipoglicemia). Esta diminuição implica em redução do metabolismo de opióides, contribuindo com o aumento do teor destes peptídeos, adicionalmente àquele devido ao aumento de sua liberação (aumento do teor de opióides e de seu efeito orexígeno = vontade de ingerir alimento) na situação de privação alimentar (hipoglicemia) (MORAN 2006), na ausência (privação alimentar) do estímulo de recompensa (desejo obsessivo/compulsivo por alimento).

6.3.1.3. Aminopeptidase neutra plasmática

Tabela 17. Sumário da ausência de alterações da aminopeptidase neutra plasmática

	C-P	MSG	MSG-P
PSA PLASMA	=	=	=
APM PLASMA	=	=	=

Similaridade (=) em relação aos controles.

Animais: normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

PSA: aminopeptidase neutra sensível à puromicina; APM: aminopeptidase neutra insensível a puromicina.

Apesar da ausência de efeito dos tratamentos sobre os teores absolutos das atividades catalíticas de aminopeptidases neutra sensível e insensível à puromicina no plasma, as correlações destas atividades com vários outros parâmetros sob estudo são sugestivas. Por exemplo, no caso da aminopeptidase neutra insensível à puromicina a correlação negativa com o depósito de gordura retroperitoneal nos animais normais privados de alimento é um indicativo de que o elevado nível plasmático de hormônio do crescimento encontrado durante a privação alimentar (NØRRELUND et al 2002) esteja relacionado à modulação (redução) dos níveis de somatostatina circulante por esta enzima. Além da modulação pela aminopeptidase neutra insensível à puromicina, a presença da correlação positiva entre o comprimento naso-anal e a aminopeptidase neutra sensível à puromicina nos animais normais privados de alimento sugere que esta enzima também esteja envolvida na regulação da somatostatina, visto que o aumento dos seus níveis de atividade causaria a diminuição dos níveis de somatostatina, e conseqüentemente, o aumento do nível plasmático de hormônio do crescimento. O mecanismo de regulação do nível plasmático de hormônio do crescimento parece não ser ativado em animais com status energético em equilíbrio (animais controles normais), uma vez que nestes não há correlação entre o depósito de gordura retroperitoneal e esta enzima plasmática, sugerindo a existência de um limiar desencadeador do mecanismo de regulação do nível do hormônio do crescimento vinculado à duração da inanição. Sabe-se que o modelo experimental de obesidade adotado no presente estudo (e aqui confirmamos isto) ocasiona lesão hipotalâmica, a qual implica numa menor produção/liberação do hormônio liberador do hormônio do crescimento e, conseqüentemente, no decréscimo da secreção do hormônio do crescimento (BLOCH et al. 1984, SHAPIRO et al. 1986). DePAOLO e STEGER (1985) relatam que, neste modelo de obesidade, em comparação com animais normais, a concentração de somatostatina hipotalâmica e plasmática está reduzida; a tecidual, na região gastro-entero-hepática, está aumentada; e, mesmo com reposição hormonal do

hormônio do crescimento, os níveis plasmáticos de somatostatina não normalizam. Como não há correlação da aminopeptidase neutra plasmática insensível à puromicina com quaisquer dos parâmetros biométricos (gordura retroperitoneal, massa corporal e índice de Lee) nos obesos MSG, é possível que o controle da concentração de somatostatina do plasma pela aminopeptidase neutra insensível à puromicina esteja desabilitado em obesos.

6.3.1.4. Distribuição e análise densitométrica da imuno-reatividade a CD13

Sabe-se que a proteína aminopeptidase neutra sensível à puromicina está amplamente distribuída no hipotálamo, córtex, hipocampo, glândula pineal, entre outras regiões do SNC (ALPONTI et al. 2005, BANEGAS et al. 2006). O presente estudo avaliou a distribuição da CD13-ir no hipotálamo e no hipocampo, permitindo confirmar a presença de intensa CD13-ir nos corpos celulares de neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico hipotalâmico, onde observou-se um aumento da CD13-ir nos animais MSG, em relação aos animais controle. No núcleo paraventricular, CD13-ir nos animais controle e MSG, ambos privados de alimento, assim como nos animais obesos MSG, apresentou-se reduzida em relação aos animais controle. Ambos os núcleos, supraóptico e paraventricular, são responsáveis pela produção de vasopressina e ocitocina que, por sua vez, modulam a ingestão de alimento (BRAY 2000, VALASSI et al. 2008). Dessa forma, o aumento da CD13-ir no núcleo supraóptico dos animais MSG, sugere que a aminopeptidase neutra atue no sentido de estabilizar as concentrações de vasopressina em indivíduos obesos, enquanto que na privação alimentar, a diminuição da CD13-ir nos núcleos supraóptico e paraventricular dos animais normais e MSG, seria justificada pela diminuição dos níveis de vasopressina e de outros peptídeos

anorexígenos liberados pelo núcleo paraventricular. No núcleo periventricular ocorreu a diminuição de corpos celulares CD13-ir nos animais MSG privados de alimento, em relação aos animais controles. Neste núcleo há células em contato com o fluido cerebrospinal, que são sensíveis a alterações de osmolalidade e da concentração de neurotransmissores presentes no líquido cerebrospinal, um tipo filogeneticamente antigo de transmissão não sináptica (VIGH et al. 2004). No núcleo retroquiasmático a CD13-ir foi menor nos animais normais privados de alimento, em relação aos controles. Este núcleo apresenta neurônios CART estimulados pela leptina, os quais também co-expressam mRNA POMC (ELMQUIST 2001). A β -endorfina, derivado da hidrólise da molécula POMC, também é um substrato da aminopeptidase neutra insensível à puromicina/CD13 (FURUHASHI et al. 1988) e, portanto, a presença desta imuno-reatividade neste local tem justificativa fisiológica. Ainda, observou-se acentuada CD13-ir no núcleo arqueado, que é o núcleo mais importante na regulação do metabolismo energético (ARORA e ANUBHUTI 2006). O fato de que somente os animais normais e MSG, ambos privados de alimento, apresentaram diminuição na CD13-ir no núcleo arqueado, em relação ao controle, corrobora a hipótese de regulação de peptídeos anorexígenos pela proteína CD13. Esse núcleo possui receptores para peptídeos opióides (encefalinas e dinorfinas) e neurônios que expressam POMC (COTA et al. 2006). O hipocampo não apresentou CD13-ir em nenhum dos tratamentos avaliados no presente estudo, embora essa região esteja envolvida em processos de aprendizagem e memória e possua neurônios que expressam os dois principais peptídeos opióides endógenos, a encefalina e a dinorfina (substratos da APM/CD13), conhecidos por modularem a excitabilidade hipocampal e a neurogênese (DRAKE et al. 2007).

6.3.2. Dipeptidil peptidase IV

A diprotina A foi considerada até pouco tempo como um inibidor específico da atividade dipeptidil peptidase IV. No entanto, atualmente sabe-se que não há uma única enzima com atividade dipeptidil peptidase IV (MAES et al. 2007) e que estas também são inibidas pela diprotina, como é o caso da dipeptidil peptidase 8 e da dipeptidil peptidase 9 (QI et al.2003). Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que na presença de diprotina A ocorre inibição parcial da atividade dipeptidil peptidase IV nas frações solúvel e membranal do hipotálamo e hipocampo e no plasma, o que distingue a existência de duas atividades: dipeptidil peptidase IV sensível à diprotina (DPPIV-DS) e insensível à diprotina (DPPIV-DI). O inibidor da aminopeptidase neutra (puromicina) mostrou-se capaz de influenciar também a atividade dipeptidil peptidase IV total, especialmente nas frações solúvel e de membrana do hipotálamo e hipocampo (evidentemente em menor grau que para a aminopeptidase neutra sensível à puromicina). Nos animais controles normais, o nível de atividade catalítica de dipeptidil peptidase IV sensível e insensível à diprotina na fração solúvel não difere em ambos os tecidos, mas no plasma é maior para a insensível à diprotina. Porém, é notável que na fração de membrana de animais controles normais o nível de atividade catalítica difere entre os tecidos sob estudo, sendo menor no hipotálamo e maior no hipocampo para a dipeptidil peptidase IV sensível à diprotina, relativamente a dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina. A proteína CD26 (EC 3.4.14.5) apresenta homologia estrutural com dipeptidil peptidase 8 e dipeptidil peptidase 9 (não classificadas pelo “Enzyme Nomenclature Commission”) e com a proteína ativadora de fibroblastos α (FAP α) (EC 3.4.21.B28). No entanto, somente a dipeptidil peptidase 8 tem sido encontrada no SNC (FRERKER et al. 2007). No presente estudo, o anticorpo anti-CD26 (contra EC 3.4.14.5), utilizado no ELISA, é

monoclonal. Assim, os resultados de ELISA obtidos devem corresponder à CD26 canônica. Quanto à atividade catalítica, observa-se que nos animais controles normais há predominância da atividade dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina em relação à sensível à diprotina, e do teor de CD26 (ELISA) membranal do hipotálamo em relação a forma solúvel, enquanto que no hipocampo ocorre o inverso, ou seja, diminuição da atividade dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina em relação à sensível à diprotina, bem como diminuição do teor de CD26 (ELISA) membranal em relação a forma solúvel. Esses dados sugerem fortemente que a proteína CD26 é a que apresenta atividade dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina. Sabe-se que o gene da CD26 em humanos está localizado no cromossomo 2 (2q24.2) e o gene da dipeptidil peptidase 8 está no cromossomo 15 (15q22) (FRERKER et al. 2007), sendo que os resultados de PCR apresentados aqui referem-se à expressão do gene da CD26 (NM_012789.1). Já os resultados obtidos no Western blotting com anticorpo anti-CD26 policlonal podem corresponder a quaisquer dos homólogos da CD26. Gum et al. (2000) identificou uma região 5'-flanqueadora, o promotor da dipeptidil peptidase IV (ainda não identificado), de múltiplos conjuntos de elementos ligados ao DNA e fatores de transcrição, mas nada se sabe sobre a regulação da transcrição e tradução de dipeptidil peptidase IV no SNC de animais obesos. Cumpre notar que o presente estudo traz o primeiro relato sobre a distinção das atividades dipeptidil peptidase IV sensível e insensível à diprotina no SNC.

6.3.2.1. Dipeptidil peptidase IV hipotalâmica

Tabela 18. Sumário das alterações encontradas para a dipeptidil peptidase IV hipotalâmica

	Dipeptidil peptidase IV hipotalâmica								
	Atividade catalítica				CD26 ELISA (monoclonal)		Western blotting CD26 (policlonal)		CD26 mRNA
	DPPIV-DS FS	DPPIV-DS FM	DPPIV-DI FS	DPPIV-DI FM	FS	FM	FS	FM	
C-P	=	=	=	=	=	▼	▲	=	▲
MSG	=	=	▼	▼	▼	=	=	▲	=
MSG-P	▼	=	▼	=	▼	=	▲	=	=

Aumento (▲), diminuição (▼) ou similaridade (=) em relação aos controles.

Animais: normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

DPPIV-DS: dipeptidil peptidase IV sensível à diprotina; DPPIV-DI: dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina; FS: fração solúvel; FM: fração de membrana solubilizada.

Considerando os resultados sumarizados na Tabela 18, observa-se que o sentido das alterações das atividades catalíticas dipeptidil peptidase IV sensível e insensível à diprotina não se opõe ao sentido das alterações do teor de CD26 (ELISA), em ambas as formas, solúvel e membranal, o que sugere uma identidade comum. Nos animais controles normais a expressão gênica de CD26 é maior no hipocampo que no hipotálamo. No entanto, em fração membranal o teor de CD26 (ELISA) e a atividade catalítica de dipeptidil peptidase IV foram maiores no hipotálamo que no hipocampo. O teor de CD26 (ELISA) em fração solúvel também é maior no hipotálamo que no hipocampo. Portanto, a expressão gênica de CD26 não corresponde exatamente à sua completa expressão protéica no hipocampo. Observa-se também que o teor de CD26 (ELISA) membranal é maior que o solúvel no hipotálamo, enquanto que no hipocampo ocorre o inverso. Ainda, nos animais controles normais predomina a atividade catalítica dipeptidil peptidase IV insensível em relação à sensível à diprotina, tanto no hipotálamo quanto no hipocampo. Além de apontarem diferentes prevalências de cada uma das formas de dipeptidil peptidase IV estudadas (solúvel, membranal, sensível e insensível à diprotina A) nestas duas áreas cerebrais, esses dados sugerem fortemente que a proteína CD26 é a que apresenta atividade dipeptidil peptidase IV

insensível à diprotina. Tanto no hipotálamo como no hipocampo é preciso ainda considerar que as divergências quanto ao sentido das alterações de conteúdo de proteína e expressão gênica de CD26 e atividade catalítica dipeptidil peptidase IV discutidos nos tópicos seguintes são compatíveis com a conhecida função receptora das proteínas homólogas à CD26 transdutora de sinais intracelulares (MENTLEIN 2004, PACHECO et al. 2005, HAVRE et al. 2008). Sobretudo, este é o primeiro relato sobre a distinção de duas formas de atividade dipeptidil peptidase IV relacionadas à inibição por diprotina A no SNC.

O teor de atividade catalítica dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina no hipotálamo diminui nos animais obesos MSG (em ambas as formas, solúvel e membranal), acompanhado de alteração no mesmo sentido na proteína CD26, detectável em fração solúvel destes animais e também de animais obesos MSG privados de alimento, bem como em fração de membrana de animais normais privados de alimento, comparativamente aos controles. A alteração da dipeptidil peptidase IV sensível à diprotina em relação aos controles foi bem menos expressiva, ocorrendo seu decréscimo somente na fração solúvel em animais submetidos aos dois estímulos sob estudo (obesos MSG privados de alimento). As alterações de atividade catalítica de dipeptidil peptidase IV (principalmente do tipo insensível à diprotina) no hipotálamo devem promover alterações nos teores de neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo glucagon-símile tipo 1 e β -endorfina (GORRELL 2005, BJELKE et al. 2006, FRERKER et al. 2007). O neuropeptídeo Y e a β -endorfina estão aumentados em indivíduos obesos (DHILLO e BLOOM 2001, VOLKOFF et al. 2005, ARORA e ANUBHUTI 2006, SCHAWARTZ e PORTE Jr 2005). A atividade dipeptidil peptidase IV promove a hidrólise de neuropeptídeo Y (1-36) e gera o produto neuropeptídeo Y (3-36), o qual possui maior afinidade ao receptor Y2 (MENTLEIN 1999). O Y2, por ser um receptor principalmente pré-sináptico, modula (reduz) a liberação de neuropeptídeo Y (1-36) pelo neurônio pré-sináptico (BERGLUND et al. 2003, KAMIJI e INUI 2007) e o neuropeptídeo Y (3-36), por ter maior

afinidade com esse receptor, seria importante nessa modulação. Assim, a diminuição da atividade dipeptidil peptidase IV hipotalâmica deve contribuir com o desequilíbrio do balanço energético nas situações estudadas, pois permitiria um maior teor de neuropeptídeo Y (1-36) e β -endorfina.

6.3.2.2. Dipeptidil peptidase IV hipocampal

Tabela 19. Sumário das alterações encontradas para a dipeptidil peptidase IV hipocampal

	Dipeptidil peptidase IV hipocampal								
	Atividade catalítica				CD26 ELISA (monoclonal)		Western blotting CD26 (policlonal)		CD26 mRNA
	DPPIV-DS FS	DPPIV-DS FM	DPPIV-DI FS	DPPIV-DI FM	FS	FM	FS	FM	
C-P	=	▼	=	▲	▲	▲	▼	=	=
MSG	=	▼	=	▲	=	▲	▼	▼	=
MSG-P	▼	=	=	▲	▼	▲	▼	▼	=

Aumento (▲), diminuição (▼) ou similaridade (=) em relação aos controles.

Animais: normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

DPPIV-DS: dipeptidil peptidase IV sensível à diprotina; DPPIV-DI: dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina; FS: fração solúvel; FM: fração de membrana solubilizada.

Embora o hipotálamo seja identificado como a estrutura cerebral que está envolvida com o sensorimento da saciedade, adiposidade e fome, o processamento final desses sinais pode depender de regiões cerebrais envolvidas com controle comportamental, como, por exemplo, o hipocampo (DAVIDSON et al. 2007). O hipocampo recebe sinais do status energético vindos da periferia, via nervo vago (DAVIDSON et al. 2007) e possui grande densidade de receptores de neuropeptídeo Y (XAPELI et al. 2007) e de opióides (SIMMONS e

CHAVIKIN 1996, EVA et al. 2006). As alterações de atividade catalítica de dipeptidil peptidase IV hipocampal, sumarizadas na Tabela 19, podem ser relacionadas com a modulação do neuropeptídeo Y na situação de estresse. O neuropeptídeo Y tem um importante papel ansiolítico em estruturas límbicas, e sabe-se que o estresse causa o aumento da sua expressão e liberação (SAJDYK et al. 2004, ARORA e ANUBHUTI 2006, CARVAJAL et al. 2006). A atividade dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina solúvel e membranal no hipocampo dos animais normais privados de alimento apresentou correlação negativa com a massa corporal e, também, com o índice de Lee, enquanto os animais MSG privados de alimento apresentaram correlação positiva entre a dipeptidil peptidase IV membranal insensível à diprotina e o depósito de gordura periepídimal. Isso corrobora a hipótese de que o aumento da atividade de dipeptidil peptidase IV contribua com um aumento da ansiedade em indivíduos obesos privados de alimento. O aumento do teor de CD26 (ELISA) membranal do hipocampo (há também uma tendência ao aumento da atividade enzimática de dipeptidil peptidase IV) nos animais normais privados de alimento, MSG e MSG privados de alimento, em relação aos animais controles normais, também sugere que a dipeptidil peptidase IV possa estar relacionada ao estresse causado pela privação alimentar e obesidade (SCOTT et al. 2008a,b). No entanto, na fração membranal do hipocampo, um achado aparentemente paradoxal é que a mesma atividade catalítica de dipeptidil peptidase IV apresenta sentido oposto de alteração quando na presença de diprotina, i.e. a insensível à diprotina aumenta em animais normais privados de alimento, MSG e MSG privados de alimento, enquanto a sensível à diprotina diminui em animais normais privados de alimento e MSG privados de alimento, relativamente aos animais controles normais. Isto mostra que ambas as formas de dipeptidil peptidase IV, insensível e sensível à diprotina, são proteínas diferentes, apesar da atividade catalítica similar, indicando que estejam inter-relacionadas fisiologicamente, já que o aumento da atividade da forma insensível à diprotina (e teor de

CD26 ELISA) deve compensar a diminuição da forma sensível à diprotina (e teor de CD26 reconhecido pelo anticorpo policlonal) nos animais normais privados de alimento, MSG e MSG privados de alimento. Esta intrigante possibilidade pode estar relacionada à necessidade de um controle refinado e redundante nesta área crítica do SNC. Ainda, assim como no hipotálamo, divergências quanto ao sentido das alterações de expressão protéica e atividade catalítica de dipeptidil peptidase IV no hipocampo são compatíveis com a função receptora das proteínas homólogas à CD26.

6.3.2.3. Dipeptidil peptidase IV plasmática

Tabela 20. Sumário das alterações encontradas para a dipeptidil dipeptidase IV plasmática

Plasma	C-P	MSG	MSG-P
DPPIV-DS	=	=	=
DPPIV-DI	=	=	▼

Diminuição (▼) ou similaridade (=) em relação aos controles.

Animais: normais privados de alimento (C-P), tratados com glutamato monossódico (MSG) e tratados com glutamato monossódico e privados de alimento (MSG-P).

DPPIV-DS: dipeptidil peptidase IV sensível à diprotina; DPPIV-DI: dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina.

A diminuição do valor absoluto da atividade dipeptidil peptidase IV plasmática insensível à diprotina nos animais MSG privados de alimento em relação aos animais controles normais vem adicionar mais uma evidência sobre o papel desta atividade catalítica nos distúrbios metabólicos e reforçar importante achado anterior que mostrou que camundongos que não possuem dipeptidil peptidase IV estão protegidos contra obesidade e resistência a insulina (CONARELLO et al. 2003). Além desta alteração, o presente estudo mostra que a dipeptidil peptidase IV plasmática insensível à diprotina correlaciona-se com parâmetros biométricos

em obesos (massa corporal) e obesos privados de alimento (massa corporal, gordura periepídídima e índice de Lee). A falta de dipeptidil peptidase IV (CONARELLO et al. 2003) e a diminuição de seu teor plasmático (presente estudo) devem estar associados com alterações no teor plasmático dos vários peptídeos susceptíveis de hidrólise por esta enzima, por exemplo promovendo níveis elevados de GLP-1 e melhorando o controle metabólico, respectivamente em camundongos com genes de DPP-IV cronicamente silenciados e em jejum, comparativamente a ratos obesos MSG saciados.

6.3.2.4. Distribuição e análise densitométrica da imuno-reatividade a CD26

Apesar do destaque com que a CD26 vem sendo considerada nos últimos anos, devido ao papel terapêutico dos inibidores da atividade dipeptidil peptidase IV no diabetes tipo 2, não existem relatos anteriores sobre a distribuição da CD26 no SNC. No presente estudo, detectou-se CD26-ir nos núcleos arqueado, dorsomedial, periventricular, retroquiasmático e supraóptico hipotalâmicos. O núcleo arqueado é o núcleo mais importante na regulação do metabolismo energético (ARORA e ANUBHUTI 2006), pois sintetiza neuropeptídeo Y e possui receptores para leptina e insulina (ZIGMAN e ELMQUIST 2003, WYNNE et al. 2005, ARORA e ANUBHUTI 2006), os quais modulam a síntese e liberação de neuropeptídeo Y (ZIGMAN e ELMQUIST 2003, WYNNE et al. 2005, ARORA e ANUBHUTI 2006). Durante a privação alimentar ocorre o aumento de peptídeos orexígenos, entre eles os opióides e neuropeptídeo Y, substratos da dipeptidil peptidase IV, o que justificaria o aumento de CD26-ir neste núcleo. No entanto, os animais obesos MSG apresentaram diminuição da CD26-ir no núcleo arqueado, o que pode ser resultante da lesão causada pelo glutamato monossódico

neste núcleo nos animais obesos MSG. Ainda, evidenciou-se um aumento da CD26-ir nos animais MSG, em relação aos animais controles, no núcleo supraóptico, que é um dos núcleos responsáveis pela síntese de vasopressina. Sabe-se que o teor de neuropeptídeo Y encontra-se elevado em obesos (FRERKER et al. 2007) e altera a liberação de vasopressina (LEIBOWITZ 1991), justificando a presença de corpos celulares CD26-ir nesse núcleo. No núcleo periventricular hipotalâmico também observou-se o aumento de CD26-ir nos animais normais e MSG, ambos privados de alimento. Como mencionado anteriormente, esse núcleo possui neurônios em contato com fluido cerebrospinal e, portanto é sensível a alterações na composição desse fluido. O aumento de CD26-ir sugere o envolvimento dessa proteína na regulação do metabolismo energético durante a privação alimentar, visto que há um aumento do teor de peptídeos como neuropeptídeo Y e β -endorfina (ARORA e ANUBHUTI 2006, COTA et al. 2006). No núcleo retroquiasmático ocorre maior CD26-ir nos animais MSG e nos animais normais privados de alimento e uma redução da CD16-ir nos animais MSG privados de alimento. Este núcleo expressa mRNA POMC (ELMQUIST 2001). Como a dipeptidil peptidase IV hidrolisa β -endorfina, derivado da POMC (FURUHASHI et al. 1988), é provável que o aumento de CD26-ir neste núcleo também esteja relacionado com a atividade dipeptidil peptidase IV da CD26, mas neste local atuando no controle do conteúdo de β -endorfina. A CD26-ir no núcleo dorsomedial aumentou nos animais controle privados de alimento e diminuiu nos animais MSG privados ou não de alimento. Esse núcleo tem uma função integradora, visto que recebe projeções de vários outros núcleos hipotalâmicos, principalmente do núcleo arqueado (BERNARDIS e BELLINGER 1998, WYNNE et al. 2005). Assim, o aumento de CD26-ir observado nos animais normais privados de alimento indica que tal qual em alguns dos núcleos já citados, a CD26 atuaria no controle de peptídeos orexígenos, como o neuropeptídeo Y. No entanto, a lesão causada pelo MSG no núcleo arqueado dos animais obesos provavelmente causou a diminuição da CD26-ir no núcleo

dorsomedial, como consequência da diminuição das projeções vindas do núcleo arqueado, assim como do núcleo paraventricular. Da mesma forma, nota-se uma diminuição da CD26-ir também no núcleo paraventricular dos animais MSG, privados ou não de alimento. Este núcleo também recebe projeções do núcleo arqueado.

Observou-se CD26-ir no hipocampo somente nos animais controle normais, e em apenas duas regiões, a fímbria e o giro denteado. A fímbria é uma região rica em fibras nervosas e é importante para o transporte de sinais hipocampais para outras regiões do encéfalo, e a diminuição da CD26-ir nos animais normais privados de alimento, obesos MSG, privados ou não de alimento, provavelmente resulta em alterações na integração do hipocampo com outras regiões cerebrais. Já o giro denteado, além de sua importância nos processos de aprendizagem e memória, possui interneurônios GABAérgicos que contêm neuropeptídeo Y, o qual modula (reduz) a excitabilidade do hipocampo através dos receptores pré-sinápticos Y2 (SPERK et al. 2007), pelos quais o neuropeptídeo Y (3-36) (resultante da hidrólise do neuropeptídeo Y (1-36) pela dipeptidil peptidase IV) possui maior afinidade. Dessa forma, a diminuição da CD26-ir no hipocampo dos animais normais privados de alimento e obesos MSG, privados ou não de alimento, pode levar a um aumento da excitabilidade hipocampal devido a diminuição dos teores de neuropeptídeo Y (3-36).

Outro achado interessante foi a presença de corpos celulares CD26-ir na pia-máter, a meninge mais interna (delgada e recobre toda a superfície do encéfalo, adentrando nas fissuras corticais) e rica em astrócitos. CD26-ir apresenta-se reduzida nesta meninge de animais normais privados de alimento e obesos MSG, privados ou não de alimento, em relação aos animais controles. Os astrócitos são importantes células da neuroglia e possuem diversas funções, entre elas a regulação de neurotransmissores por meio de proteínas transportadoras ancoradas a membrana que removem neurotransmissores da fenda sináptica, como é o caso dos transportadores de glutamato (LEE et al. 2007).

6.3.3. Correlações entre as atividades enzimáticas da aminopeptidase neutra sensível e insensível à puromicina e dipeptidil peptidase IV sensível e insensível à diprotina A.

As atividades catalíticas de dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina e aminopeptidase neutra sensível à puromicina, na fração solúvel do hipotálamo, nos animais controles normais, correlacionam-se positivamente. Nos animais normais privados de alimento, correlacionam-se positivamente as atividades dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina e aminopeptidase neutra sensível à puromicina, na fração de membrana do hipotálamo e na fração solúvel do hipocampo. Este padrão de inter-relação sugere a tendência de ação sinérgica dessas atividades (dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina e aminopeptidase neutra sensível à puromicina), especialmente hipotalâmicas, na condição de normalidade fisiológica, independentemente da privação de alimento. Nos animais normais privados de alimento também correlacionam-se positivamente as atividades dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina e dipeptidil peptidase IV sensível à diprotina, e dipeptidil peptidase IV sensível à diprotina e aminopeptidase neutra sensível à puromicina, na fração de membrana do hipotálamo. No plasma dos animais normais privados de alimento, correlacionam-se negativamente as atividades dipeptidil peptidase IV sensível à diprotina e aminopeptidase neutra sensível à puromicina. Este padrão de inter-relação sugere a privação de alimento como fator independente que influencia, no mesmo sentido, as atividades membranaís de dipeptidil peptidase IV sensível e insensível à diprotina e aminopeptidase neutra sensível à puromicina no hipotálamo, e a possível ação antagônica de dipeptidil peptidase IV sensível à diprotina e aminopeptidase neutra sensível à puromicina circulantes na situação de privação

alimentar. As atividades aminopeptidase neutra sensível e insensível à puromicina correlacionam-se positivamente na fração de membrana do hipocampo dos animais obesos MSG. As atividades aminopeptidase neutra sensível à puromicina e dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina correlacionam-se positivamente na fração de membrana do hipocampo dos animais MSG privados de alimento. Este padrão de inter-relação sugere a obesidade MSG como fator independente que influencia, no mesmo sentido, as atividades membranaais de aminopeptidase neutra sensível e insensível à puromicina e dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina, no hipocampo. No caso deste padrão de inter-relação observado no hipocampo dos animais obesos MSG, é notável a concordância com (i) a ação hidrolítica da dipeptidil peptidase IV insensível à diprotina sobre o neuropeptídeo Y (1-36), formando neuropeptídeo Y (3-36), e o seu significado fisiológico, i.e. maior afinidade do neuropeptídeo Y (3-36) pelo receptor Y2 (BIJAK 1999), promovendo efeito ansiogênico (CARVAJAL et al. 2006a); e (ii) com a ação hidrolítica das aminopeptidases neutra sensível e insensível à puromicina e dipeptidil peptidase IV sobre a β -endorfina (FURUHASHI et al. 1988) e, ainda, das aminopeptidases neutra sensível e insensível à puromicina sobre outros opióides (SAFAVI e HERSH 1995, SONG e MARVIZON 2003, LUAN e XU 2007), cujo significado fisiológico deve relacionar-se com prejuízos às sensações de recompensa e bem-estar (ESCH e STEFANO 2004, COTA et al. 2006).

7. Distribuição e análise densitométrica da imuno-reatividade a Fos

Sabe-se que a imuno-reatividade a Fos está aumentada nos núcleos hipotalâmicos supramamilar e dorsomedial de camundongos obesos e na parte mediana do núcleo

perifornical hipotalâmico de camundongos magros, após privação de alimento (HUANG & WANG 1998). No presente trabalho, observou-se uma diminuição da Fos-ir no núcleo dorsomedial nos animais obesos MSG, privados ou não de alimento. O modelo experimental utilizado no presente estudo causa lesões no núcleo arqueado (LEIGH et al. 1992, DOLNIKOFF et al. 2001), o que deve justificar o resultado contraditório observado no núcleo dorsomedial nestes animais. Além disso, foi relatado que uma dieta de gorduras saturadas modula a atividade neuronal hipotalâmica, avaliada pela imuno-reatividade a Fos, num padrão consistente com seus efeitos obesogênicos (WANG et al. 1999). O núcleo ventromedial também apresentou diminuição da Fos-ir nos animais normais privados de alimento, obesos MSG, privados ou não de alimento, em relação aos controles, provavelmente por estes animais não estarem saciados, já que o núcleo ventromedial é conhecido com centro da saciedade. A ativação do núcleo arqueado nos animais tratados com MSG e privados de alimento foi menor em relação aos animais controle, sugerindo uma diminuição da produção de peptídeos anorexígenos e orexígenos, provavelmente prejudicada em função da lesão nesse núcleo. Os núcleos paraventricular, retroquiasmático e supraóptico apresentaram diminuição da Fos-ir nos animais normais privados de alimento, MSG e MSG privados de alimento, resultando na diminuição da produção dos peptídeos orexígenos ou anorexígenos por esses núcleos. Nos animais normais ou tratados não ocorreu Fos-ir no hipocampo.

8. Aspectos comparativos da ativação neuronal e glial e da distribuição de CD13 e CD26 na obesidade induzida por MSG e na privação alimentar

O mesmo sentido de alteração entre os teores de Fos-ir e CD13 (ambos diminuíram) ocorreu no núcleo paraventricular hipotalâmico dos animais normais privados de alimento,

MSG e MSG privados de alimento, no núcleo periventricular hipotalâmico dos animais MSG privados de alimento e nos núcleos arqueado e supraóptico dos animais normais privados de alimento e MSG privados de alimento, o que pode significar uma menor produção de CD13 e/ou provavelmente de peptídeos anorexigênicos. Por exemplo, ocitocina, vasopressina e hormônio liberador de tireotrofina são produzidos no núcleo paraventricular (VALASSI et al. 2008) e já é conhecido que durante a privação alimentar ocorre uma diminuição do teor de peptídeos anorexigênicos (BERTILE et al. 2003), sendo que o decréscimo de CD13-ir deve contribuir no estabelecimento deste teor neste núcleo.

No presente estudo os teores de Fos-ir e CD26 tiveram o mesmo sentido de alteração (ambas diminuíram) no núcleo dorsomedial dos animais MSG privados de alimento, no núcleo paraventricular dos animais MSG e MSG privados de alimento, no núcleo retroquiasmático dos animais MSG privados de alimento e no núcleo supraóptico dos animais normais privados de alimento e MSG privados de alimento. Essa diminuição também pode ser interpretada no sentido de uma menor produção de CD26 e/ou do teor de peptídeos produzidos nessas áreas.

Sentidos opostos de alteração entre os teores de Fos-ir e CD13 ocorreram no núcleo supraóptico dos animais MSG e no núcleo retroquiasmático dos animais MSG e MSG privados de alimento, enquanto Fos-ir e CD26 apresentaram sentidos opostos de alterações no núcleo retroquiasmático dos animais normais privados de alimento e MSG, no núcleo arqueado dos animais normais privados de alimento, MSG e MSG privados de alimento, no núcleo periventricular dos animais normais privados de alimento, MSG e MSG privados de alimento, no núcleo paraventricular dos animais normais privados de alimento, no núcleo supraóptico dos animais MSG e no núcleo dorsomedial dos animais normais privados de alimento. Uma das explicações para isso seria a existência de regulações de CD13 e CD26

(para baixo e para cima) induzidas nessas situações por células com expressão alterada de Fos-ir nessas áreas cerebrais.

9. Quadro geral dos resultados obtidos e implicações sugeridas

Resultados	Implicações
inalteração da massa absoluta do depósito de gordura periepídídimal dos obesos MSG em relação aos animais controles normais	- menor captação de glicose e do preenchimento da gota lipídica periepídídimal em relação a retroperitoneal - tendência para o desenvolvimento de resistência à insulina, em função da maior exigência (compensatória) deste hormônio pela gordura retroperitoneal aumentada nos obesos MSG
aumento da massa dos depósitos de gordura retroperitoneal dos obesos MSG em relação aos animais controles normais	hipertrofia da gordura retroperitoneal é a principal manifestação da obesidade MSG
glicemia inalterada entre os tratamentos sob estudo	Funcionamento normal do mecanismo de captação de glicose no obeso MSG e na privação de alimento
identidade da APM com a CD13	APM/CD13 predominantemente unida à membrana no hipotálamo e predominantemente solúvel no hipocampo
identidade da PSA	distinta da APM e predominantemente solúvel; existência de mais de um homólogo distinto da APM
identidade da DPPIV-DI com a CD26	DPPIV/CD26 é insensível à diprotina e predominantemente unida à membrana no hipotálamo e predominantemente solúvel no hipocampo
DPPIV-DS não identificada	DPPIV sensível à diprotina no hipotálamo e hipocampo (predominantemente unida à membrana) pode ser DPP2 ou DPP8
redução da atividade PSA (solúvel) do hipotálamo em privados de alimento e obesos MSG	aumento do teor de peptídeos orexígenos (opiídeos), AVP e somatostatina
aumento da atividade PSA (membranar) do hipocampo em obesos MSG privados de alimento	diminuição do teor de AVP, somatostatina e peptídeos orexígenos (opiídeos) relacionada a efeitos anorexígenos, neurodegenerativos e deletérios na aprendizagem e memória
diminuição da atividade DPPIV-DI (solúvel e membranar) e DPPIV-DS (solúvel) do hipotálamo em obesos MSG e obesos MSG privados de alimento	aumento do teor de peptídeos orexígenos (NPY) relacionada a efeito deletério no balanço energético
alterações antagônicas da atividade DPPIV DI e DS (membranar) do hipocampo de privados de alimento e obesos privados ou não de alimento	mecanismo compensatório para a manutenção do teor de peptídeos orexígenos (NPY) (balanço entre efeito ansiogênico e ansiolítico)
alterações da expressão protéica de CD13 sem alteração da atividade catalítica APM em privados de alimento e obesos MSG privados ou não de alimento	população alterada de receptores CD13?
alterações da expressão protéica de CD26 sem alteração da atividade catalítica DPPIV-DI e DS em privados de alimento e obesos MSG privados ou não de alimento	população alterada de receptores CD26?
aumento de CD13-ir no SO dos animais obesos	possível relação com os níveis de AVP
aumento de CD26-ir no SO dos animais obesos	possível regulação da ação do NPY sobre a AVP
redução da ativação neural no PVN, RCh e SO dos animais normais privados de alimento, obesos MSG privados ou não de alimento	diminuição da produção de peptídeos anorexígenos ou orexígenos

10. PERSPECTIVAS

O presente trabalho caracterizou as peptidases estudadas e sua relação com a obesidade e privação alimentar. Vários aspectos desta integração necessitam ser aprofundados, tais como, avaliação de alterações conformacionais e regulação da tradução e transcrição gênica da APM, PSA e enzimas DPPIV-símbles no SNC, nas condições de obesidade MSG e privação alimentar, a fim de esclarecer quais os mecanismos que induzem as alterações na atividade catalítica destas peptidases; quantificação dos substratos peptídicos relacionados à APM, PSA e DPPIV, no hipotálamo e hipocampo, e avaliação de possíveis alterações nas propriedades de binding destes substratos aos seus receptores, nestes tecidos, nas condições de obesidade MSG e privação de alimento. Além disso, requer investigação o envolvimento de peptidases, dentre elas a APM, PSA e as DPPIV-símbles no metabolismo do tecido adiposo nas condições de obesidade MSG e privação de alimento, e nas alterações dessas atividades mediante a incubação com peptídeos relevantes para o metabolismo deste tecido.

11. CONCLUSÕES

- ✓ Massa corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee e massa dos depósitos de gordura retroperitoneal alteram-se de forma correlacionada na obesidade induzida por MSG e na privação alimentar, compondo um padrão compatível com as principais características descritas deste modelo experimental. A gordura periepididimal acumulada nos obesos MSG diferencia-se dos controles pela extensão e pela massa relativa, mas não pela massa absoluta. A relação dos níveis de gordura retroperitoneal e periepididimal com a glicemia sugere que a tendência ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 no obeso MSG deve-se ao aumento da gordura retroperitoneal.
- ✓ As atividades catalíticas de PSA e DPPIV-DI e -DS, mas não a APM, bem como as expressões gênica e protéica de CD13 e CD26 no hipotálamo e hipocampo são alteradas em obesos MSG e em privados de alimento, demonstrando envolvimento na regulação endócrina central do balanço energético (provavelmente via atuação sobre NPY, SRIF e opióides). No hipocampo, o padrão destas alterações é compatível com efeito deletério sobre o processo de memória e aprendizado (PSA e APM) e comportamento emocional (DPPIV-DI e DS).
- ✓ No hipotálamo e hipocampo do rato, a atividade enzimática APM corresponde à proteína CD13, distinta da PSA, em conformidade com a literatura. Porém, a atividade enzimática DPPIV-DI corresponde a proteína CD26 canônica, contrariando o conceito corrente de que a DPPIV canônica é sensível ao inibidor diprotina.

- ✓ A APM (forma predominante da aminopeptidase neutra no plasma) parece relacionada à privação alimentar. O decréscimo da DPPIV-DI (forma predominante da DPPIV no plasma) parece ser uma resposta homeostática associada à privação alimentar em ratos obesos MSG.
- ✓ CD13-ir e CD26-ir estão amplamente distribuídas no hipotálamo. Em todos os tratamentos a presença de ambas coincide com a presença de Fos-ir no Pe e ArcNH, regiões relevantes na regulação do metabolismo energético.
- ✓ As alterações qualitativas e/ou quantitativas da distribuição da imuno-reatividade à CD13 e à CD26 na obesidade induzida por MSG e na privação alimentar são concordantes com as alterações de atividade peptidásica e reforçam a hipótese do envolvimento dessas proteínas na regulação do metabolismo energético.

❖ Proteínas com atividades de aminopeptidase neutra e dipeptidil peptidásica do tipo IV e/ou homólogas à CD13 ou CD26 são fatores fisiopatológicos e potenciais alvos farmacológicos em distúrbios do metabolismo energético.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott CA, Yu DM, Woollatt E, Sutherland GR, McCaughan GW, Gorrell MD. Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *Eur J Biochem* 267: 6140-6150, 2000.
- Alfalah M, Krahn MP, Wetzel G, von Hörsten S, Wolke C, Hooper N, Kalinski T, Krueger S, Naim HY, Lendeckel U. A mutation in aminopeptidase N (CD13) isolated from a patient suffering from leukemia leads to an arrest in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 281(17):11894-900, 2006.
- Alonso E, Garrido E, Díez-Fernández C, Pérez-García C, Herradón G, Ezquerro L, Deuel TF, Alguacil LF. Yohimbine prevents morphine-induced changes of glial fibrillary acidic protein in brainstem and α_2 -adrenoceptor gene expression in hippocampus. *Neuroscience Letters* 412: 163-167, 2007.
- Alponti RF, Zambotti-Villela L, Murena-Nunes C, Marinho CE, do Amaral Olivo R, Silveira PF. Cystyl aminopeptidase activity in the plasma, viscera and brain of the snake *Bothrops jararaca*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 141(3):336-52, 2005
- Altfas J. Prevalence of attention deficit/hyperactivity disorder among adults in obesity treatment. *BMC Psychiatry* 2:9, 2002.
- Anderwald C, Muller G, Koca G, Fornsinn C, Waldhausl W, Roden M. Short-term leptin-dependent inhibition of hepatic gluconeogenesis is mediated by insulin receptor substrate-2. *Mol Endocrinol* 16: 1612-1628, 2002.
- Antón LC, Villasevil EM. Is there an alternative to the proteasome in cytosolic protein degradation? *Biochem Soc Trans* 36(Pt 5):839-42, 2008.
- Aoyagi T, Birumachi J, Hiroshima M, Fujiwara Y, Sanbe A, Yamauchi J, Tanoue A. Alteration of glucose homeostasis in V1a vasopressin receptor-deficient mice. *Endocrinology* 148:2075-2084, 2007.
- Appleyard SM, Hayward M, Young JJ, Butler AA, Cone RD, Rubinstein M, Low MJ. A role for the endogenous β -endorphin in energy homeostasis. *Endocrinology* 144(5):1753-60, 2003.
- Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity – A review. *Neuropeptides* 40: 375-401, 2006.
- Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, Ueno N, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Nijima A, Meguid MM, Kasuga M. Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology* 124: 1325-1336, 2003.
- Atkinson RL. Opioid regulation of food intake and body weight in humans. *Fed Proc* 46(1):178-82, 1987.
- Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132(6): 2131-57, 2007.
- Bak M, Silahatoglu A, Møller M, Christensen M, Rath MF, Skryabin B, Tommerup N, Kauppinen S. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA*, 2008, in press.
- Ballantyne GH. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part I. Distribution, release and actions. *Obes Surg* 16(5):651-8, 2006.
- Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Segarra AB, Hermoso F, Durán R, Ramírez M. Brain aminopeptidases and hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7(3):129-34, 2006.

- Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press 1998.
- Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* 349: 941-948, 2003.
- Batterham RJ, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Coehn MA, Dakin CJ, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418: 650-654, 2002.
- Bauvois B, Dauzonne D. Aminopeptidase N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Medicinal Research Reviews* 26(1):88-130, 2006.
- Beck B. Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Phil. Trans. R. Soc. B* 361: 1159–1185, 2006.
- Berglund MM, Hipskind PA, Gelert DR. Recent developments in our understanding of the physiological role of PP-fold peptide receptor subtypes. *Exp Biol Med* 228: 217-244, 2003.
- Bergmeyer HU, Brent E. Assay with pyruvate and NADH. In *Methods in enzymatic analysis*. London: Academic Press Inc., volume 2, pp 574-577, 1972.
- Bernardis LL, Bellinger LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Proc Soc Exp Biol Med* 218: 284-306, 1998.
- Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 40: 527-528, 1968.
- Bertile F, Oudart H, Criscuolo F, Maho YL, Raclot T. Hypothalamic gene expression in long-term fasted rats: relationship with body fat. *Biochem Biophys Res Commun* 303(4):1106-13, 2003.
- Bhutani N, Venkatraman P, Goldberg AL. Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasomes during protein degradation. *EMBO J* 26:1385-1396, 2007.
- Bijak M. Neuropeptide Y suppresses epileptiform activity in rat frontal cortex and hippocampus in vitro via different NPY receptor subtypes. *Neurosci Lett* 25;268(3):115-8, 1999.
- Bilkei-Gorzo A, Racz I, Michel K, Mauer D, Zimmer A, Klingmüller D, Zimmer A. Control of hormonal stress reactivity by the endogenous opioid system. *Psychoneuroendocrinology* 33(4):425-36, 2008.
- Bjelke JR, Christensen J, Nielsen PF, Branner S, Kanstrup AB, Wagtmann N, Rasmussen HB. Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. *Biochem J* 396:391-399, 2006.
- Blaustein M, Pelisch F, Srebrow A. Signals, pathways and splicing regulation. *Int J Biochem Cell Bio* 39(11):2031-48, 2007.
- Bloch B, Ling N, Benoit R, Wahrenberg WB, Guillemin R. Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. *Nature* 307: 272-273, 1984.
- Blume A, Undeutsch G, Zhao Y, Kaschina E, Culman J, Unger T. ANG III induces expression of inducible transcription factors of AP-1 and Krox families in rat brain. *Am J Physiol, Regul Integr Comp Physiol* 289:845-850, 2005.

- Boehm S, Betz H. Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *J. Neurosci* 17(11): 4066-4075, 1997.
- Boelen A, Wiersinga WM, Fliers E. Fasting-Induced Changes in the Hypothalamus–Pituitary–Thyroid Axis. *Thyroid*. 18(2):123-129, 2008.
- Bracci L, Falciani C, Lelli B, Lozzi L, Runci Y, Pini A, De Montis MG, Tagliamonte A, Neri P. Synthetic peptides in the form of dendrimers become resistant to protease activity. *J Biol Chem* 278:46590-46595, 2003.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
- Brandt I, Joossens J, Chen X, Maes MB, Scharpe S, De Meester I, Lambeir AM. Inhibition of dipeptidyl-peptidase IV catalyzed peptide truncation by Vildagliptin ((2S)-{[(3-hydroxyadamantan-1-yl)amino]acetyl}-pyrrolidine-2-carbonitrile). *Biochem Pharmacol* 70: 134-143, 2005.
- Bray GA. Afferent signals regulating food intake. *Proc Nutr Soc*. 59(3):373-84, 2000.
- Bray GA. Hypothalamic and genetic obesity. An appraisal of the autonomic hypothesis and the endocrine hypothesis. *Int J Obes* 8 (suppl. 1): 119-137, 1984.
- Bray GA, Inoue S, Nishizawa Y. Hypothalamic obesity. The autonomic hypothesis and the lateral hypothalamus. *Diabetologia* 20: 366-377, 1981.
- Broglio F, Gottero C, Arvat E, Ghigo E. Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. *Horm Res* 59: 109-117, 2003.
- Brubaker PL, Drucker DJ. Structure-function of the glucagon receptor family of G protein-coupled receptors: the glucagon, GIP, GLP-1, and GLP-2 receptors. *Receptors Channels* 8: 179-188, 2002.
- Bunyan J, Murrel EA, Shah PP. The induction of obesity in rodents by means of monosodium glutamate. *British J Nutrition* 35: 25-39, 1976.
- Burcelin R, Cani PD, Knauf C. Glucagon-like peptide-1 and energy homeostasis. *J Nutr* 137(11 Suppl):2534S-2538S, 2007.
- Burgos-Ramos E, Hervás-Aguilar A, Aguado-Llera D, Puebla-Jiménez L, Hernández-Pinto AM, Barrios V, Arilla-Ferreiro E. Somatostatin and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 (no prelo).
- Cagampang FR, Maeda K, Yokoyama A, Ota K. Effect of food deprivation on the pulsatile LH release in the cycling and ovariectomized female rat. *Horm Metab Res* 22: 269-272, 1990.
- Calbo S, Guichard G, Muller S, Kourilsky P, Briand JP, Abastado JP. Antitumor vaccination using a major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted pseudopeptide with reduced peptide bond. *J Immunother* 23: 125-130, 2000.
- Camiña JP, Carreira MC, Micic D, Pombo M, Kelestimir F, Dieguez C, Casanueva FF. Regulation of ghrelin secretion and action. *Endocrine*. 22(1):5-12, 2003.
- Carvajal C, Dumont Y, Quirion R. Neuropeptide Y: role in emotion and alcohol dependence. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(2):181-95, 2006b.
- Carvajal C, Dumont Y, Herzog H., Quirion R. Emotional behavior in aged neuropeptide Y (NPY) Y2 knockout mice. *J Mol Neurosci* 28(3):239-45, 2006a.

- Chan DC, Watts GF, Sussekov AV, Barrett PHR, Yang Z, Hua J, Song S. Adipose tissue compartments and insulin resistance in overweight-obese Caucasian men. *Diab Res Clin Prat*. 63:77-85, 2004.
- Chelikani PK, Ambrose JD, Keisler DH, Kennelly JJ. Effect of short-fasting on plasma concentrations of leptin and other hormones and metabolites in dairy cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 26:33-48, 2004.
- Chen ZY, Feng GG, Nishiwaki K, Shimada Y, Fujiwara Y, Komatsu T, Ishikawa N. Possible roles of neuropeptide Y Y3-receptor subtype in rat aortic endothelial cell proliferation under hypoxia, and its specific signal transduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293(2):H959-67, 2007.
- Chen L, Gao Z, Zhu J, Rodgers GP. Identification of CD13(+)CD36(+) cells as a common progenitor for erythroid and myeloid lineages in human bone marrow. *Exp Hematol* 35(7):1047-1055, 2007.
- Conarello SL, Li Z, Ronan J, Roy RS, Zhu L, Jiang G, Liu F, Woods J, Zycband E, Moller DE, Thornberry NA, Zhang BB. Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(11):6825-30, 2003.
- Constam DB, Tobler AR, Rensing-Ehl A, Kemler I, Hersch LB, Fontana A. Puromycin-sensitive aminopeptidase. Sequence analysis, expression, and functional characterization. *J Biol Chem* 270: 26931–26939, 1995.
- Cota D, Tschöp MH, Horvath TL, Levine AS. Cannabinoids, opioids and eating behavior: The molecular face of hedonism? *Brain Res Rev* 51: 85-107, 2006.
- Cowburn AS, Sobolewski A, Reed BJ, Deighton J, Murray J, Cadwallader KA, Bradley JR, Chilvers ER. Aminopeptidase N (CD13) regulates tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in human neutrophils. *J Biol Chem* 281(18):12458-67, 2006.
- Crane C, Akhter N, Johnson BW, Iruthayanathan M, Syed F, Kudo A, Zhou YH, Childs GV. Fasting and Glucose Effects on Pituitary Leptin Expression: Is Leptin a Local Signal for Nutrient Status? *J Histochem Cytochem* 55(10):1059-73, 2007.
- Cunningham DF, O'Connor B. Proline specific peptidases. *Biochim Biophys Acta* 1343: 160-186, 1997.
- Davidson TL, Kanoski SE, Schier LA, Clegg DJ, Benoit SC. A potential role for the hippocampus in energy intake and body weight regulation. *Current Opinion in Pharmacology*, 7:613–616, 2007.
- Danziger RS. Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart Fail Rev*. 13(3):293-8, 2008.
- Deacon CF. Circulation and degradation of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res* 36(11-12): 761-5, 2004.
- de Gortari P, Romero F, Cisneros M, Joseph-Bravo P. Acute administration of alcohol modulates pyroglutamyl amino peptidase II activity and mRNA levels in rat limbic regions. *Neurochem Int* 46(4):347-56, 2005.
- Denning GM, Ackermann LW, Barna TJ, Armstrong JG, Stoll LL, Weintraub NL, Dickson EW. Proenkephalin expression and enkephalin release are widely observed in non-neuronal tissues. *Peptides* 29(1):83-92, 2008.
- DePaolo LV, Steger RW. Alterations in immunoreactive somatostatin levels in hypothalamic and gastroenteropancreatic tissue as a consequence of neonatal treatment with monosodium glutamate. *Proc Soc Exp Biol Med*. 178(3):419-25, 1985.
- Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 44, Dec 14, 881-87, 2006.

- Dhillon WS. Appetite regulation: an overview. *Thyroid* 17(5):433-45, 2007.
- Dhillon WS, Bloom SR. Hypothalamic peptides as drug targets for obesity. *Curr Opin Pharm*. 1: 651-55, 2001.
- Dinardo LA, Travers JB. Distribution of fos-like immunoreactivity in the medullary reticular formation of the rat after gustatory elicited ingestion and rejection behaviors. *J Neurosci* 17: 3826-3839, 1997.
- Dolnikoff M, Martin-Hidalgo A, Machado UF, Lima FB, Herrera E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Int J Obes and Rel Metab Dis* 25: 426-433, 2001.
- Drake CT, Chavkin C, Milner TA. Opioid systems in the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:245-63, 2007.
- Dringen R, Gutterer JM, Gros C, Hirrlinger J. Aminopeptidase N mediates the utilization of the GSH precursor CysGly by cultured neurons. *J Neurosci Res* 66: 1003-1008, 2001.
- Dyer SH, Slaughter CA, Orth K, Moomaw CR, Hersh LB. Comparison of the soluble and membrane-bound forms of the puromycin sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases from rat. *J Neurochem* 54: 547-554, 1990.
- Elias M, Elias P, Sullivan L, Wolf P, D'Agostino R. Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension: the Framingham heart study. *Int J Obes* 27:260-268, 2003.
- Elmqvist JM. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Physiol Behav* 74(4-5):703-8, 2001.
- Esch T., Stefano GB. The neurobiology of pleasure, reward processes, addiction and their health implications. *Neuro Endocrinol Lett* 25(4):235-51, 2005.
- Eva C, Serra M, Mele P, Panzica G, Oberto A. Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. *Front Neuroendocrinol*. 27(3):308-39, 2006.
- Fan H, Meng W, Kilian C, Grams S, Reutter W. Domain-specific N-glycosylation of the membrane glycoprotein dipeptidylpeptidase IV (CD26) influences its subcellular trafficking, biological stability, enzyme activity and protein folding. *Eur J Biochem* 246(1):243-51, 1997.
- Fassino S, Leombruni P, Piero A, Abbate-Daga G, Giacomo Rovera G. Mood, eating attitudes, and anger in obese women with and without binge eating disorder. *J Psychosom Res* 54:559-566, 2003.
- Finn PF, Dice JF. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition*. 22(7-8):830-44, 2006.
- Forloni G, Lucca E, Angeretti N, Chiesa R, Vezzani A. Neuroprotective effect of somatostatin on nonapoptotic NMDA-induced neuronal death: role of cyclic GMP. *J Neurochem* 68(1):319-27, 1997.
- Frankish HM, McCarthy HD, Dryden S, Kilpatrick A, Williams G. Neuropeptide Y receptor numbers are reduced in the hypothalamus of streptozotocin-diabetic and food-deprived rats: further evidence of increased activity of hypothalamic NPY-containing pathways. *Peptides* 14: 941-948, 1993.
- Frerker N, Wagner L, Wolf R, Heiser U, Hoffmann T, Rahfeld JU, Schade J, Karl T, Naim HY, Alfalah M, Demuth HU, von Hörsten S. Neuropeptide Y (NPY) cleaving enzymes: Structural and functional homologues of dipeptidyl peptidase 4. *Peptides* 28:257-268, 2007.

- Frohman LA, Downs TR, Kelijman M, Clarke IJ, Thomas G. Somatostatin secretion and action in the regulation of growth hormone secretion. *Metabolism* 39: 43-45, 1990.
- Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, Honda K, Mignot E, Nishino S. Changes in CSF hypocretin-1 (orexin A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. *Neuroreport* 12: 993-997, 2001.
- Funahashi H, Takenoya F, Guan JL, Kageyama H, Yada T, Shioda S. Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. *Anat Sci Int* 78:123-138, 2003.
- Furuhashi M, Mizutani S, Kurauchi O, Kasugai M, Narita O, Tomoda Y. In vitro degradation of opioid peptides by human placental aminopeptidase M. *Exp Clin Endocrinol*. 92(2):235-7, 1988.
- Gabrilovac J, Abramic M, Uzarevic B, Andreis A, Poljak L. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) enzyme activity on immature T-cell line R1.1 is down-regulated by dynorphin-A(1-17) as a non-substrate inhibitor. *Life Sci* 73: 151-66, 2003.
- Gallwitz B. Review of sitagliptin phosphate: a novel treatment for type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag* 3(2):203-10, 2007b.
- Gallwitz B. Sitagliptin: Profile of a novel DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Drugs Today (Barc)* 43(1):13-25, 2007a.
- Gherzi G, Chen W, Lee EW. Critical role of dipeptidyl peptidase IV in neuropeptide Y-mediated endothelial cell migration in response to wounding. *Peptides* 22: 453-458, 2001.
- Gibson AM, McDermott JR, Lauffart B, Mantle D. Specificity of action of human brain alanyl aminopeptidase on Leu-enkephalin and dynorphin-related peptides. *Neuropeptides* 13: 259-262, 1989.
- Gillespie TJ, Konings PN, Merrill BJ, Davis TP. A specific enzyme assay for aminopeptidase M in rat brain. *Life Sci* 51(26):2091-106, 1992.
- Gilmartin L, O'Cuinn G. Dipeptidyl aminopeptidase IV and aminopeptidase P, two proline specific enzymes from the cytoplasm of guinea-pig brain: their role in metabolism of peptides containing consecutive prolines. *Neurosci Res* 34: 1-11, 1999.
- Giros B, Gros C, Solhane B, Schwartz JC. Characterization of aminopeptidases responsible for inactivating endogenous (Met5)enkephalin in brain slices using peptidase inhibitors and antiaminopeptidase M antibodies. *Mol Pharmacol* 29: 281-287, 1986.
- Glavas MM, Grayson BE, Allen SE, Copp DR, Smith MS, Cowley MA, Grove KL. Characterization of brainstem peptide YY (PYY) neurons. *J Comp Neurol* 506(2):194-210, 2008.
- Gonzalez-Gronow M, Kaczowka S, Gawdi G, Pizzo SV. Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) is a cell-surface plasminogen receptor. *Front Biosci* 13: 1610-8, 2008.
- Gorrell MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clinical Sci* 108:277-292, 2005.
- Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 54: 249-264, 2001.

- Goto Y, Hattori A, Mizutani S, Tsujimoto M. Asparatic acid 221 is critical in the calcium-induced modulation of the enzymatic activity of human aminopeptidase A. *J Biol Chem* 282(51):37074-81, 2008.
- Grandt D, Dahms P, Schimiczek M, Eysselein VE, Reeve JR Jr, Mentlein R. Proteolytic processing by dipeptidyl aminopeptidase IV generates receptor selectivity for peptide YY (PYY). *Med Klin (Munich)* 88: 143-145, 1993.
- Green BD, Flatt PR. Incretin hormone mimetics and analogues in diabetes therapeutics. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21(4):497-516, 2007.
- Green BD, Flatt PR, Bailey CJ. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: A newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res* 3(3):159-65, 2006.
- Gum Jr JR, Erickson RH, Hicks JW, Rius JL, Kim YS. Analysis of dipeptidyl peptidase IV gene regulation in transgenic mice: DNA elements sufficient for promoter activity in the kidney, but not the intestine, reside on the proximal portion of the gene 5P-flanking region. *FEBS* 482: 49-53, 2000.
- Gunstad J, Paul RH, Cohen RA, Tate DF, Gordon E. Obesity is associated with memory deficits in young and middle-aged adults. *Eat Weight Disord*, Mar 11(1):e15-9, 2006.
- Hagan MM. Peptide YY: a key mediator of orexigenic behavior. *Peptides* 23: 377-382, 2002.
- Hatanaka Y, Ashida H, Hashizume K, Fukuda I, Sano T, Yamaguchi Y, Endo T, Tani Y, Suzyki K, Danno G. Up-regulation of CD13/aminopeptidase N induced by phorbol ester is involved in redox regulation and tumor necrosis factor alpha production in HL-60 cells. *Inflammation* 26: 175-181, 2002.
- Havel PJ. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc* 59: 359-371, 2000.
- Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci*. 13:1634-45, 2008.
- He YL, Serra D, Wang W, Campestrini J, Riviere GJ, Deacon CF, Holst JJ, Schwartz S, Nielsen JC, Ligueros-Saylan M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Pharmacokinet* 46(7): 577-88, 2007.
- Hedge SP, Kumar A, Kurschner C, Shapiro LH. c-Maf interacts with c-Myb to regulate transcription of an early myeloid gene during differentiation. *Mol Cell Biol* 18(5):2729-37, 1998.
- Heemels MT, Ploegh M. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 64: 463-491, 1995.
- Hildebrandt M, Reutter W, Arck P, Rose M, Klapp BF. A guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defense. *Clin Sci* 99: 93-104, 2000.
- Hirata AE, Andrade IS, Vaskevicius P, Dolnikoff MS. Monosodium glutamate (MSG) – obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz J Med Biol Res*. 30:671-74, 1997.
- Hirschberg R, Kopple JD, Blantz RC, Tucker BJ. Effects of recombinant human insulin-like growth factor I on glomerular dynamics in the rat. *J Clin Invest* 87:1200-1206, 1991.
- Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30: 405-439, 1996.

- Holst JJ, Deacon CF. Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* 47: 1663-1670, 1998.
- Horvath TL. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nature Neurosci* 8: 561-565, 2005.
- Horvath TL, Castaneda T, Tang-Christensen M, Pagotto U, Tschop MH. Ghrelin as a potential anti-obesity target. *Curr Pharm Des* 9: 1383-1395, 2003.
- Hosokawa R, Ohashi-Takeuchi H, Yamada N, Uchida Y, Fujiwara S, Noguchi T. Lactate dehydrogenase isoenzymes in matrix vesicles (review). *Bone Miner*, 17(2):177-81, 1992.
- Huang XF, Wang H. Altered c-fos expression in autonomic regulatory centers of genetically obese (ob/ob) mouse brain. *Brain Res* 799: 307-310, 1998.
- Hui KS, Saito M, Hui M. A novel neuron-specific aminopeptidase in rat brain synaptosomes. Its identification, purification, and characterization. *J Biol Chem* 273(47):31053-60, 1998.
- Hui KS, Graf L, Lajtha A. beta-Endorphin inhibits met-enkephalin breakdown by a brain aminopeptidase: structure-activity relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 105: 1482-1487, 1982.
- Hwang SR, Hook V. Zinc regulation of aminopeptidase B involved in neuropeptide production. *FEBS Lett.* 582(17):2527-31, 2008.
- Hwang SR, O'Neill A, Bark S, Foulon T, Hook V. Secretory vesicle aminopeptidase B related to neuropeptide processing: molecular identification and subcellular localization to enkephalin- and NPY-containing chromaffin granules. *J Neuroch* 100:1340-1350, 2007.
- Idris I, Donnelly R. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitors: a major new class of oral antidiabetic drug. *Diabetes Obes Metab* 9(2): 153-65, 2007.
- Illman J, Corringham R, Robinson D Jr, Davis HM, Rossi JF, Cella D, Trikha M. Are inflammatory cytokines the common link between cancer-associated cachexia and depression? *Support Oncol* 3: 37-50, 2005.
- Inui A, Meguid MM. Cachexia and obesity: two sides of one coin? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6: 395-399, 2003.
- Irazusta J, Larrinaga G, Agirregoitia N, Varona A, Casis L. Effects of morphine administration and its withdrawal on rat brain aminopeptidase activities. *Regul Pept* 110:225-230, 2003.
- Ishikawa M, Mizobuchi M, Takahashi H, Bando H, Saito S. Somatostatin release as measured by in vivo microdialysis: circadian variation and effect of prolonged food deprivation. *Brain Res* 749: 226-231, 1997.
- Isidro ML, Alvarez P, Martínez T, Cordido F. Neuroendocrine disturbances in obesity. *Rev Med Univ Navarra* 48:24-29, 2004.
- Iwata N, Higuchi M, Saido TC. Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 108(2): 129-48, 2005.
- Janson W, Stein C. Peripheral opioid analgesia. *Curr Pharm Biotechnol* 4(4):270-4, 2003.

- Jarosz PA. The effect of kappa opioid receptor antagonism on energy expenditure in the Obese Zucker Rat. *Biol Res Nurs* 8:294-99, 2007.
- Jasmin L, Gogas KR, Ahlgren C, Levine JD, Basbaum AI. Walking evokes a distinctive pattern of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem and spinal cord of the rat. *Neuroscience* 58: 275-286, 1994.
- Jensen M. Lipolysis: Contribution from regional fat. *Annu Rev Nutr.* 17:127-39, 1997.
- Jerng HH, Kunjilwar K, Pfaffinger PJ. Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with ISA-like properties. *J Physiol* 568(Pt 3):767-88, 2005.
- Jerng HH, Qian Y, Pfaffinger PJ. Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys J* 87(4):2380-96, 2004.
- Jones BH, Standridge MK, Taylor JW, Moustaid N. Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am J Physiol* 273(1 Pt 2):R236-42, 1997.
- Kadowaki M, Kanazawa T. Amino acids as regulators of proteolysis. *J Nutr* 133 (6 Suppl 1): 2052S-2056S, 2003.
- Kastin AJ, Akerstrom V, Hackler L. Food deprivation decreases blood galanin-like peptide and its rapid entry into the brain. *Neuroendocrinology* 74: 423-432, 2001.
- Kaufhold A, Nigam PK, Dhir RN, Shapiro BH. Prevention of latently expressed CYP2C11, CYP3A2, and growth hormone defects in neonatally monosodium glutamate-treated male rats by the n-methyl-d-aspartate receptor antagonist dizocilpine maleate. *JPET* 302: 490-496, 2002.
- Kawai M, Otake Y, Hara Y. High-molecular-mass isoform of aminopeptidase N/CD 13 in serum from cholestatic patients. *Clin Chim Acta* 330: 141-149, 2003.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endoc Metab* 89(6):2548-2556, 2004.
- Kessler MS, Murgatroyd C, Bunck M, Czibere L, Frank E, Jacob W, Horvath C, Muigg P, Holsboer F, Singewald N, Spengler D, Landgraf R. Diabetes insipidus and, partially, low anxiety-related behaviour are linked to a SNP-associated vasopressin deficit in LAB mice. *Eur J Neurosci* 26(10):2857-64, 2007.
- Kettelhut IC, Pepato MT, Migliorini RH, Medina R, Goldberg AL. Regulation of different proteolytic pathways in skeletal muscle in fasting and diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res.* 27(4):981-93, 1994.
- Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136: 3585-3896, 1995.
- Kin Y, Misumi Y, Ikehara Y. Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. *J Biochem (Tokyo)* 129:289-295, 2001.
- Klein DA, Walsh BT. Eating disorders. *Int Rev Psychiatry* 15: 205-216, 2003.
- Konturek SJ, Pepera J, Zabielski K, Konturek PC, Pawlik T, Szlachcic A, Hahn EG. Brain-gut axis in pancreatic secretion and appetite control. *J Physiol Pharmacol* 54: 293-317, 2003.

- Kraus-Berthier L, Remond G, Visalli M, Heno D, Portevin B, Vincent M. In vivo immunopharmacological properties of tuftsin and four analogs. *Immunopharmacology* 25: 261-267, 1993.
- Kruijer W, Schubert D, Verma IM. Induction of the proto-oncogene fos by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 82: 7330-7334, 1985.
- Krukoff TL. Expression of c-fos in studies of central autonomic and sensory systems. *Mol Neurobiol* 7: 247-263, 1993.
- Kurihara LJ, Semenova E, Levorse JM, Tilghman SM. Expression and functional analysis of Uch-L3 during mouse development. *Mol Cell Biol* 20: 2498-2504, 2000.
- LaBella FS, Geiger JD, Glavin GB. Administered peptides inhibit the degradation of endogenous peptides. The dilemma of distinguishing direct from indirect effects. *Peptides* 6: 645-660, 1985.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
- Lam TKT, Schwartz GJ, Rossetti L. Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nature Neurosci* 8: 579-584, 2005.
- Lambeir AM, Durinx C, Proost P, Van Damme J, Scharpe S, De Meester I. Kinetic study of the processing by dipeptidyl-peptidase IV/CD26 of neuropeptides involved in pancreatic insulin secretion. *FEBS Lett* 507: 327-330, 2001.
- Larrinaga G, Gil J, Meana JJ, Ruiz F, Callado LF, Irazusta J. Amino-peptidase activity in the postmortem brain of human heroin addicts. *Neurochem Int*. 46:213-219, 2005.
- Larsen PJ, Vrang N, Tang-Christensen M. Central pre-proglucagon derived peptides: opportunities for treatment of obesity. *Curr Pharm Des* 9:1373-1382, 2003.
- Larsen SL, Pedersen LO, Buus S, Stryhn A. T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides. *J Exp Med* 184: 183-189, 1996.
- Lautar SL, Rojas C, Slusher BS, Wozniak KM, Wu Y, Thomas AG, Waldon D, Li W, Ferraris D, Belyakov S. DPP IV inhibitor blocks mescaline-induced scratching and amphetamine-induced hyperactivity in mice. *Brain Res* 1048: 177-184, 2005.
- Lee A, Rayfield A, Hryciw DH, Ma TA, Wang D, Pow D, Broer S, Yun C, Poronnik P. Na⁺-H⁺ exchanger regulatory factor 1 is a PDZ scaffold for the astroglial glutamate transporter GLAST. *Glia*. 55(2):119-29, 2007.
- Leibowitz SF. Brain neuropeptide Y: an integrator of endocrine, metabolic and behavioral processes. *Brain Res Bull* 27(3-4):333-7, 1991.
- Leigh FS, Kaufman LN, Young JB. Diminished epinephrine excretion in genetically obese (ob/ob) mice and monosodium glutamate-treated rats. *Int J Obes and Rel Metab Dis* 16: 597-604, 1992.
- le Roux CW, Bloom SR. Peptide YY, appetite and food intake. *Proc Nutr Soc*. 64(2):213-6, 2005.
- Li BX, Ge JW, Li YJ. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology* 365(1):166-72, 2007.
- Li Q, Xu W. Novel anticancer targets and drug discovery in post genomic age. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5(1):53-6, 2005.

- Lohn M, Mueller C, Langner J. Cell cycle retardation in monocytoid cells induced by aminopeptidase N (CD13). *Leuk Lymphoma* 43: 407-13, 2002.
- Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, Peiper SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest* 83: 1299-1307, 1989.
- López M, Tovar S, Vázquez MJ, Williams LM, Diéguez C. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc.* 66(1):131-55, 2007.
- Lopez M, Seoane L, Garcia MC, Lago F, Casanueva FF, Senaris R, Dieguez C. Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 41-45, 2000.
- Luan Y, Xu W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr Med Chem* 14(6):639-47, 2007.
- Ma Z, Daquin A, Yao J, Rodgers D, Thompson MW, Hersh LB. Proteolytic cleavage of the puromycin-sensitive aminopeptidase generates a substrate binding domain. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 415:80-86, 2003.
- Macho L, Fickova M, Zorad S, Sebkova E, Klimes I. Effects of new hypoglycemic agent A-4166 on lipolysis and lipogenesis in rat adipocytes. *Endocr Regul* 34(3):119-26, 2000.
- Mae T, Konishi E, Hosoe K, Hidaka T. Isolation and identification of major metabolites of rifalazil in mouse and human. *Xenobiotica* 29: 1073-1087, 1999.
- Maes MB, Dubois V, Brandt I, Lambeir AM, Van der Veken P, Augustyns K, Cheng JD, Chen X, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl peptidase 8/9-like activity in human leukocytes. *J Leukoc Biol.* 81(5):1252-7, 2007.
- Maes MB, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl peptidase II (DPPII), a review. *Clin Chim Acta* 1;380(1-2):31-49, 2007.
- Mahoney KMM, Petrovic N, Schacke W, Shapiro LH. CD13/APN transcription is regulated by the proto-oncogene c-Maf via an atypical response element. *Gene* 403: 178-187, 2007.
- Mentlein R. Cell-surface peptidases. *Int Rev Cytol.* 235:165-213, 2004.
- Mantovani A, Gray PA, Van Damme J, Sozzani S. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leuk Biol* 68: 400-404, 2000.
- Marks N, Datta RK, Lajtha A. Partial resolution of brain arylamidases and aminopeptidases. *J Biol Chem* 243: 2882-2889, 1968.
- Markus A. Neurobiology of obesity. *Nature Neurosci* 8: 551, 2005.
- Masuda S, Hattori A, Matsumoto H, Miyazawa S, Natori Y, Mizutani S, Tsujimoto M. Involvement of the V2 receptor in vasopressin-stimulated translocation of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in renal cells. *Eur J Biochem* 270(9):1988-94, 2003.
- Matsui M, Fowler JH, Walling LL. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol Chem.* 387(12):1535-44, 2006.

- McDermott JR, Mantle D, Lauffart B, Kidd AM. Purification and characterization of a neuropeptide-degrading aminopeptidase from human brain. *J. Neurochem* 45: 752-759, 1985.
- McLellan S, Dyer SH, Rodriguez G, Hersh LB. Studies on the tissue distribution of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases. *J Neurochem* 51: 1552-1559, 1988.
- Medeiros MD, Turner AJ. Processing and metabolism of peptide-YY: pivotal roles of dipeptidylpeptidase-IV, aminopeptidase-P, and endopeptidase-24.11. *Endocrinology* 134: 2088-2094, 1994.
- Meier JJ, Nauck MA. GIP as a potential therapeutic agent? *Horm Metab Res* 36:859-866, 2004.
- Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pep* 85: 9-24, 1999.
- Mizutani S, Goto K, Nomura S, Ino K, Goto S, Kikkawa F, Kurauchi O, Goldstein G, Tomoda Y. Possible action of human placental aminopeptidase N in feto-placental unit. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 82: 65-80, 1993.
- Molinaro G, Duan QL, Chagnon M, Moreau ME, Simon P, Clavel P, Lavaud S, Boileau G, Rouleau GA, Lepage Y, Adam A, Chanard J. Kinin-dependent hypersensitivity reactions in hemodialysis: metabolic and genetic factors. *Kidney Int.* 70, 1823-1831, 2006.
- Moran TH. Gut Peptide Signaling in the Controls of Food Intake. *Obesity* 14 (suppl):250s-253s, 2006.
- Morgan JJ, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14: 421-451, 1991.
- Münzberg H, Myers Jr MG. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nature Neurosci* 8: 566-570, 2005.
- Murata S, Kawahara H, Tohma S, Yamamoto K, Kasahara M, Nabeshima Y-i, Tanaka K, Chiba T. Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma. *J Biol Chem* 274: 38211-38215, 1999.
- Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, de Miera EV-S, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, Rudy B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* 37: 449-461, 2003.
- Nakagawa T, Ukai K, Ohyama T, Gomita Y, Okamura H. Effects of chronic administration of sibutramine on body weight, food intake and motor activity in neonatally monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with monoamines. *Exp Anim* 49: 239-249, 2000.
- Nakagawasai O, Todano T, Nijima F, Tan-No K, Kisara K. Immunohistochemical estimation of rat brain somatostatin on avoidance learning impairment induced by thiamine deficiency. *Brain Res Bull* 51(1): 47-55, 2000.
- Näslund E, Hellström PM. Appetite signaling: From gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol & Behav* 92: 256-62, 2007
- Neary NM, Small CJ, Bloom SR. Gut and mind. *Gut* 52:918-921, 2003.
- Nemeroff CB, Lipton MA, Kizer JS. Models of neuroendocrine regulation: use of monosodium glutamate as an investigational tool. *Dev Neurosci* 1: 102-109, 1978.

- Noraberg J, Jensen CV, Bonde C, Montero M, Nielsen JV, Jensen NA, Zimmer J. The developmental expression of fluorescent proteins in organotypic hippocampal slice cultures from transgenic mice and its use in the determination of excitotoxic neurodegeneration. *Altern Lab Anim* 35(1):61-70, 2007.
- Nørrelund H, Hansen TK, Ørskov H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Weeke J, Møller N, Christiansen JS, Jørgensen JOL. Ghrelin immunoreactivity in human plasma is suppressed by somatostatina. *Clin Endocrinol* 57(4): 539-546, 2002.
- Obuchowicz A, Obuchowicz E. Plasma beta-endorphin and insulin concentrations in relation to body fat and nutritional parameters in overweight and obese prepubertal children. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21(9):783-8, 1997.
- O’Cuinn G. Peptide metabolism in cytoplasm of brain cells. *Biochem Soc Trans* 26: 279-291, 1998.
- Olchovsky D, Song J, Gelato MC, Sherwood J, Spatola E, Bruno JF, Berelowitz M. Pituitary and hypothalamic insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor expression in food-deprived rats. *Mol Cell Endocrinol* 93(2):193-8, 1993.
- Olsen C, Wagtmann N. Identification and characterization of human DPP9, a novel homologue of dipeptidyl peptidase IV. *Gene* 299: 185-193, 2002.
- Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluís C, Franco R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(27):9583-8, 2005.
- Padia SH, Kemp BA, Howell NL, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Carey RM. Conversion of renal angiotensin II to angiotensin III is critical for AT2 receptor-mediated natriuresis in rats. *Hypertension* 51(2):460-5, 2008.
- Palter SF, Mulayim N, Senturk L, Arici A. Interleukin-8 in the human fallopian tube. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2660-2667, 2001.
- Panchal M, Rholam M, Brakch N. Abnormalities of peptide metabolism in Alzheimer disease. *Curr Neurovasc Res* 1(4): 317-23, 2004.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press 25th edition, 2007.
- Perello M, Moreno G, Gaillard RC, Spinedi E. Glucocorticoid-dependency of increased adiposity in a model of hypothalamic obesity. *Neuro Endocrinol Lett* 25: 119-126, 2004.
- Pethiyagoda CL, Welch DR, Fleming TP. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibits cellular invasion of melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 18: 391-400, 2000.
- Pospisilik JA, Martin J, Doty T, Ehses JA, Pamir N, Lynn FC, Piteau S, Demuth HU, McIntosh CH, Pederson RA. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates beta-cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 52: 741-750, 2003.
- Preckel T, Fung-Leung W, Cai Z, Vitiello A, Salter-Cid L, Winqvist O, Wolfe TG, Herrath MV, Angulo A, Ghazal P, Lee J, Fourie AM, Wu Y, Pang J, Ngo K, Peterson PA, Früh K, Yang Y. Impaired immunoproteasome assembly and immune responses in PA28^{-/-} mice. *Science* 286: 2162-2165, 1999.
- Presse F, Sorokovsky I, Max JP, Nicolaidis S, Nahon JL. Melanin-concentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food-deprivation and glucopenia in the rat. *Neuroscience* 71: 735-745, 1996.
- Qi SY, Riviere PJ, Trojnar J, Junien JL, Akinsanya KO. Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochem J* 373:179-189, 2003.

- Raber J. Detrimental effects of chronic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. From obesity to memory deficits. *Mol Neurobiol* 18: 1-22, 1998.
- Racek L, Lenhardt L, Mozes S. Effect of fasting and refeeding on duodenal alkaline phosphatase activity in monosodium glutamate obese rats. *Physiol Res*. 2001;50(4):365-72.
- Razay G, Vreugdenhil A, Wilcock G. Obesity, abdominal obesity and Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 22(2): 173-6, 2006.
- Redrobe JP, Dumont Y, Quirion R. Neuropeptide Y (NPY) and depression: from animal studies to the human condition. *Life Sci* 8;71(25):2921-37, 2002.
- Remke H, Wilsdorf A, Müller F. Development of hypothalamic obesity in growing rats. *Exp Pathol* 33(4):223-32, 1988.
- Riemann D, Rötsch J, Hause B, Langner J, Kehlen A. Cell-cell contact between lymphocytes and fibroblast-like synoviocytes induces lymphocytic expression of aminopeptidase N/CD13 and results in lymphocytic activation. *Cellular peptidase in immune functions and disease* 2. 2000.
- Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316(5824):608-11, 2007.
- Rodriguez-Gil JE, Gomez-Foix AM, Arino J, Guinovart JJ, Bosch F. Control of glycogen synthase and phosphorylase in hepatocytes from diabetic rats. Effects of glucagon, vasopressin, and vanadate. *Diabetes* 38: 793-798, 1989.
- Ronái AZ, Timar J, Mako E, Erdo F, Gyarmati Z, Toth G, Orosz G, Furst S, Szekely JJ. Diprotin A, an inhibitor of dipeptidyl aminopeptidase IV (EC 3.4.14.5) produces naloxone-reversible analgesia in rats. *Life Sci* 64: 145-152, 1999.
- Rosenblum JS, Kozarich JW. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr Opin Chem Bio* 7: 496-504, 2003.
- Rowland NE, Bellinger LL, Li, B-H, Mendel VE. Satielin: Fos mapping of putative brain sites of action. *Brain Research* 717: 189-192, 1996.
- Safavi A, Hersh LB. Degradation of dynorphin-related peptides by the puromycin-sensitive aminopeptidase and aminopeptidase M. *J Neurochem* 65: 389-395, 1995.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240: 1328-1331, 1988.
- Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang SM, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC. Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* 11(4): 434-9, 2005.
- Sakharova AA, Horowitz JF, Surya S, Goldenberg N, Harber MP, Symons K, Barkan A. Role of growth hormone in regulating lipolysis, proteolysis, and hepatic glucose production during fasting. *J Clin Endocrinol Metab*. 93(7):2755-9, 2008.
- Sakurada C. Development of a new analgesic based on metabolism of endomorphin, an endogenous opioid peptide. *Yakugaku Zasshi* 124: 549-554, 2004.

- Sakurada C, Sakurada S, Hayashi T, Katsuyama S, Tan-No K, Sakurada T. Degradation of endomorphin-2 at the supraspinal level in mice is initiated by dipeptidyl peptidase IV: an in vitro and in vivo study. *Biochem Pharm* 66: 653-661, 2003.
- Sajdyk TJ, Shekhar A, Gehlert DR. Interaction between NPY and CRF in the amygdale to regulate emotionality. *Neuropeptides* 38(4): 225-34, 2004.
- Sanderink GJ, Artur Y, Siest G. Human aminopeptidases: a review of the literature. *J Clin Chem Clin Biochem* 26: 795-807, 1988.
- Scallet AC, Olney JW. Components of hypothalamic obesity: bipiperidyl-mustard lesions add hyperphagia to monosodium glutamate-induced hyperinsulinemia. *Brain Res* 374: 380-384, 1986.
- Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-379, 1987.
- Schwartz MW, Sipols AJ, Grubin CE, Baskin DG. Differential effect of fasting on hypothalamic expression of genes encoding neuropeptide Y, galanin, and glutamic acid decarboxylase. *Brain Res Bull* 31: 361-367, 1993.
- Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130: 3608-3616, 1992.
- Scott KM, Bruffaerts R, Simon GE, Alonso J, Argenmeyer M, de Girolamo G, Demyttenaere K, Gasquet I, Haro JM, Karam E, Kessler RC, Levinson D, Medina Mora ME, Browne MAO, Ormel J, Villa JP, Uda H, Von Korff M. Obesity and mental disorders in adult general population: results from the world mental health surveys. *Inter J Obes* 32: 192-200, 2008 a.
- Scott KM, McGee MA, Wells E, Browne MAO. Obesity and mental disorders in adult general population. *J Pshyc Res* 64: 94-105, 2008 b.
- Segura J, Ruilope LM. Obesity, essential hypertension and renin-angiotensin system. *Public Health Nutr* 10(10A):1151-5, 2007.
- Shapiro BN, Albucher RC, MacLeod JN, Bitar MS. Normal levels of hepatic drug-metabolizing enzymes in neonatally induced growth hormone-deficient adult male and female rats. *Drug Metab Dispos* 14: 585-589, 1986.
- Sheng M, Greenberg ME. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4: 477-485, 1990.
- Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 82: 1052-1070, 1993.
- Shuy AB, Wilkinson MF, van Hoof A. Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO* 27: 471-481, 2008.
- Silveira PF, Gil J, Casis L, Irazusta J. Peptide metabolism and the control of body fluid homeostasis. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2: 219-238, 2004.
- Simmons ML, Chavkin C. Endogenous opioid regulation of hippocampal function. *Int Rev Neurobiol* 39:145-96, 1996.
- Smyth M, O'Cuinn G. Dipeptidyl aminopeptidase activities of guinea-pig brain. *Int J Biochem* 7: 913-921, 1994.

- Song B, Marvizon JC. Peptidases prevent mu-opioid receptor internalization in dorsal horn neurons by endogenously released opioids. *J Neurosci* 23: 1847-1858, 2003.
- Song LJ, Healy DP. Kidney aminopeptidase A and hypertension, part II: effects of angiotensin II. *Hypertension* 33: 746-752, 1999.
- Sperk G, Hamilton T, Colmers WF. Neuropeptide Y in the dentate gyrus. *Prog Brain Res*. 163:285-97, 2007.
- Speth RC, Karamyan VT. The significance of brain aminopeptidases in the regulation of the actions of angiotensin peptides in the brain. *Heart Fail Rev* 13(3):299-309, 2008.
- Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*. 104(4):531-43, 2001.
- Steiner MR, Urso JR, Klein J, Steiner SM. Multiple astrocyte responses to lysophosphatidic acids. *Biochim Biophys Acta*. 1582(1-3):154-60, 2003.
- Strowski MZ, Parmar RM, Blake AD, Schaeffer JM. Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology* 141(1):111-7, 2000.
- Suzuki N, Okada K, Sugihara H, Minami S, Wakabayashi I. Caloric intake stimulates growth hormone secretion in food-deprived rats with anterolateral deafferentation of the medial basal hypothalamus or administered antiserum to somatostatin. *J Neuroendocrinol* 7(6):483-90, 1995.
- Traub RJ, Sengupta JM, Gebhart GF. Differential c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat. *Neuroscience* 74 (3): 873-884, 1996.
- Ueno H, Yamaguchi H, Mizuta M, Nakazato M. The role of PYY in feeding regulation. *Regul Pept* 10;145(1-3):12-6, 2008.
- Unniappan S, McIntosh HS, Demuth HU, Heiser U, Wolf R, Kieffer TJ. Effects of dipeptidyl peptidase IV on the satiety actions of peptide YY. *Diabetologia* 49:1915-1923, 2006.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18(2):158-68, 2008
- van Hal PTW, Hopstaken-Broos JPM, Prins A, Favaloro EJ, Huijbens RJ, Hilvering C, Figdor CG, Hoogsteden HC. Potential indirect anti-inflammatory effects of IL-4. Stimulation of human monocytes, macrophages, and endothelial cells by IL-4 increases aminopeptidase-N activity (CD13; EC 3.4.11.2). *J Immunol* 153: 2718-2728, 1993.
- Vígh B, Manzano e Silva MJ, Frank CL, Vincze C, Czirik SJ, Szabó A, Lukáts A, Szél A. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histol Histopathol* 19(2):607-28, 2004.
- Villadangos JA, Driessen C, Shi GP, Chapman HA, Ploegh HL. Early endosomal maturation of MHC class II molecules independently of cysteine proteases and H-2DM. *EMBO J* 19: 882-891, 2000.
- Villadangos JA, Bryant RA, Deussing J, Driessen C, Lennon-Dumenil AM, Riese RJ, Roth W, Saftig P, Shi GP, Chapman HA, Peters C, Ploegh HL. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 172: 109-20, 1999.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68: 1015-1068, 1999.

- Volkoff H, Canosa LF, Unniappan S, Cerdá-Reverter JM, Bernier NJ, Kelly SP, Peter RE. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen Comp Endocr* 142: 3-19, 2005.
- Volkow ND, Wise RA. How can drug addiction help us understand obesity? *Nature Neurosci* 8: 555-560, 2005.
- Xapelli S, Agasse F, Ferreira R, Silva AP, Malva JO. Neuropeptide Y as an endogenous antiepileptic, neuroprotective and pro-neurogenic peptide. *Recent Patents CNS Drug Discov* 1(3):315-24, 2006.
- Wajchenberg BL. Postprandial glycemia and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51(2):212-21, 2007.
- Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva MER, Santos RF. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 34: 616-21, 2002.
- Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21(6): 697-738, 2000.
- Wang GJ, Yang J, Volkow ND, Telang F, Ma Y, Zhu W, Wong CT, Tomasi D, Thanos PK, Fowler JS. Gastric stimulation in obese subjects activates the hippocampus and other regions involved in brain reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(42):15641-5, 2006.
- Wang H, Storlien LH, Huang XF. Influence of dietary fats on c-Fos-like immunoreactivity in mouse hypothalamus. *Brain Res* 843: 184-192, 1999.
- Weislo G, Korniluk J, Wojtun S. The role of proteasome in pathophysiology of cancer cachexia. *Pol Merkuriusz Lek* 17 (Suppl 1): 47-49, 2004.
- Weihprecht H, Lorenz JN, Briggs JP, Schnermann J. Vasoconstrictor effect of angiotensin and vasopressin in isolated rabbit afferent arterioles. *Am J Physiol*. 261(2 Pt 2):F273-82, 1991.
- Wentworth DE, Holmes KV. Molecular determinants of species specificity in the coronavirus receptor aminopeptidase N (CD13): influence of N-linked glycosylation. *J Virol* 75(20):9741-52, 2001.
- Whitmer RA. The epidemiology of adiposity and dementia. *Curr Alzheimer Res* 4(2): 117-22, 2007.
- Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286: 1888-1893, 1999.
- Williams G, Cai XJ, Elliott JC, Harrold JA. Anabolic Neuropeptides. *Physiol Behav* 81:211-222, 2004.
- Wren AM, Bloom SR. Gut hormones and appetite control. *Gastroenterology* 132(6):2116-30, 2007.
- Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endoc* 184:291-318, 2005.
- Yip RG, Wolfe MM. GIP biology and fat metabolism. *Life Sci* 66: 91-103, 2000.
- Yu AC, Lee YL, Fu WY, Eng LF. Gene expression in astrocytes during and after ischemia. *Prog Brain Res*. 105:245-53, 1995.

- Zambotti-Villela L, Yamasaki SC, Villarroel JS, Alponi RF, Silveira PF. Prospective evaluation of aminopeptidase activities in plasma and peripheral organs of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol Invest*. 31(6):492-8, 2008.
- Zambotti-Villela L, Yamasaki SC, Villarroel JS, Alponi RF, Silveira PF. Aspartyl, arginyl and alanyl aminopeptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Research* 1170:112-8, 2007a.
- Zambotti-Villela L, Yamasaki SC, Villarroel JS, Murena-Nunes C, Silveira PF. Prolyl, cystyl and pyroglutamyl peptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Peptides* 28(8):1586-95, 2007b.
- Zammaretti F, Panzica G, Eva C. Fasting, leptin treatment, and glucose administration differentially regulate Y(1) receptor gene expression in the hypothalamus of transgenic mice. *Endocrinology* 142: 3774-3782, 2001.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432, 1994.
- Ziaber J, Baj Z, Pasnik J, Chmielewski H, Tchórzewski H. Expression of aminopeptidase N (APN) on peripheral blood mononuclear cells' surface as a marker of these cells' transendothelial migration properties in the course of multiple sclerosis. *Mediators of Inflammation* 9: 45-48, 2000.
- Zigman JM, Elmquist JK. Minireview: from anorexia to obesity – The Yin and Yang of body weight control. *Endocrinology* 144: 3749-3756, 2003.
- Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 11968-11973, 1996.

ANEXO

- **REAGENTES**

1-butanol puríssimo (Merck, Brasil)

3'3' Diaminobenzidina – DAB (Sigma Chemical Co., EUA)

β -naftilamida (Sigma Chemical Co., EUA)

β -nicotinamida adenina di-nucleotídio forma reduzida - NADH (Sigma Chemical Co., EUA)

β -mercaptoetanol (BioRad Laboratories, EUA)

ABC Kit Vectastain Elite Standard (Vector Laboratories, EUA)

Ácido acético glacial (Merck, Brasil)

Ácido etilenediaminetetraacético-EDTA (Merck, Brasil)

Ácido L-glutâmico sal monossódico (Sigma Chemical Co., EUA)

Acrilamida ultrapura (Invitrogen Life Technologies, EUA)

Agarose (Amersham Bioscience, Suécia)

Água livre de Rnase e Dnase (Gibco, EUA)

Albumina bovina (Sigma Chemical Co., EUA)

Álcool isopropílico (Merck, Brasil)

Anticorpo anti- β -actina (Sigma Chemical Co., EUA)

Anticorpo anti-CD13 policlonal produzido em coelho (CD13, H-300: sc15360, Santa Cruz Biotech., USA, Lote D1504)

Anticorpo anti-Fos produzido em coelho (Ab-5, Oncogen, Alemanha)

Anticorpo anti-CD26 policlonal produzido em coelho (CD26, H-270: sc9153, Santa Cruz Biotech., USA, Lote F0304)

Anticorpo anti IgG-peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech., EUA)

Anticorpo secundário biotinilado, anti-coelho, produzido em cabra (Vector Laboratories, EUA, Lote T0730)

Azul de bromofenol (USB Corporation, EUA)

Bio-Beads SM-2 adsorvente (BioRad Laboratories, EUA)

Borato de sódio (Synth, Brasil)

Brometo de etídeo (Amersham Biosciences, Suécia)

CD26s Elisa Human kit (Bender MedSystems, Áustria)

Cloreto de hidrogênio - HCl (Merck, Brasil)

Cloreto de sódio - NaCl (Sigma Chemical Co., EUA)

Cloridrato de cetamina (König, Argentina)

Cloridrato de xilazina (Vetbrands, Brasil)

Clorofórmio (Synth, Brasil)

Coquetel de inibidores de protease (Sigma Chemical Co., EUA)

Dimetil sulfóxido – DMSO (Sigma Chemical Co., EUA)

Diprotina A (Bachem Bioscience Inc., EUA)

DL-ditiotreitol-DTT (Sigma Chemical Co., EUA)

Etanol PA (Merck, Brasil)

Etilenoglicol (Synth, Brasil)

Eukitt (Calibrated Instruments Inc., EUA)

Fixador Kodak (Kodak Co., EUA)

Fosfato de potássio dibásico (Synth, Brasil)

Fosfato de potássio monohidratado (Synth, Brasil)

Fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Sigma Chemical Co., EUA)

Fosfato de sódio monobásico (Sigma Chemical Co., EUA)

Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (Amersham Biosciences, Suécia)

Glicerol UltraPuro (USB Corporation, EUA)

Glicil-L-prolina-4-metoxi- β -naftilamida (Peninsula Laboratories Inc., EUA)

Glicina ultrapura (BioRad Laboratories, EUA)

Heparina Sódica (Roche, Brasil)

Human sCD26 Elisa (Bender Medsystems, Áustria)

L-alanina- β -naftilamida (Sigma Chemical Co., EUA)

Low mass Ladder (Invitrogen Life Technologies, EUA)

Metanol PA (Merck, Brasil)

Metoxi- β -naftilamida (Sigma Chemical Co., EUA)

N'N'-methylene-bis-acrylamide (USB Corporation, EUA)

Paraformaldeído (Synth, Brasil)

Peróxido de hidrogênio – H₂O₂ (Synth, Brasil)

Persulfato de amônia (BioRad Laboratories, EUA)

Piruvato (Sigma Chemical Co., EUA)

Poli-L-lisina (Sigma Chemical Co., EUA)

Ponceau S (Sigma Chemical Co., EUA)

Prestained SDS-PAGE standards High Range (BioRad Laboratories, EUA)

Protein Assay Kit (BioRad Laboratories, EUA)

Puromicina (Sigma Chemical Co., EUA)

Revelador Kodak (Kodak Co., EUA)

Sacarose (Synth, Brasil)

Sódio dodecil-sulfato (USB Corporation, EUA)

Soro normal de cabra (Vector Laboratories, EUA)

Sulfato de níquel (III) amônio hexahidratado (Sigma Chemical Co., EUA)

SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen Life Technologies, EUA)

SuperSignal West Pico Trial Kit (Pierce Biotechnology, EUA)

TEMED (Amersham Biosciences, Suécia)

Tionina (Fisher Scientific, EUA)

Triton X-100 (Union Carbide, EUA)

Trizma base (Sigma Chemical Co., EUA)

Trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA)

Tween 20 (BioRad Laboratories, EUA)

Xilol (Labsynth, Brasil)

- **SOLUÇÕES DE ROTINA**

- **Solução Tris Base 0,2 M**

Tris Base ..... 24,2 g

Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

- **Solução de HCl 0,2 M**

HCl ..... 6,6 mL

Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

- **Solução de BioRad**

BioRad ..... 4 mL

Água destilada ..... q.s.p. 20 mL

- **Tampão Fosfato**

Solução A ..... 9,5 mL

Solução B ..... 40,5 mL

Albumina ..... 0,02 g

Água destilada ..... q.s.p. 100 mL

Solução A

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ..... 28 g

Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

Solução B

$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4\text{7H}_2\text{O}$ ..... 54 g

Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

- **Tampão Tris/HCl pH 8,3**

Solução A ..... 12,5 mL

Solução B ..... 4,2 mL

Albumina ..... 0,01 g

Água destilada ..... q.s.p. 50 mL

Solução A

$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ..... 24,5 g

Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

Solução B

HCl ..... 6,2 mL

Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

Soluções para ensaio da desidrogenase láctica (LDH)

- **Tampão de uso**

Solução A ..... 1,9 mL

Solução B ..... 8,1 mL

NaCl ..... 0,23 g

NADH ..... 0,0028 g

Piruvato de sódio ..... 0,32 mL

Água destilada ..... q.s.p. 20 mL

Solução A

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ..... 28 g

Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

Solução B

$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4\text{7H}_2\text{O}$ ..... 54 g

Água destilada ..... q.s.p 1000 mL

Soluções para Western blotting

- **Tampão Tris/HCl 1,5 M pH 8,8**

Tris ..... 45,41 g

Água destilada ..... q.s.p. 250 mL

- **Tampão Tris/HCl 0,5 M pH 6,8**

Tris ..... 15,13 g

Água destilada ..... q.s.p. 250 mL

- **Solução SDS 10%**

SDS ..... 10 g

Água destilada ..... q.s.p. 100 mL

- **Solução de acrilamida 30%**

Acrilamida ..... 29,2 g

Bis-acrilamida ..... 0,8 g

Água destilada ..... q.s.p. 100 mL

- **Persulfato de amônio 10% (APS 10%)**

Persulfato de amônio .. 1 g

Água destilada ..... q.s.p. 10 mL

- **Tampão de eletroforese**

Tris ..... 3,02 g

Glicina ..... 14,41 g

SDS 10% ..... 10 mL

Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

- **Tampão de transferência**

Tris ..... 3,6 g

Glicina ..... 17,9 g

Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

- **Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2**

NaCl ..... 85 g

NaH₂PO₄ H₂O ..... 11,49 g

Na₂HPO₄ H₂O ..... 2,03 g

Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

- **Tampão de lavagem**

PBS ..... 100 mL

Tween-20 ..... 2 mL

Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

- **Gel de separação 10%**

Tampão Tris/HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL
SDS 10%	0,1 mL
Acrilamida 30%	3,3 mL
APS 10%	0,1 mL
TEMED	0,01 mL
Água destilada	4,09 mL

- **Gel de empilhamento 4%**

Tampão Tris/HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 mL
SDS 10%	0,1 mL
Acrilamida 30%	1,3 mL
APS 10%	0,1 mL
TEMED	0,01 mL
Água destilada	6 mL

- **Solução de bloqueio 5%**

Albumina	0,25 g
Tween 20	0,01 mL
Tampão de lavagem	5 mL

- **Solução de Ponceau-S**

Corante de Ponceau-S	0,2 g

Ácido tricloacético ..... 3 g
 Água destilada ..... q.s.p. 100 mL

- **Tampão de amostra (Tampão Laemmli)**

SDS ..... 2,4 g
 Glicerol ..... 12 mL
 Tris 150 mM pH 6,8 ..... 6 mL
 B-mercaptoetanol ..... 6 mL
 Azul de bromofenol ..... 0,03 g
 Água destilada ..... q.s.p. 25 mL

Soluções para perfusão

- **Líquido de perfusão**

NaCl ..... 9 g
 Solução 1 ..... 5 mL
 Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

Solução 1

Solução A ..... 0,95 mL
 Solução B ..... 4,05 mL
 Água destilada ..... q.s.p. 10 mL

Solução A

NaH₂PO₄H₂O ..... 28 g
 Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

Solução B

Na₂H₂PO₄7H₂O ..... 54 g
 Água destilada ..... q.s.p 1000 mL

- **Paraformaldeído 4% pH 9,5**

Paraformaldeído ..... 40 g
 NaOH ..... 4 g
 Borato de sódio ..... 38,14 g
 Água destilada ..... q.s.p. 1000 mL

- **Solução pós-fixadora**

Sacarose ..... 20 g
 Paraformaldeído 4% ..... 100 mL

- **Solução crio-protetora**

Sacarose ..... 20 g
 PBS ..... 100 mL

- **Solução anti-congelante**

PBS ..... 500 mL
 Sacarose ..... 300 g

Água destilada ..... 500 mL

Etilenoglicol ..... 600 mL

Soluções para imuno-histoquímica

- **Tampão fosfato de potássio (KPBS) 0,02 M pH 7,4**

NaCl ..... 36 g

K₂HPO₄ ..... 15,24 g

KH₂PO₄ ..... 1,8 g

Água destilada ..... q.s.p. 4000 mL

- **KPBS “loaded”**

Triton X-100 ..... 3 mL

KPBS 0,2 M pH 7,4 ..... 9997 mL

- **Sulfato de níquel amônio 5%**

NAS ..... 25 g

Água destilada ..... 500 mL