

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**

**NATÁLIA FERREIRA MENDES**

**REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE PTP1B NA AMÍGDALA DE RATOS OBESOS  
ALTERA O METABOLISMO ENERGÉTICO E DIMINUI A ANSIEDADE  
RELACIONADA À ALIMENTAÇÃO**

LIMEIRA

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**

**NATÁLIA FERREIRA MENDES**

**REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE PTP1B NA AMÍGDALA DE RATOS OBESOS  
ALTERA O METABOLISMO ENERGÉTICO E DIMINUI A ANSIEDADE  
RELACIONADA À ALIMENTAÇÃO**

*Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de **Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo**.  
Área de Concentração: Nutrição.*

**Orientadora:** Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Prada

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA ALUNA NATÁLIA FERREIRA MENDES, E ORIENTADA PELA PROF(A). DR(A). PATRÍCIA DE OLIVEIRA PRADA.

LIMEIRA

2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas  
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

M522r Mendes, Natália Ferreira, 1988-  
Redução da expressão de PTP1B na amígdala de ratos obesos altera o metabolismo energético e diminui a ansiedade relacionada à alimentação / Natália Ferreira Mendes. – Limeira, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Patrícia de Oliveira Prada.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Amígdalas. 2. Proteína tirosina fosfatase. 3. Insulina. 4. Obesidade. 5. Ansiedade. I. Prada, Patrícia de Oliveira, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Reduction of PTP1B expression in the amygdala of obese rats modulates energy metabolism and reduces feeding-like anxiety behavior

**Palavras-chave em inglês:**

Amygdalas

Protein-tyrosine phosphatase

Insulin

Obesity

Anxiety

**Área de concentração:** Nutrição

**Titulação:** Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

**Banca examinadora:**

Patrícia de Oliveira Prada [Orientador]

Márcio Alberto Torsoni

Gabriel Forato Anhô

**Data de defesa:** 01-04-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

**Autora:** Natália Ferreira Mendes

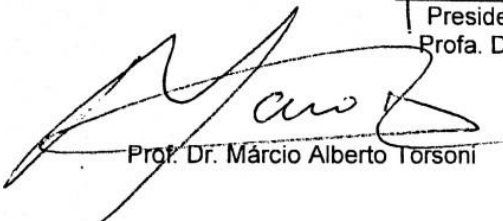
**Título:** Redução da expressão de PTP1B na amígdala de ratos obesos altera o metabolismo energético e diminui a ansiedade relacionada à alimentação.

**Natureza:** Dissertação de Mestrado


**Instituição:** Faculdade de Ciências Aplicadas/UNICAMP – Limeira/SP

**Data da defesa:** 01 de abril de 2016

**BANCA EXAMINADORA:**



Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni



Presidenta da Comissão Julgadora  
Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Prada



Prof. Dr. Gabriel Forato Anhô

*“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino. A educação necessita tanto de formação técnica e científica como de sonhos e utopias”.*

Paulo Freire

*Dedico este trabalho...*

Aos meus pais, Sílvia e Mário, que sempre me apoiaram e me incentivaram na busca dos meus ideais, me educando e me ajudando a crescer.

À minha irmã, Marina, que pela própria existência e pelo amor incondicional, sempre me motivou a nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu companheiro, Fábio, que esteve ao meu lado nas conquistas e nos momentos mais difíceis, me fortalecendo para continuar sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

---

À professora Dra. Patrícia de Oliveira Prada, minha orientadora, por me receber de braços abertos e por toda a orientação, apoio e confiança em meu trabalho.

Ao professor Dr. Mário José Abdalla Saad, por ceder, gentilmente, seu laboratório na FCM/UNICAMP para a realização desse estudo.

Às colegas de trabalho do LabIMO, pelas contribuições e ajuda nos experimentos.

Aos funcionários do LICRI e do Biotério da FCM/UNICAMP, fundamentais para que este trabalho se realizasse.

Ao Wagner, funcionário da Pós-Graduação da FCA/UNICAMP, por me auxiliar com toda a burocracia e documentação.

Aos colegas do mestrado e doutorado da Pós-Graduação do CNEM na FCA/UNICAMP, pelas aulas, trabalhos, apresentações e aprendizado em conjunto.

Aos alunos da graduação em Nutrição da UNICAMP, que muito contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional durante meu estágio docente.

À professora Dra. Patrícia Aline Boer, por dividir conosco, cordialmente, o aparato de teste comportamental do Laboratório de Metabolismo Hidrossalino da FCM/UNICAMP.

Aos professores Dr. Everardo Carneiro, do IB/UNICAMP, e Dr. Lício Augusto Velloso, da FCM/UNICAMP, por possibilitarem a utilização do equipamento de respirometria.

Ao CEPID OCRC, por manter a chama da difusão do conhecimento científico para a comunidade acesa e apoiar tantas ideias.

Aos meus amigos e familiares por todo o apoio e torcida, mas principalmente pela compreensão nas minhas ausências.

À CAPES e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

A insulina participa do controle da ingestão alimentar e sua ação ocorre através de uma cascata de eventos intracelulares principalmente em neurônios hipotalâmicos. Indivíduos obesos produzem citocinas inflamatórias que ativam proteínas fosfatases, como a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), que interagem com proteínas da via de sinalização da insulina, reduzindo sua ação anorexigênica. A insulina também tem efeitos diretos em outras regiões cerebrais que integram o sistema dopaminérgico de recompensa, como a amígdala. Uma vez que esse sistema é alvo da complexa rede neuronal do controle do apetite, e também pode estar sendo modulado negativamente na obesidade, é de suma importância investigar terapias que possam regular sua atividade. Em vista disso, o objetivo do estudo foi investigar a expressão de PTP1B no núcleo central da amígdala (CeA) e verificar se a sua redução poderia melhorar a ação e sinalização da insulina nessa região, bem como o metabolismo energético em animais obesos. Os animais alimentados com dieta rica em gordura saturada apresentaram maior ganho de peso corporal, resistência à insulina, e maior expressão de PTP1B no CeA em relação aos animais alimentados com dieta padrão. Quando tratados com oligonucleotídeo antisense para PTP1B, os animais obesos apresentaram redução da expressão dessa proteína no CeA, melhora da sinalização da insulina, redução da ingestão alimentar, perda de peso corporal, aumento do gasto energético e melhora da homeostase glicêmica, bem como diminuição do comportamento de ansiedade relacionada à alimentação em comparação aos animais obesos tratados com oligonucleotídeo sense. Esses resultados sugerem que a redução da expressão da PTP1B no CeA melhora a sensibilidade à insulina, modula a homeostase energética e glicêmica e reduz a ansiedade dos animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, dando subsídio para o desenvolvimento de novas terapêuticas para o tratamento da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2.



## **ABSTRACT**

---

Control of food intake depends, in part, on the action and signaling of hormones, such as insulin in the hypothalamus and in the dopaminergic reward system, that are interconnected. In obesity, inflammatory cytokines activate protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) that interacts with the insulin receptor, inhibiting it in the hypothalamus and increasing hunger, but it is not known whether PTP1B participates in the regulation of insulin signaling in the amygdala. Male Wistar rats were divided into two groups: Chow, fed with standard rodent chow, and HFD, that received high-fat diet, both for 8 weeks. We performed the dissection of the central nucleus of amygdala (CeA) to assess PTP1B protein expression in both groups. Obese rats underwent to stereotactic surgery for implantation of the cannula in CeA. After recovery, they were treated with sense and antisense oligonucleotide (ASO) for 1 week to reduce the expression of PTP1B in CeA, resulting in 2 subgroups: Sense and ASO. During treatment, the parameters measured were blood glucose, body weight and food intake. At the end of treatment, rats were submitted to behavioral tests, and assessment of body composition and energy expenditure. Here we show that rats fed high-fat diet had greater body weight gain, insulin resistance and increased PTP1B expression in the CeA compared to Chow group. When treated with ASO, obese rats showed reduced PTP1B expression in the amygdala, loss of body weight, lower food intake, and improved of glucose and energy homeostasis, besides decreased in anxiolytic feeding behavior. These findings subsidize the efficacy of PTP1B reduction to improve insulin resistance and its anorexigenic response in obesity.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

---

	<b>Pág</b>
<b>Figura 1.</b> Sinalização da insulina no hipotálamo .....	16
<b>Figura 2.</b> PTP1B no hipotálamo de animais obesos .....	18
<b>Figura 3.</b> Representação da localização anatômica da amígdala em humanos e da sua subdivisão em núcleos .....	20
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática das conexões da amígdala com outras regiões do SNC .....	20
<b>Figura 5.</b> Hipótese sobre o envolvimento da PTP1B na resistência à insulina em resposta à dieta hiperlipídica .....	23

## LISTA DE ABREVIÇÕES

---

Akt - protein kinase B  
AMPK - 5' AMP-activated protein kinase  
ARC - núcleo arqueado  
BLA - núcleo basolateral da amígdala  
CCK - colecistoquinina  
CeA - núcleo central da amígdala  
FoxO1 - forkhead box  
GLP-1 - peptídeo-1 similar ao glucagon  
IKK $\beta$  - I kapa B kinase  $\beta$   
IL-1 $\beta$  - interleucina 1 $\beta$   
IL-6 - interleucina 6  
IR - Receptor de Insulina  
IRS - Substrato do receptor de insulina  
JAK2- janus quinase-2  
JNK - c-Jun amino-terminal kinase  
MAN – núcleo medial da amígdala  
mRNA - ácido ribonucleico mensageiro  
NF $\kappa$ B - fator nuclear kappa B  
NPY- neuropeptídeo Y  
PEPCK - carboxiquinase fosfoenolpiruvato  
PI3K -fosfatidilinositol-3-quinase  
PKC $\theta$  - protein kinase C theta  
PTP - proteína tirosina fosfatase  
PTP1B - proteína tirosina fosfatase 1B  
PVN - núcleo paraventricular  
SNC - sistema nervoso central  
STAT- transdutor-de-sinal-e-ativadores-de-transcrição  
TAM - tecido adiposo marrom  
TLR-4 – toll-like receptor 4

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral-alfa

UCP1 - uncoupling protein 1

VMH - núcleo ventromedial

## SUMÁRIO

---

	<b>Pág</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
Regulação do balanço energético .....	14
Mecanismos de resistência à insulina na obesidade .....	16
Proteínas fosfatases e resistência à insulina no SNC .....	17
Amígdala e a regulação do apetite .....	19
<b>OBJETIVOS</b> .....	24
<b>CAPÍTULO 1 - ARTIGO</b> .....	25
<b>DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>CONCLUSÃO</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56
<b>ANEXOS</b> .....	65
Anexo 1 - Aprovação do comitê de ética em pesquisa .....	65
Anexo 2 - Publicação do resumo do trabalho em revista internacional .....	66

## **INTRODUÇÃO**

---

Mudanças no estilo de vida, como o aumento do consumo de dietas hipercalóricas e a redução dos níveis de atividade física, têm contribuído com a epidemia da obesidade no mundo (Flier, 2004; Ahima, 2011; Malik et al. 2013).

Em 2014, a Organização Mundial da Saúde (WHO) estimou que 39% da população adulta mundial, com 18 anos ou mais, apresentava sobrepeso, e mais de 13% estava obesa. Além disso, em 2013, mais de 42 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade já apresentavam sobrepeso ou obesidade. Mais recentemente, no Brasil, dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), publicados em 2015, revelaram que 56,9% das pessoas com 18 anos ou mais estavam com excesso de peso. Além disso, 20,8% da população nesta faixa etária estava obesa.

Com a manutenção ou progressiva acentuação desse novo estilo de vida, o prognóstico é de aumento das taxas de prevalência de obesidade e doenças associadas a ela; uma verdadeira ameaça à saúde pública em quase todos os países do mundo. Diante deste cenário, profissionais da saúde recomendam uma série de mudanças no estilo de vida, que geralmente envolvem modificações nos hábitos alimentares e a prática de exercício físico. Entretanto, essas medidas são geralmente efetivas apenas por um curto período de tempo e as recidivas do ganho de massa corporal são muito frequentes.

Os medicamentos desenvolvidos para o tratamento da obesidade, até o momento, embora sejam eficazes em reduzir a massa corporal e melhorar as complicações metabólicas associadas, ainda apresentam vários efeitos colaterais (Kakkar e Dahiya, 2015). Em vista disso, outras opções de tratamentos possíveis dessa doença, e de suas complicações associadas, e o estudo dos mecanismos moleculares relacionados ao seu desenvolvimento, vêm sendo alvos de muitos estudos científicos nos últimos anos.

### **Regulação do balanço energético**

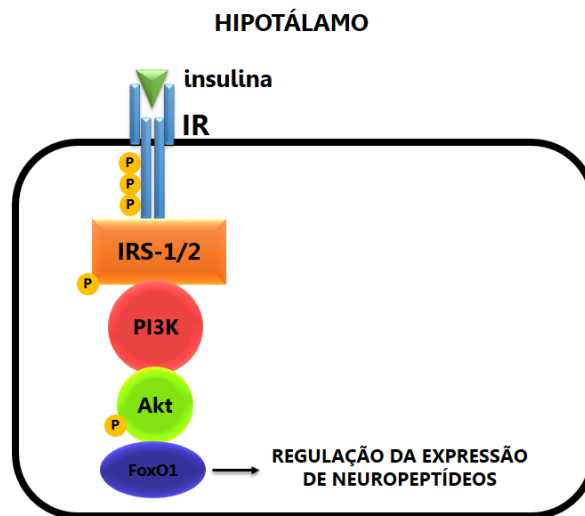
O equilíbrio diário do balanço energético e a manutenção do peso corporal normal dependem da regulação da ingestão alimentar e do gasto energético total, desempenhada principalmente pelo sistema nervoso central. O hipotálamo tem recebido grande destaque nesse quesito por receber e integrar sinais oriundos de nutrientes e hormônios, ajustando

a homeostase energética de acordo com essas variações internas. Essa regulação por ele exercida é conhecida como controle homeostático e alterações nesse sistema podem resultar em maior ou menor armazenamento de energia, conduzindo à redução ou ao aumento de gordura corporal (Schwartz et al. 2000).

Hormônios gastrointestinais, como colecistoquinina (CCK), peptídeo-1 similar ao glucagon (GLP-1) e grelina, assim como alguns nutrientes, influenciam circuitos neuronais que controlam o peso corporal (Nakazato et al. 2001; Batterham et al. 2002). Além desses, hormônios produzidos como resultado do aumento da adiposidade, como a leptina, também agem sobre os núcleos hipotalâmicos modulando-os.

Um grande destaque na regulação do balanço energético é a insulina; um hormônio polipeptídico anabólico produzido pela porção endócrina do pâncreas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos no período pós-prandial. Apresenta receptores expressos por todo o organismo, incluindo o SNC, nos quais se liga e ativa vias de sinalização intracelular (Schinner et al. 2005). A insulina apresenta uma variedade de efeitos metabólicos, como aumento da captação de glicose e da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como redução da produção hepática de glicose, lipólise e proteólise. Ademais, interfere na expressão gênica, na proliferação e diferenciação celulares, aumenta a produção de óxido nítrico no endotélio e previne apoptose celular. Além desses efeitos, a insulina também apresenta um papel primordial na modulação da homeostase energética em resposta ao estado nutricional e ao aumento da massa adiposa.

No hipotálamo, sua ação é mediada pelo receptor de insulina (IR), uma glicoproteína heterotetramérica com atividade de tirosina quinase intrínseca em sua subunidade  $\beta$ . Essa é ativada pela ligação da insulina, que leva a uma mudança conformacional do receptor e o autofosforila em múltiplos resíduos de tirosina (Plum et al. 2005). Subsequentemente, fosforila substratos proteicos que contém o domínio SH2, como, por exemplo, os substratos do receptor de insulina (IRS), principalmente IRS-1 e o IRS-2 (Cheatham e Kahn, 1995). A fosforilação de IRSs promove a ligação e a ativação da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) que ativa Akt, uma serina/treonina quinase. Uma vez fosforilada, a Akt contribui para vários processos biológicos, incluindo a captação de glicose e a regulação da expressão dos neuropeptídeos ligados ao controle da homeostase energética, pela exclusão do fator de transcrição FoxO1 do núcleo da célula (Virkamaki et al. 1999).



**Figura 1.** Sinalização da insulina no hipotálamo.

A insulina também pode regular a ingestão alimentar e a termogênese através da ativação da enzima janus quinase-2 (JAK2), que possui atividade tirosina quinase intrínseca e é ativada após a ligação da insulina no IR. Uma vez ativada, a JAK2 induz a formação de um sítio de ligação para as proteínas STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcriptions*), predominantemente STAT3, a qual conecta o sinal da insulina ao controle da transcrição de genes de neurotransmissores envolvidos com o controle da fome e da termogênese (Carvalho et al. 2005).

### **Mecanismos de resistência à insulina na obesidade**

A inflamação subclínica característica da obesidade está diretamente envolvida no desenvolvimento da resistência à insulina e tem como principal causa a ingestão de dieta hiperlipídica, rica em gordura saturada (De Souza et al. 2005; Prada et al. 2005).

O tecido adiposo, além de ter como principal função o armazenamento de energia, também desempenha função endócrina e moduladora da resposta imune, produzindo adipocinas em relação proporcional e direta à massa adiposa, as quais atuam de forma parácrina e autócrina (Waki e Tontonoz, 2007). Entre essas, estão o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas, como IL-1 $\beta$  e IL-6, que participam de mecanismos complexos que regulam negativamente a sinalização de insulina em diferentes tecidos (Tilg e Moschen, 2006).



Essa inflamação subclínica na obesidade não se limita aos tecidos periféricos, podendo também atingir o hipotálamo após poucos dias de consumo de dieta rica em ácidos graxos saturados (Thaler e Schwartz, 2010). Os mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento da resistência à insulina hipotalâmica do obeso ainda não estão totalmente esclarecidos. Alguns estudos sugerem que ácidos graxos saturados e/ou LPS absorvidos no trato gastrointestinal podem atuar como agonistas do *toll-like receptor 4* (TLR4) em células hipotalâmicas (Cani et al. 2007; Tsukumo et al. 2007; Milanski et al. 2010), levando a ativação de proteínas quinases, como IKK $\beta$  e JNK, que além de participarem do processo inflamatório podem fosforilar o IRS-1 em serina, no sítio 307, inibindo a sinalização da insulina e desencadeando, dessa forma, a resistência à insulina.

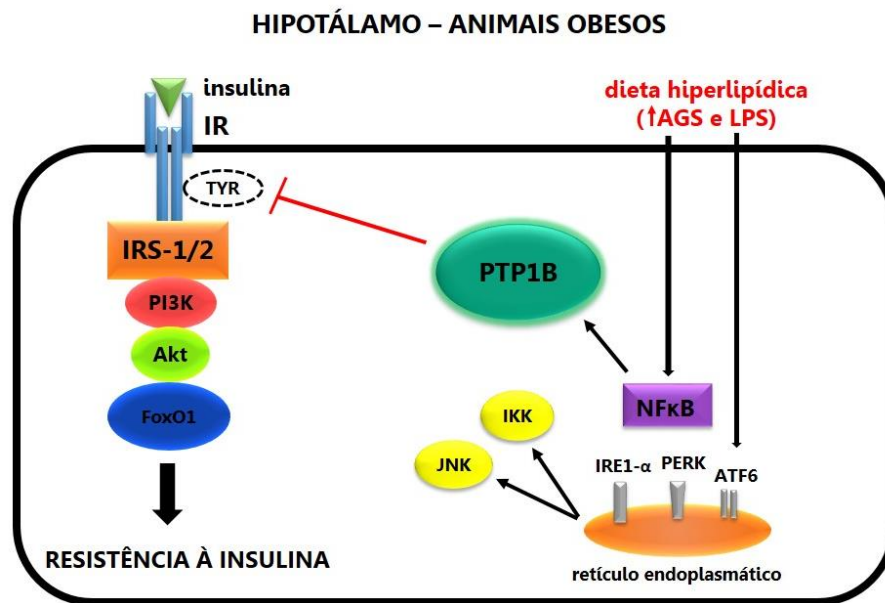
### **Proteínas fosfatases e resistência à insulina no SNC**

Outro mecanismo resultante do processo inflamatório que ocorre na obesidade é a ativação de proteínas tirosina fosfatases (PTPs). Essas moléculas têm papel chave na sinalização celular, influenciando o metabolismo, o crescimento e a diferenciação celular e, desse modo, contribuindo potencialmente para o desenvolvimento de várias doenças.

A proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) é uma das PTPs mais estudadas e tem um papel crítico na regulação da via de sinalização da insulina, incluindo o estado de resistência a este hormônio (Goldstein, 2001; Ukkola e Santaniemi, 2002; Cho, 2013; Bakke e Haj, 2014). A PTP1B catalisa a retirada de grupos fosfato de resíduos tirosina de IR e IRS-1 e é ativada por meio de mecanismos inflamatórios, reduzindo a transmissão de sinal dessa via (Asante-Appiah e Kennedy, 2003).

Em animais alimentados com dieta hiperlipídica a maior expressão de TNF- $\alpha$ , juntamente com o LPS absorvido no trato gastrointestinal e os ácidos graxos saturados provenientes da dieta, aumentam a expressão e a atividade da PTP1B no hipotálamo através da via NF $\kappa$  $\beta$ , resultando em resistência à insulina, e também à leptina, seguida da desregulação do balanço energético (Picardi et al, 2010; Ito et al. 2012) (Fig. 2).

Já foi demonstrado que o estresse do retículo endoplasmático em células C2C12 também aumenta a expressão de PTP1B, prejudicando a captação de glicose (Panzhinskiy et al. 2013), e que sua inibição melhora as respostas moleculares e fisiológicas a esse estresse (Popov, 2012).



**Figura 2.** PTP1B no hipotálamo de animais obesos

Muitos estudos examinaram a expressão de PTP1B em roedores e humanos com resistência à insulina, diabetes e obesidade, e reportaram que há um aumento da expressão e da atividade dessa proteína fosfatase nessas condições (Ahmad e Goldstein, 1995; Venable et al. 1999; Ropelle et al. 2006). A capacidade da PTP1B em regular negativamente a via da insulina foi estabelecida em nível molecular (Myers et al. 2001) e tem sido sugerido, há muito tempo, que a sua inibição, ou a redução da sua expressão, possam ser estratégias eficazes para o tratamento de diabetes e obesidade (Koren e Fantus, 2007; Barr, 2010; Popov, 2011).

Camundongos geneticamente modificados, que não expressam PTP1B, e animais tratados com um oligonucleotídeo antisense específico para essa fosfatase, apresentam redução nos níveis pós-prandiais de glicose e de insulina circulantes, bem como melhora da sinalização da insulina e da tolerância à glicose. Além disso, apresentam redução do estoque de triglicerídeos no tecido adiposo e resistência ao ganho de peso, mesmo quando alimentados com dieta hiperlipídica (Elchebly et al. 1999; Goldstein, 2002). Elchebly et al (1999) observaram aumento e prolongamento da fosforilação de IR estimulada pela insulina no músculo esquelético e no fígado, e aumento da fosforilação de IRS-1 no músculo. A magreza nesses camundongos está associada ao aumento da taxa metabólica basal e do gasto energético total (Klaman et al, 2000).

Estudos analisando o efeito do exercício físico sobre a melhora da via de sinalização da insulina mostraram que este diminui a expressão de PTP1B em tecidos

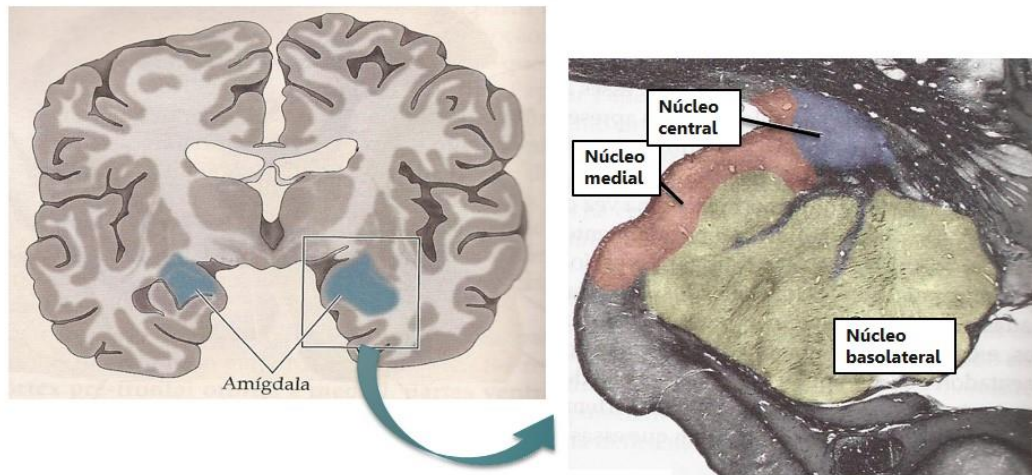
periféricos (Ropelle et al. 2006; De Moura et al. 2013). Trabalhos mais recentes que investigaram o efeito de fármacos que inibem a PTP1B em cultura de células também observaram melhora da resistência à insulina (Ding et al. 2014; Kitazawa et al. 2014; Mobasher et al. 2014).

A redução da PTP1B com oligonucleotídeo antisense no hipotálamo promove redução de peso e melhora a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose em ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Picardi et al. 2008). A deleção do gene *Ptpn1* em neurônios no núcleo ventromedial do hipotálamo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica melhora a sensibilidade à insulina e reduz a ingestão alimentar (Chiappini et al. 2014).

Os estudos supracitados acerca dos efeitos negativos da proteína fosfatase PTP1B sobre a sinalização de insulina foram realizados, até o momento, em culturas de células e no hipotálamo e tecidos periféricos em modelos animais. Contudo, recentes evidências têm demonstrado que a insulina também tem efeitos diretos em outras regiões do sistema nervoso envolvidas com o comportamento alimentar. Algumas dessas regiões fazem parte do sistema córtico-límbico e estão envolvidas no controle de várias funções cognitivas e emotivas, como aprendizado, memória, recompensa, aversão, medo e ansiedade, dessa forma, modulando o comportamento alimentar (Farooqi et al. 2007; Tye et al. 2011). Esse sistema também funciona como um sensor dos sinais que representam a disponibilidade de energia no organismo, estimulando a procura por alimento (Berthoud, 2007).

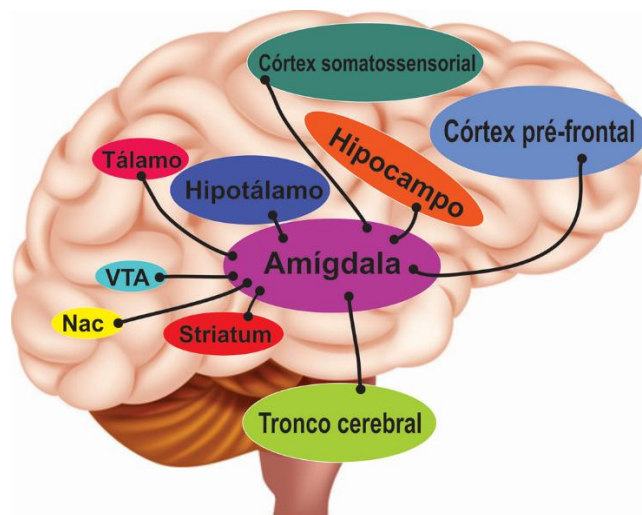
### **Amígdala e a regulação do apetite**

A amígdala, localizada na região ântero-medial do lobo temporal, faz parte do sistema dopaminérgico de recompensa (Fig. 3). É constituída por núcleos subcorticais (central, medial e basolateral) e está envolvida na atribuição de significado emocional a estímulos ambientais e na regulação das respostas fisiológicas e comportamentais a esses estímulos (Berthoud, 2007).



**Figura 3.** Representação da localização anatômica da amígdala em humanos e da sua subdivisão em núcleos. Adaptado de Purves et al (2004).

Assim como outras regiões cerebrais, apresenta muitos receptores de insulina e vários sistemas neuropeptidérgicos ativos (Boghossian et al. 2009). Além disso, apresenta conexões com o hipotálamo e com outras regiões do sistema nervoso central, como o córtex pré-frontal, tálamo, hipocampo, córtex somatossensorial, tronco cerebral e várias outras estruturas do sistema límbico (Fig. 4). Historicamente, tem sido atribuída a amígdala muitos aspectos da regulação do comportamento alimentar (White e Fisher, 1969; Montgomery e Singer, 1975).



**Figura 4.** Representação esquemática das conexões da amígdala com outras regiões do SNC.

Alguns estudos com humanos, utilizando ressonância magnética funcional, observaram que a atividade da amígdala em resposta a estímulos com imagem de alimentos foi muito semelhante ao observado no hipotálamo (Fletcher et al. 2010). Em resposta aos mesmos estímulos, indivíduos obesos portadores da síndrome Prader-Willi também tiveram aumento da atividade dessa região (Holsen et al. 2006), o que também ocorreu quando administrou-se grelina, via injeção intravenosa, em indivíduos com peso normal (Malik et al. 2008).

Os estudos com neuroimagem revelaram que a amígdala tem um papel essencial sobre os mecanismos que envolvem as representações das experiências com o alimento, as quais apresentam um forte componente emocional (Berthoud, 2007). Segundo Petrovich et al (2005), a influência da amígdala sobre a ingestão alimentar se deve a uma rede funcional com projeções diretas dessa estrutura em direção ao córtex orbital e ao hipotálamo lateral; regiões também ativadas quando alimentos são apresentados a indivíduos com fome.

Em estudos com animais, lesões na amígdala alteraram a ingestão calórica, a preferência alimentar e, conseqüentemente, o peso corporal. King et al (1994) verificaram que lesões bilaterais na região póstero-dorsal da amígdala de ratas resultaram em hiperfagia e excesso de ganho de peso. Em um estudo subsequente, King et al (1996) observaram que, em paralelo à hiperfagia e ao aumento da adiposidade, as lesões da amígdala induziam hiperinsulinemia em ratas alimentadas com dieta padrão. Mais recentemente, King et al (1998) verificaram que lesões nessa região também prejudicam a capacidade de ajustar a ingestão de alimentos em diferentes situações, concluindo que essa área do cérebro está diretamente envolvida na seleção do tipo de dieta. De acordo com os autores, a amígdala também está envolvida na modulação do apetite através do núcleo ventromedial do hipotálamo, já que lesões nessa região também levam a alterações semelhantes.

Ratos alimentados com dieta hipolipídica ou dieta padrão apresentam redução da ingestão alimentar em resposta à insulina no núcleo central da amígdala (CeA), assim como ocorre no hipotálamo (Boghossian et al. 2009; Castro et al. 2013). Essa redução da ingestão alimentar está diretamente ligada com a ativação da sinalização da insulina (Castro et al, 2013). Para verificar se a ação da insulina na amígdala ocorre pela mesma via do hipotálamo (IR/PI3K/Akt), Castro et al (2013) injetaram LY (240002), um inibidor da PI3K, no CeA, e observaram que a ação anorexigênica da insulina foi bloqueada, comprovando que a ação da insulina na amígdala também é dependente de PI3K. Essa

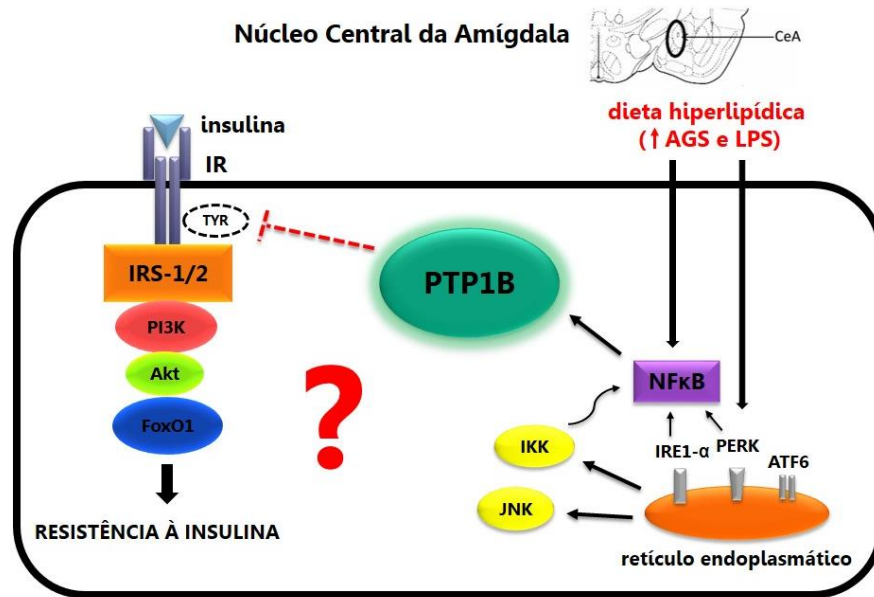
ação anorexigênica foi atribuída, pelo menos em parte, a um aumento da expressão de oxitocina, neuropeptídeo anorexigênico, e pela redução da expressão do neuropeptídeo Y (NPY) que é orexigênico, em resposta à insulina no CeA (Castro et al. 2013). Além disso, outros autores observaram que a insulina nessa região também é capaz de aumentar a fosforilação de Akt, não apenas no CeA, como também no hipotálamo (Oh et al. 2013), sugerindo que há uma conexão entre essas duas regiões cerebrais, importante para o controle da ingestão alimentar.

Ao avaliar como estaria a ação e sinalização da insulina no CeA em animais com obesidade, Boghossian et al (2009) demonstraram que, em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, a administração de injeções de insulina na região do CeA não induziu anorexia como nos animais controles. Castro et al (2013), ao analisarem a sinalização da insulina no CeA de ratos obesos, também observaram que essa região, semelhante ao hipotálamo, apresentava resistência a esse hormônio, assim como inflamação de baixo grau e estresse do retículo endoplasmático.

Como mencionado anteriormente, a ativação de serina quinases como proteína quinase C theta (PKC $\theta$ ), JKN e IKK $\beta$  também estão diretamente envolvidas com a resistência à insulina. Em ratos alimentados com dieta hiperlipídica observa-se maior ativação de PKC $\theta$  no CeA, com consequente ganho de peso, aumento da massa adiposa, aumento da ingestão alimentar e, por fim, resistência à insulina nessa região cerebral (Park-York et al. 2013). Dessa forma, esses dados sugerem que a PKC $\theta$  também atue como uma importante serina quinase na amígdala, prejudicando a sinalização da insulina e seu controle sobre a homeostase energética.

Uma recente revisão realizada por Areias e Prada (2015) analisou o resultado desses e de muitos outros estudos acerca do papel da amígdala sobre o comportamento alimentar e concluiu que a amígdala é uma região essencial para o controle do apetite, e que a insulina tem um papel importante nesta função. Na obesidade, contudo, assim como já bem estabelecido no hipotálamo, há uma série de alterações que desregulam a ação e sinalização da insulina nessa região, sendo que os principais mecanismos envolvidos são a maior ativação das serina quinases e o estresse do retículo endoplasmático.

Diante do exposto, o presente estudo buscou avançar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência à insulina na amígdala, em animais alimentados com dieta hiperlipídica, que podem alterar o comportamento alimentar e a homeostase energética (Fig. 5).



**Figura 5.** Hipótese sobre o envolvimento da PTP1B na resistência à insulina em resposta à dieta hiperlipídica

## **OBJETIVOS**

---

### **Objetivo Geral**

Investigar se a PTP1B pode ser implicada como um mecanismo de resistência à insulina no CeA da amígdala de animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

### **Objetivos específicos**

- 1) Investigar a expressão de PTP1B no CeA de animais alimentados com dieta padrão e hiperlipídica.
- 2) Investigar a eficácia da redução da expressão da PTP1B com oligonucleotídeo antisense no CeA de animais obesos sobre a via de sinalização da insulina.
- 3) Avaliar a eficácia da redução da expressão da PTP1B com oligonucleotídeo antisense no CeA de animais obesos sobre os parâmetros metabólicos.
- 4) Avaliar o impacto da redução da expressão da PTP1B com oligonucleotídeo antisense no CeA de animais obesos sobre a ação anorexigênica da insulina.
- 5) Investigar as alterações comportamentais relacionadas à ansiedade após redução da expressão da PTP1B com oligonucleotídeo antisense no CeA de animais obesos.



**Reduction of PTP1B expression in the amygdala of diet-induced obese rats modulates energy metabolism and reduces feeding-like anxiety behavior**

Natália Ferreira Mendes<sup>1</sup>, Gisele Castro<sup>2</sup>, Dioze Guadagnini<sup>2</sup>, Natália Tobar<sup>2</sup>, Patrícia Aline Boer<sup>2</sup>, Patrícia Oliveira Prada<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Applied Sciences, State University of Campinas, UNICAMP, 13484-350, Limeira - SP, Brazil

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine, State University of Campinas, UNICAMP, 11060-001, Campinas - SP, Brazil

**\*Corresponding author:**

Patrícia Oliveira Prada, M.D., Ph.D., Professor

School of Applied Sciences, State University of Campinas, UNICAMP

Rua Pedro Zaccaria, 1300

13484-350 Limeira - SP - Brazil

Phone: +55 19 37016650

E-mail: pprada.fca@gmail.com

**ABSTRACT**

**Objective:** Control of food intake depends, in part, on the action and signaling of hormones, such as insulin in the hypothalamus and in the dopaminergic reward system, that are interconnected. In obesity, inflammatory cytokines activate protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) that interacts with the insulin receptor, inhibiting it in the hypothalamus and increasing hunger, but it is not known whether PTP1B participates in the regulation of insulin signaling in the amygdala.

**Methods:** Male Wistar rats were divided into two groups: Chow, fed with standard rodent chow, and DIO, that received high-fat diet, both for 8 weeks. We performed the dissection of the central nucleus of amygdala (CeA) to assess PTP1B protein expression in both groups. Obese rats underwent to stereotactic surgery for implantation of the cannula in CeA. After recovery, they were treated with sense and antisense oligonucleotide (ASO) for 1 week to reduce the expression of PTP1B in CeA, resulting in 2 subgroups: Sense and ASO. During treatment, the parameters measured were blood glucose, body weight and food intake. At the end of treatment, rats were submitted to behavioral tests, and assessment of body composition and energy expenditure.

**Results:** Here we show that rats fed high-fat diet had greater body weight gain, insulin resistance and increased PTP1B expression in the CeA compared to Chow group. When treated with ASO, obese rats showed reduced PTP1B expression in the amygdala, loss of body weight, lower food intake, and improved of glucose and energy homeostasis, besides decreased in anxiolytic feeding behavior.

**Conclusion:** These findings subsidize the efficacy of PTP1B reduction to improve insulin resistance and its anorexigenic response in obesity.

**Keywords:** amygdala, PTP1B, insulin, obesity, food intake, anxiety

### **Abbreviations:**

Akt: protein kinase B; ARC: arcuate nucleus; BLA: basolateral nucleus of amygdala; BW: body weight; CeA: central nucleus of amygdala; DIO: diet-induced obesity; IKK $\beta$ : I kapa B kinase  $\beta$ ; IL-10: interleucin 10; IR: insulin receptor; MAN: medial nucleus of amygdala; mRNA: messenger ribonucleic acid; NF $\kappa$ B: nuclear factor kappa B; NPY: neuropeptide Y; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; PKC $\theta$ : protein kinase C theta; PTP1B: protein tyrosine phosphatase 1B; PVN: paraventricular nucleus; CNS: central nervous system; BAT: brown adipose tissue; TLR-4: toll-like receptor 4; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor-alpha; UCP1: uncoupling protein 1; VMH: ventromedial nucleus.

## **1. INTRODUCTION**

Hypothalamus participates of the autonomic control of food intake in response to many hormones, such as insulin. The dopaminergic reward system also is involved in the hunger control in response to this hormone but mostly presents a role-like emotions and behaviors. Insulin acts both in the hypothalamus as in the central nucleus of amygdala (CeA) throughout IR/PI3K/Akt pathway leading to an anorectic response [1, 2].

In obesity, RE stress and the inflammatory cytokines in central nervous system can activate protein phosphatases, such as protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), that interacts with the insulin receptor (IR), inhibiting it in the hypothalamus and leading to hyperphagia and impaired in energy and glucose homeostasis [3]. It occurs because, in inflammation, TNF- $\alpha$  increases and, consequently, there is a higher activation of NF $\kappa$ B that is directly related to an increased expression of PTP1B [4, 5, 6, 7]. ER stress has also been positively correlated with the PTP1B protein expression [8, 9, 10]. Diet-induced obese rats also present insulin resistance, RE stress and low-grade inflammation in the CeA with lower response to insulin stimulus [2].

Based on the fact that the animals fed with high-fat diet are hyperphagic, and considering that the other brains regions despite hypothalamus are also involved in the control of food intake and energy homeostasis, the aim of this study was evaluated the PTP1B expression in the CeA and if this phosphatase could impaired insulin action or signaling pathway like in hypothalamus of diet-induced obese rats.

## 2. METHODS

### 2.1. Reagents, Antibodies and Oligonucleotides

Sense and antisense phosphorothioate oligonucleotides specific for PTP1B (sense, 5'-AAA GTG CTG TTG G-3' and antisense, 5'-CCA ACA GCA CTT T-3') were produced by Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Routine reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA). Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Human recombinant insulin was from Eli Lilly and Co. (Indianapolis, IN, USA). Antibodies against phospho-IR (sc25103), IR (sc711), UCP1 (sc6529) and PEPCK (sc32879) were from Santa Cruz Biotechnology (California, USA). Anti-PTP1B (ab52650) was from Abcam (Massachusetts, USA). Antibodies against  $\alpha$ -tubulin (#2144) and  $\beta$ -actin (#4967) were from Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA). Primers and probes sequences were purchased from Applied Biosystems and were: Oxytocin (Rn00564446\_g1), neuropeptide Y (NPY) (Rn0141015\_m1), Ptpn1 (Rn01423685\_m1) and UCP1 (Rn01432911\_m1) for rat. Kits to perform ELISA were Rat IL-10 (#ERIL10) and Rat TNF alpha (# ER3TNFA) from Thermo Scientific, and Rat Leptin (# EZRL-83K), Rat Adiponectin (# EZRADP-62K) and Rat/Mouse Insulin (#EZRMI-13K) from Millipore.

### 2.2 Animal Characterization

Eight weeks old male Wistar rats from the State University of Campinas (UNICAMP) Central Animal Breeding Center weighing approximately 200 g, were housed in groups of 4-5 per cage. Room temperature was controlled ( $22 \pm 1$  °C) and a light-dark cycle was maintained on a 12-h on-off cycle. Food and water were available *ad libitum*. All experiments were approved by the Ethics Committee at the State University of Campinas. Animals were randomly divided into two groups: control rats, fed with standard rodent chow (Chow) (70% carbohydrate, 20% protein and 10% saturated fat), and obese rats, fed with high-fat diet (DIO) (29% carbohydrate, 16% protein and 55% saturated fat) from Nuvilab (Sogorb Indústria e Comércio Ltda, Brazil) for 8 weeks.

### **2.3. ITT (Insulin Tolerance Test)**

After 8 weeks of the diet, awakened fasted rats were submitted to insulin tolerance test. Briefly, 1.5 IU/kg of human recombinant insulin was injected intraperitoneally and glycemia was measured at 0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min thereafter.

### **2.4. Cannula Implantation**

Obese rats were anesthetized with 70 mg/kg ketamine (Fort Dodge Animal Health, USA) and 2 mg/kg xylazine (Lloyd Laboratories, USA) and after the loss of corneal and pedal reflexes they were positioned on a stereotaxic instrument (Ultra Precise - model 963 - Kopf). Briefly, rats were implanted with unilateral cannulas (26 - gauge stainless - steel guide cannula) (Plastics One, USA) aimed to the central nucleus of the amygdala: [coordinates (AP/L/DV to bregma) -2.16/-4.00/-7.18mm] according to Paxinos and Watson as previously described [1, 2]. Cannulas were fixed using special glue and acrylic cement. Rats were allowed 5 days for recovery.

### **2.5. Oligonucleotide Treatment**

The sequences of phosphorothioate oligonucleotides, specific for PTP1B (sense, 5'-AAA GTG CTG TTG G-3' and antisense, 5'-CCA ACA GCA CTT T-3'), were used as previously described [3] and were evaluated by immunoblotting of total protein extracts of the CeA using specific anti-PTP1B antibody. After the cannula implantation and the recovery period, obese rats were housed in individual cages and treated with PTP1B sense oligonucleotide (Sense) or PTP1B antisense oligonucleotide (ASO). Both oligonucleotides were diluted in ultrapure water and the treatment was performed through cannula infusions, once a day (6:00 p.m.) with a total volume of 2.0 µl/dose (4.0 nmol/µl) for 7 days.

### **2.6. Metabolic Parameters**

At the end of the diet period, and during the treatment with antisense or sense oligonucleotides, body weight (BW) and the blood glucose concentration were measured. After the treatment, BW and fasting glucose were measured. The food was removed 10 hours before the experiments. Blood samples were collected from the jugular vein for the determination of the serum concentrations of insulin, leptin, adiponectin, IL-10, and TNF-α levels, which were measured by ELISA.

## **2.7. Protocol for Food Intake Determination**

Food intake was measured in the home cage. During the treatment, the food was measured daily. At the end of the treatment period, rats were food deprived for 6 hours and then food intake was recorded for 4, 8, 12 and 24 hours after insulin (2  $\mu$ L) or saline (2  $\mu$ L) injection in the CeA.

## **2.8. DEXA**

After the end of oligonucleotide treatment rats were anesthetized and the body fat mass and lean mass contents were measured using a DEXA system (Discovery Wi QDR Series; Hologic Apex Software, Hologic Inc.).

## **2.9. $VO_2/VCO_2$ and Respiratory Exchange Ratio Determination**

$VO_2$ ,  $VCO_2$ , and respiratory exchange ratio (RER) were measured in fed rats through an indirect open-circuit calorimeter (Oxylet M3 system; PanLab/Harvard Apparatus). Animals were allowed to adapt 2 days before and measurements were done on the last day of oligonucleotide treatment.

## **2.10. Pyruvate Test**

On the last day of treatment, 12 hours fasted rats were injected with sodium pyruvate 1 g/kg body weight intraperitoneally. Blood samples were collected from the tail immediately before and at 15, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 min after the sodium pyruvate injection.

## **2.11. Tissue extraction, Immunoprecipitation, and Immunoblotting**

After 7 days of treatment, rats 10 hours fasted were anesthetized with 70 mg/kg ketamine and 2 mg/kg xylazine and, as soon as the loss of pedal and corneal reflexes, were treated with insulin or saline in the CeA. After 15 minutes, liver, brown adipose tissue and CeA were quickly extracted. CeA was dissected in a stainless-steel matrix with razor blades on ice [1, 2]. A pool of 5 rats per sample and 4 samples per group were used. Samples were immediately homogenized in buffer (1% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF, and 0.01 mg aprotinin/mL). Insoluble material was removed by centrifugation

(15.000 rpm) for 40 min at 4 °C and the protein concentration of the supernatants was determined using a Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, USA). Immunoblotting and immunoprecipitation were performed as previously described (Picardi et al 2008). Results were visualized by Chemi Doc XR+ System (Bio-Rad, USA). Densitometric analyzes were done using image J software.

## **2.12. RNA Isolation and RT-qPCR**

Rats have been fasted for 12 hours and then were decapitated. The fresh CeA was quickly dissected and the total RNA was isolated using RNeasy® Mini Kit (Cat: 74106 Quiagen Inc., CA, USA). RT-qPCR was performed using Taqman RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems) in an Mx3000P thermocycler (Stratagene). The PCR conditions were 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. Real time data were analyzed using the Data Assist 4.0 software (Applied Biosystems).

## **2.13. Behavioral Tests**

### **2.13.1. Elevated Plus Maze (EPM)**

EPM is a classical test for assessment of anxiety-related behavior. After 24 hours of habituation in the testing room, animals were placed individually in the center of the apparatus and could explore the maze for 5 min. EPM consists of two open arms (6 x 35 cm), two enclosed arms (6 cm x 35 cm x 20 cm), a central square (6 cm x 6 cm) and is elevated approximately 75 cm above the floor and has 3 sensors on each arm which detect the animal movement. Results were computed by the software Syslab Cross 2.2 (Insight, Brazil). The measured parameters included the percentage of the number of entries and the time spent on the open arms, excluding the time of permanence and the number of entries in the central square.

### **2.13.2 Novelty Suppressed Feeding (NSF)**

NSF assesses stress-induced anxiety by measuring the latency of an animal to approach and eat a familiar food in an aversive environment [11]. Rats were food-deprived 16 hours prior to the test, with water *ad libitum*. A piece of known high-fat diet was placed in the center of the open field apparatus (50 cm x 48 cm x 50 cm) with white opaque walls and

floor, and rats were placed in one of the corners. Latencies to approach and to begin eating were recorded with a limit of 10 min. As soon as the rat was observed to eat, or the 10-minute time limit was reached, the rat was quickly removed from the open field, placed in the home cage and observed again until began to eat in this your known place. Latency to eat and food intake during 10 min in the home cage were measured.

#### **2.14. Statistical Analysis**

Data were expressed as means  $\pm$ SEM of the number of independent experiments indicated. For statistical analysis, groups were compared using a One-tailed t-test or One-way ANOVA. The level of significance adopted was  $P < 0.05$ .

### **3. RESULTS**

#### **3.1. PTP1B expression is enhanced in the CeA of rats on HFD and its reduction improves insulin signaling**

As expected, rats fed with a high-fat diet for eight weeks gained more weight than rats on chow diet. After 8 weeks on HFD, ITT demonstrated insulin resistance in this group compared to the group of rats on chow (Fig. 1A and B). In addition, PTP1B gene and protein expression in the CeA were increased in rats on HFD compared to rats on chow (Figure 1C). Treatment with antisense oligonucleotide (ASO) for 7 days marked reduced Ptpn1 mRNA expression and PTP1B protein expression in the CeA of rats on HFD compared to rats treated with sense oligonucleotide (Sense) on the same diet (Fig. 1D). Besides that, ASO-treated rats showed lower PTP1B/IR association accompanied by increased IR tyrosine phosphorylation and AKT phosphorylation in response to insulin stimulation in the CeA (Fig. 1E-G).

#### **3.2. Reduction of PTP1B expression in the CeA of rats on HFD decreases adiposity by increasing energy expenditure and reducing food intake**

In order to evaluate the effect of reduced PTP1B expression in the CeA of rats on HFD, we treated the CeA of rats on HFD with ASO or Sense for 7 days and measured metabolic parameters. In this regard, ASO treatment induced a greater weight lost compared to sense-treated rats beginning at 5 up to 7 days of treatment (Fig. 2A). In addition to this



result, ASO treatment was able to reduce fat mass without altering lean mass measured by DEXA (Fig. 2 B and C). This finding suggests that the reduction of PTP1B in CeA of rats on HFD lead to leanness. The leanness may due to increased energy expenditure and/or reduction on food ingestion. We first measured energy expenditure of rats on HFD treated with ASO or Sense. There were no differences between treatments during the dark cycle regarding O<sub>2</sub> consumption and CO<sub>2</sub> production. However, treatment with ASO increased O<sub>2</sub> consumption during the light cycle. There was a tendency to higher CO<sub>2</sub> production in the light cycle of rats treated with ASO ( $p=0.0952$ ) (Fig. 2 D and E). ASO-treated rats had a reduction on RER, in both cycles compared to Sense-treated rats (Fig. 2F). Furthermore, ASO group showed higher UCP1 mRNA and protein expression in the brown adipose tissue compared to Sense group (Fig. 2G). We next investigated whether ASO treatment may interfere with food ingestion of rats on HFD. ASO treatment reduced the percent of daily food intake compared to Sense treated rats (Fig. 2H). In accordance with this result, ASO treatment decreased NPY mRNA expression, which is an orexigenic neuropeptide and increased oxytocin mRNA expression, which is an anorexigenic neuropeptide in the CeA of rats on HFD (Fig. 2I). We also investigated whether the reduction of PTP1B expression with ASO treatment was able to improve the anorexigenic insulin effect. Insulin injection in the CeA of rats on HFD was able to decrease food intake after 4 and 8 h in rats treated with ASO. In contrast, in the Sense group the anorexigenic effect of insulin was blunted (Figure 2J).

### **3.4. Reduction of PTP1B expression in the CeA of DIO rats might interfere glucose homeostasis**

At the end of treatment, ASO group showed reduced fasting blood glucose and serum insulin levels (Fig. 3 A and B). Despite reduction of adiposity, there was only a tendency to decrease in serum leptin levels ( $p=0.1014$ ) after ASO treatment compared to Sense treatment (Fig. 3C). ASO treatment did not alter serum adiponectin, TNF- $\alpha$  and IL-10 levels compared to Sense treatment (Fig. 3 D-F). Because fasting blood glucose was lower after ASO treatment in comparison with Sense group, we performed a pyruvate test, which is an indirect measure of gluconeogenesis in vivo. We observed a decrease in blood glucose after intraperitoneal pyruvate injection in the group treated with ASO, suggesting lower gluconeogenesis compared to Sense group (Fig. 3G). This data was accompanied by decreased hepatic PEPCK protein levels (Fig. 3H).

### **3.5. Reduction of PTP1B expression in the CeA of rats on HFD may has a role inducing feeding anxiety behavior**

To get insight whether the reduction of PTP1B expression in the CeA may interfere in anxiety behavior, we performed elevated plus maze test in rats on HFD treated with ASO or Sense oligonucleotides. The results showed that the ASO group spent for more time in the open arms compared to the Sense group (Fig. 4A). There were no differences in the number of entries into the open arms between both groups (Fig. 4B). This result suggested that ASO treatment might promote an anxiolytic behavior. To gain further insight whether the lower anxiety behavior was associated with food intake in the ASO-treated rats, we employed a novelty suppressed feeding test on both groups. We observed that ASO group had enhanced latency to feed in the arena and in the home cage compared to the Sense group (Fig. 4C and D). That behavior reflected in a lower amount of food consumed by the ASO group in the home cage (Fig. 4E).

## **4. DISCUSSION**

This study was the pioneer in uncovering the involvement of the protein phosphatase PTP1B as a negative regulator of the insulin pathway in the CeA of obese rats. Some studies have shown that in obesity occurs inflammation and ER stress in this brain region, resulting in insulin resistance and impairing its anorexigenic action [1, 2]. In this study, we found that diet-induced obese rats show increased PTP1B expression in the CeA. To date, no study had evaluated the expression of PTP1B in this brain region, although recently it has been demonstrated that it is expressed in the BLA of animals subjected to chronic stress [11].

In hypothalamic neurons, PTP1B has been implicated in the regulation of body weight, adiposity, and peripheral sensitivity to insulin and leptin [12]. Furthermore, when inhibited in the hypothalamus, promotes browning in white adipose tissue, increases energy expenditure and prevents the development of diet-induced obesity, glucose intolerance and hepatic steatosis [13]. However, the role of PTP1B appears to change according to the cell type. PTP1B deletion in SF1 neurons, that express transcription factor stereoidogenic 1, in the VMH, improves insulin signaling, but decreases energy expenditure, leading to body weight gain in female mice [14].

Considering this important role of PTP1B in energy metabolism and glucose homeostasis in the hypothalamus, we evaluated whether increased expression of this

protein in the amygdala of obese animals would also have a negative regulatory role as well as insulin, and to understand the main consequent metabolic changes. We use a knockdown model for PTP1B with antisense oligonucleotide (ASO), which was injected directly into the CeA of obese rats fed with a high-fat diet.

Animals treated with ASO had reduced expression of PTP1B and increased phosphorylation in insulin receptor (IR) after insulin stimulation in the CeA. Picardi et al have observed a significant reduction in PTP1B expression in the hypothalamus of animals treated with the same oligonucleotide antisense via intracerebroventricular injection, regardless of the diet that the animal received, although PTP1B expression was higher in obese animals [3]. The authors also observed a higher IR phosphorylation in the hypothalamus in these treated animals, showing that PTP1B is not only increased in obesity but also downregulates the insulin pathway in this brain region.

Impaired of IR phosphorylation and insulin signaling in the CeA of animals fed with high-fat diet have been demonstrated [2], proving that insulin resistance, resulting from high consumption of saturated fat, is not restricted to the hypothalamus in the CNS. In animals treated with ASO, we also observed a reduction of food intake, independent of insulin stimulation and, consequently, weight loss.

Other studies using knockout or some knockdown animals for PTP1B in the hypothalamus [3, 12] also observed a reduction in body weight, food intake, and increased energy expenditure. Boghossian et al, studying the action of insulin in the amygdala on food intake, found that animals fed high-fat diet lose response to the anorexigenic action of insulin in this brain region, which is reversed when the high-fat diet is changed again for chow diet [1]. Thus, we hypothesized that increased expression of PTP1B in the CeA, resulting from high-fat diet intake, may be physiologically reversed when the diet of obese rat is exchanged for chow diet, similar to what happens in our study when PTP1B is reduced with ASO treatment, decreasing food intake in response to insulin.

There are no studies to date that have evaluated the energy expenditure or thermogenesis in brown adipose tissue (BAT) of animals with some kind of treatment or genetic manipulation in the CeA. It has been shown that mice lacking PTP1B exhibit increased energy expenditure without changes in UCP1 mRNA expression in the BAT [15]. PTP1B deletion specifically in SF-1 neurons, however, increases sensitivity to insulin and leptin, but also reduces energy expenditure and UCP1 mRNA expression in the BAT. The author's explanation for this paradox phenomenon is that the increased insulin sensitivity in this neurons decreases the activation of the sympathetic nervous system. Thus, it seems that PTP1B action is neuron-specific and depends on the signaling pathway that

predominates in the region studied. In our study, we observed that reduction of PTP1B expression in the CeA promotes increased energy expenditure and UCP1 mRNA and protein expression in the BAT.

This regulation of peripheral metabolism by CNS is not restricted to the changes observed in energy homeostasis. Our data indicate that PTP1B reduction in the CeA also modulates glucose homeostasis. Rats treated with ASO presents, at the end of treatment, reduction of glycemia and serum fasting insulin, and lower protein expression of PEPCK in the liver. Regulation of peripheral metabolism, including glucose homeostasis, as feedback to the insulin action in the CNS, has been well elucidated in the literature. In hypothalamus, insulin action and signaling are essential for modulating insulin concentration and hepatic glucose production [16]. We still can not be sure if the amygdala has direct effects on peripheral metabolism or so does through the hypothalamus and other brain regions. What is well described in the literature is the existence of direct projections from the amygdala and other regions of autonomic control of the CNS, such as the hypothalamus, parabrachial nucleus and dorsal motor nucleus of the vagus nerve [17, 18, 19].

Boghossian et al observed that the insulin in the CeA is able to activate populations of neurons in different regions of the CNS including VMH, ARC and PVN [1]. Once these regions are also known as affect the peripheral metabolism, the most reasonable hypothesis is that the CeA modulates peripheral glucose homeostasis through its effects on these hypothalamic nucleus. Recently it was demonstrated that the medial nucleus of amygdala (MAN) contains glucose sensors neurons innervating the VMH [20].

We also observed a reduction of blood glucose of animals with reduced PTP1B in the CeA. Park York et al [21] overexpressed PKC $\theta$  in the CeA of rats fed high-fat diet and observed increased hepatic PEPCK mRNA expression in the liver, associated with a reduction in AMPK levels, suggesting that amygdala have a regulatory input on the hepatic metabolism. In our study, we observed that obese mice has increased PTP1B expression, probably also upregulated by serine kinase PKC $\theta$  and, when treated with ASO, we found reduced PEPCK protein expression in the liver.

The reduction of PTP1B expression in the CeA did not have effects on the inflammatory response. Although ASO group have lost body weight and fat mass, there was no significant reduction of the serum cytokines levels produced by macrophages in the adipose tissue. No studies have evaluated the systemic inflammatory response in animals that received some treatment in the amygdala. Our hypothesis for this result is

that the saturated fatty acids of high-fat diet maintain this systemic inflammatory response, even with the improvement of insulin resistance in the amygdala.

In addition to changes in the peripheral metabolism, we also observed that PTP1B reduction in the CeA decreases food intake in response to insulin and modulates the expression of neuropeptides, reducing NPY mRNA expression and increasing oxytocin mRNA expression. Food intake regulation and energy homeostasis by NPY in the CNS, particularly in the hypothalamus, it is well established in the literature [22]. New studies have shown a positive relationship between NPY and stress and anxiety behaviors, which is due, in particular, to the presence of receptors Y1, especially in amygdala neurons [23]. Castro et al [2] also found NPY mRNA expression in the CeA, which was modulated by insulin and inhibition of ER stress in obese animals, concomitant with an improved insulin sensitivity in this region.

Oxytocin is a peptide synthesized in peripheral tissues and the CNS, primarily in neurons of PVN and supraoptic nucleus of hypothalamus [24, 25]. It has an important effect on the energy homeostasis, modulating body weight [26, 27] reducing food intake and increasing thermogenesis by mobilizing energy reserves [28]. Central or peripheral administration of exogenous oxytocin affects glucose metabolism, enhancing insulin sensitivity in DIO rats [24]. Therefore, increase in oxytocin levels in the amygdala of animals with reduced PTP1B can be an explanatory element for the reduced food intake and increased energy expenditure in these animals.

High availability of oxytocin in the CNS has an anxiolytic role, reducing not only anxiety behaviors, but also fear and social phobia [29]. Some studies have reported the influence of this change in feeding anxiety behavior and food preferences, which are mainly mediated by CeA, rich in oxytocin receptors [26, 30].

Castro et al [2] observed that insulin stimulation in the CeA increases oxytocin mRNA expression via PI3K in control rats. When ER stress was inhibited in the CeA of obese rats the authors observed similar results. In this way, we believe that increases in oxytocin mRNA expression in the CeA of obese animals after reduction of PTP1B is directly related to the improved insulin sensitivity in this brain region. Together, these results suggest that food intake reduction in insulin response in ASO rats was mediated, at least in part, by decreasing of NPY and increasing of oxytocin.

It has been shown that higher PTP1B expression in the BLA is directly related to induced anxiety behavior by stress, while PTP1B reduction in this region reflects anxiolytic behavior, which was evaluated by elevated plus maze (EPM) [11]. However, these authors evaluated the role of PTP1B in endocannabinoid signaling and not on insulin signaling

and/or energy metabolism. In according to the data published by them, PTP1B dephosphorylates the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5), impairing endocannabinoids production downstream. This signal, when impaired, produces a variety of effects on behavior that mirror those produced by exposure to stress, such as increased activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), anxiety and impaired extinction of fear. In our study, the experiment conducted in the EPM showed that animals with reduced expression of PTP1B in the CeA presented attenuation of anxiety behavior.

In contrast, in the NSF test, 16h fasted rats of ASO group presents longer latency to approach of the known food in the open field arena compared to Sense group in the same conditions. Longer latencies to approach and eat indicate higher levels of anxiety-like behavior [11]. However, we believe that this lower latency to eat observed in the Sense group was due to increase feeding-like anxiety in these obese rats, different from what happens with ASO group, that prioritized to analyze the unknown place instead of eating, even though several hours of fasting. In the home cage ASO group also presents longer latency to eat, and how already was expected, they ate less than Sense group. Thus, we concluded with these behavioral tests that PTP1B reduction in the CeA not only reduced hunger through improving the anorexigenic action of insulin, but also reduced feeding-like anxiety, even in prolonged fasting periods.

Altered emotional states such as anxiety and depression are commonly observed in obese individuals and are directly related to changes in feeding behavior, especially in food choices. These negative emotions increase preference for comfort foods, rich in sugar and fat [31]. Hence, unveil the molecular mechanisms that are behind the feeding behavior in CNS regions participating in the reward system, enables to develop new therapeutic approaches, not only effective in reducing hunger, but also in mitigating negative behavioral changes and metabolic complications characteristics of obesity.

## **5. CONCLUSION**

Together, our data indicate that, in obesity, PTP1B is increased in the CeA, interfering in the insulin action and signaling in this region. When PTP1B is reduced, we observe improved in the insulin sensitivity in the amygdala, resulting in reduced body weight and food intake, increased energy expenditure, improving peripheral glucose homeostasis and reduction of anxiety behavior. In addition, PTP1B reduction in the CeA modulates orexigenic and anorexigenic neuropeptide expression involved in food intake and changes

in feeding behavior and peripheral metabolic homeostasis. This study highlights the important role that this extra hypothalamic region has on the regulation of appetite and energy homeostasis, thereby contributing to the development of new therapies for the treatment of obesity and type 2 diabetes.

### **Author Contributions**

NFM contributed to conduct of experiments, data collection and analysis, data interpretation. GC contributed to conduct data collection. NT and NFM performed the evaluation of body composition using DEXA. DG performed ELISA analysis. NFM conducted behavioral tests. PAB helped design the behavioral tests. NFM and POP wrote the main manuscript text. POP designed and supervised the study.

### **Funding**

This work was supported by CNPq, CAPES and FAPESP, Brazil.

### **Conflict of Interests**

The authors have nothing to disclose.

### **REFERENCES**

- [1] Boghossian, S; Lemmon, K; Park, M; York, DA. High-fat diets induce a rapid loss of the insulin anorectic response in the amygdala. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 297(5):R1302-11. doi: 10.1152/ajpregu.00252.2009
- [2] Castro, G; Areias, MFC; Weissmann, L; Quaresma, PGF; Katashima, CK; Saad, MJA; Prada, PO. Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. *FEBS Open Bio* 2013; 11;3:443-9. doi: 10.1016/j.fob.2013.09.002.
- [3] Picardi, PK; Calegari, VC; Prada, PO; Moraes, JC; Araújo, E; Marcondes, MCGG; Ueno, M; Carvalheira, JBC; Velloso, LA; Saad, MJA. Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. *Endocrinology*. 2008; 149(8):3870-80. doi: 10.1210/en.2007-1506

- [4] Zabolotny, JM; Kim, Y; Welsh, LA; Kershaw, EE; Neel, BG; Kahn, BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem.* 2013; 283(21):14230-41. doi: 10.1074/jbc.M800061200
- [5] Picardi, PK; Caricilli, AM; de Abreu, LL; Carnevali, JB; Velloso, LA; Saad, MJA. Modulation of hypothalamic PTP1B in the TNF- $\alpha$ -induced insulin and leptin resistance. *FEBS Lett.* 2010; 584(14):3179-84. doi: 10.1016/j.febslet.2010.05.064
- [6] Ito, Y; Banno, R; Hagimoto, S; Ozawa, Y; Arima, H; Oiso, Y. TNF $\alpha$  increases hypothalamic PTP1B activity via the NF $\kappa$ B pathway in rat hypothalamic organotypic cultures. *Regulatory Peptides.* 2012; 174(1-3):58-64. doi: 10.1016/j.regpep.2011.11.010
- [7] Gouranton, E; Romier, B; Marcotorchino, J; Tourniaire, F; Astier, J; Peiretti, F; Landrier, J. Visfatin is involved in TNF $\alpha$ -mediated insulin resistance via an NAD<sup>+</sup>/Sirt1/PTP1B pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Adipocyte.* 2014; 1;3(3):180-9. doi: 10.4161/adip.28729
- [8] Gu, F; Nguyen, DT; Stuble, M; Dube, N; Tremblay, ML; Chevet, E. Protein-tyrosine phosphatase 1B potentiates IRE1 signaling during endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry.* 2004; 26;279(48):49689-93. doi: 10.1074/jbc.C400261200
- [9] Popov, D. Endoplasmic reticulum stress and the on site function of resident PTP1B. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 422(4):535-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.048
- [10] Panzhinskiy, E; Ren, J; Nair, S. Protein tyrosine phosphatase 1B and insulin resistance: role of endoplasmic reticulum stress/reactive oxygen species/nuclear factor kappa B axis. *PLoS One.* 2013; 18;8(10):e77228. doi: 10.1371/journal.pone.0077228
- [11] Qin, Z; Zhou, X; Pandey, NR; Vecchiarelli, HA; Stewart, CA; Zhang, X; Lagace, DC; Brunel, JM; Béïque, JC; Stewart, AF; Hill, MN; Chen, HH. Chronic stress induces anxiety via an amygdalar intracellular cascade that impairs endocannabinoid signaling. *Neuron.* 2015; 85(6):1319-31. doi: 10.1016/j.neuron.2015.02.015
- [12] Bence, KK; Delibegovic, M; Xue, B; Gorgun, CZ; Hotamisligil, GS; Neel, BG; Kahn, BB. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat. Med.* 2010; 12(8):917-24. doi: 10.1038/nm0210-237b
- [13] Zhang, ZY; Dodd, GT; Tiganis, T. Protein tyrosine phosphatases in hypothalamic insulin and leptin signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36(10):661-74. doi: 10.1016/j.tips.2015.07.003



- [14] Chiappini, F; Catalano, KJ; Lee, J; Peroni, OD; Lynch, J; Dhaneshwar, AS; Wellenstein, K; Sontheimer, A; Neel, BG; Kahn, BB. Ventromedial hypothalamus-specific Ptpn1 deletion exacerbates diet-induced obesity in female mice. *J Clin Invest.* 2014; 124(9): 3781–3792. doi: 10.1172/JCI68585
- [15] Klamann, LL; Boss, O; Peroni, OD et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology.* 2000; 20(15):5479-89. doi: 10.1128/MCB.20.15.5479-5489.2000
- [16] Obici, S; Zhang, BB; Karkanas, G; Rossetti, L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nature Medicine.* 2002; 8(12):1376-82. doi:10.1038/nm1202-798
- [17] LeDoux, JE. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 2000; 23:155-184. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.155
- [18] Petrovich, GD; Canteras, NS; Swanson, LW. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Rev.* 2001; 38(1-2):247-89. doi: 10.1016/S0165-0173(01)00080-7
- [19] Aizawa, H; Sato, Y; Maekawa, M; Fujisawa, H; Hirata, T; Yuasa, S. Development of the amygdalohypothalamic projection in the mouse embryonic forebrain. *Anat Embryol.* 2004; 208(4):249-64. doi: 10.1007/s00429-004-0399-9
- [20] Zhou, L; Podolsky, N; Sang, Z; Ding, Y; Fan, X; Tong, Q; Levin, BE; McCrimmon, RJ. The medial amygdalar nucleus: a novel glucose-sensing region that modulates the counterregulatory response to hypoglycemia. *Diabetes.* 2010; 59(10):2646-52. doi: 10.2337/db09-0995. 0995
- [21] Park-York, M; Boghossian, S; Oh, H; York, DA. PKC $\theta$  over expression in the central nucleus of the amygdala or hypothalamus has differential effects on energy balance and peripheral glucose homeostasis. *Brain Res.* 2013; 1498:85-94. doi: 10.1016/j.brainres.2012.12.042
- [22] Loh, K; Herzog, H; Shi, Y. Regulation of energy homeostasis by the NPY system. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2015; 26(3):125-35. doi: 10.1016/j.tem.2015.01.003

- [23] Reichmann, F; Holzer, P. Neuropeptide Y: A stressful review. *Neuropeptides*. 2015; 55:99-109. doi: 10.1016/j.npep.2015.09.008
- [24] Deblon, N; Veyrat-Durebex, C; Bourgoin, L; Caillon, A; Bussier, AL; Petrosino, S et al. Mechanisms of the anti-obesity effects of oxytocin in diet-induced obese rats. *PLoS ONE*. 2011; 6(9):e25565. doi: 10.1371/journal.pone.0025565
- [25] Acevedo-Rodriguez, A; Mani, SK; Handa, RJ. Oxytocin and estrogen receptor  $\beta$  in the brain: an overview. *Front. Endocrinol*. 2015; 6:160. doi: 10.3389/fendo.2015.00160
- [26] Olszewski, PK; Klockars, A; Schiöth, HB; Levine, AS. Oxytocin as feeding inhibitor: maintaining homeostasis in consummatory behavior. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010. 97(1): 47–54. doi: 10.1016/j.pbb.2010.05.026
- [27] Blevins, JE; Ho, JM. Role of oxytocin signaling in the regulation of body weight. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013. 14:311-329. doi: 10.1007/s11154-013-9260-x
- [28] Chaves, VE; Tilelli, CQ; Brito, NA; Brito, MN. Role of oxytocin in energy metabolism. *Peptides*. 2013; 45:9-14. doi: 10.1016/j.peptides.2013.04.010
- [29] Neumann, ID; Slattery, DA. Oxytocin in General Anxiety and Social Fear: A Translational Approach. *Biological Psychiatry*. 2016; 79(3):213-21. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.06.004
- [30] László, K; Kovács, A; Zagoracza, O; Ollmann, T; Péczely, L; Kertész, E; Lacyc, DG; Lénárda, L. Positive reinforcing effect of oxytocin microinjection in the rat central nucleus of amygdala. *Behavioural Brain Research*. 2016; 296:279-85. doi: 10.1016/j.bbr.2015.09.021
- [31] De Oliveira, C; De Oliveira, CM; Macedo, IC; Quevedo, AS; Filho, PRM; Da Silva, FR; Vercelino, R; De Souza, ICC; Caumo, W; Torres, ILS. Hypercaloric diet modulates effects of chronic stress: a behavioral and biometric study on rats. *Stress*. 2015; 18(5):514-23. doi: 10.3109/10253890.2015.1079616.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1 - PTP1B is increased in the CeA of rats on HFD and its reduction improves insulin signaling. (A)** Body weight gain during 8 weeks of diet; **(B)** Insulin tolerance test after of diet period; **(C)** Ptpn1 mRNA expression and protein expression of PTP1B in the CeA of Chow and HFD groups; **(D)** Ptpn1 mRNA expression and protein expression of PTP1B in the CeA of Sense and ASO groups; **(E)** PTP1B/IR association in the CeA of Sense and ASO groups; **(F)** IR phosphorylation in the CeA of Sense and ASO groups. **(G)** AKT phosphorylation in the CeA of Sense and ASO groups. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 20 rats/group. To perform immunoblotting (IB) of CeA we use a pool of 5 rats per sample and 4 samples per group. For RT-qPCR we use a pool of 10 rats per sample and three samples per group. To perform immunoprecipitation (IP) of CeA we use 5 samples, one sample per animal. One-tailed t-test and One-way ANOVA. \* $P < 0.05$  vs. other groups; \*\* $P < 0.01$  vs. Chow group.

**Figure 2 - Reduction of PTP1B expression in the CeA of rats on HFD reduces body weight and improves energy homeostasis and anorexigenc insulin action. (A)** Body weight evaluation during treatment with oligonucleotide; **(B)** fat mass and **(C)** lean mass after treatment with oligonucleotide by densitometric scanning; **(D)** O<sub>2</sub> consumption **(E)** CO<sub>2</sub> production; **(F)** Respiratory exchange ratio; **(G)** UCP1 mRNA expression and protein expression of UCP1 in the BAT; **(H)** 24h food intake during the treatment with oligonucleotide; **(I)** NPY and Oxytocin mRNA expression in the CeA of ASO and Sense rats; **(J)** Food intake in response to saline/insulin stimulation in Sense and DIO groups after 6h fasted. Data expressed as mean  $\pm$  SEM of 10 rats per group (n = 10). To perform indirect calorimetry we used 10 rats/group. For immunoblotting (IB) and RT-qPCR of BAT we used 10 samples (n = 10) per group. For evaluate food intake we used 10 rats/group. To perform RT- qPCR in the CeA we use a pool of 10 rats per sample and three samples (n = 2). One tailed t-test and One-way ANOVA. \* $P < 0.05$ .

**Figure 3 - Reduction of PTP1B expression in the CeA of rats on HFD might interfere on glucose homeostasis. (A)** Fasting glucose **(B)** Serum fasting insulin **(C)** Leptin **(D)** Adiponectin **(E)** TNF- $\alpha$  and **(F)** IL-10 levels of rats treated with ASO or Sense. **(G)** Blood glucose levels after injection of sodium pyruvate 1 g/kg i.p. **(H)** PEPCK protein expression

in the liver. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. We used 20 rats per group (n = 20). To perform immunoblotting (IB) of liver we used 10 rats/group. For pyruvate test we used 5 rats/group. One-tailed t-test. \*P<0,05.

**Figure 4 - Reduction of PTP1B expression in the CeA of rats on HFD decreased feeding anxiety behavior. (A)** Time and number of entries in open arms of EPM. **(B)** Latency to eat in open field arena and in home cage and food intake in home cage. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. We used 10 rat/group. One-tailed t-test. \*P<0,05.

Figure 1

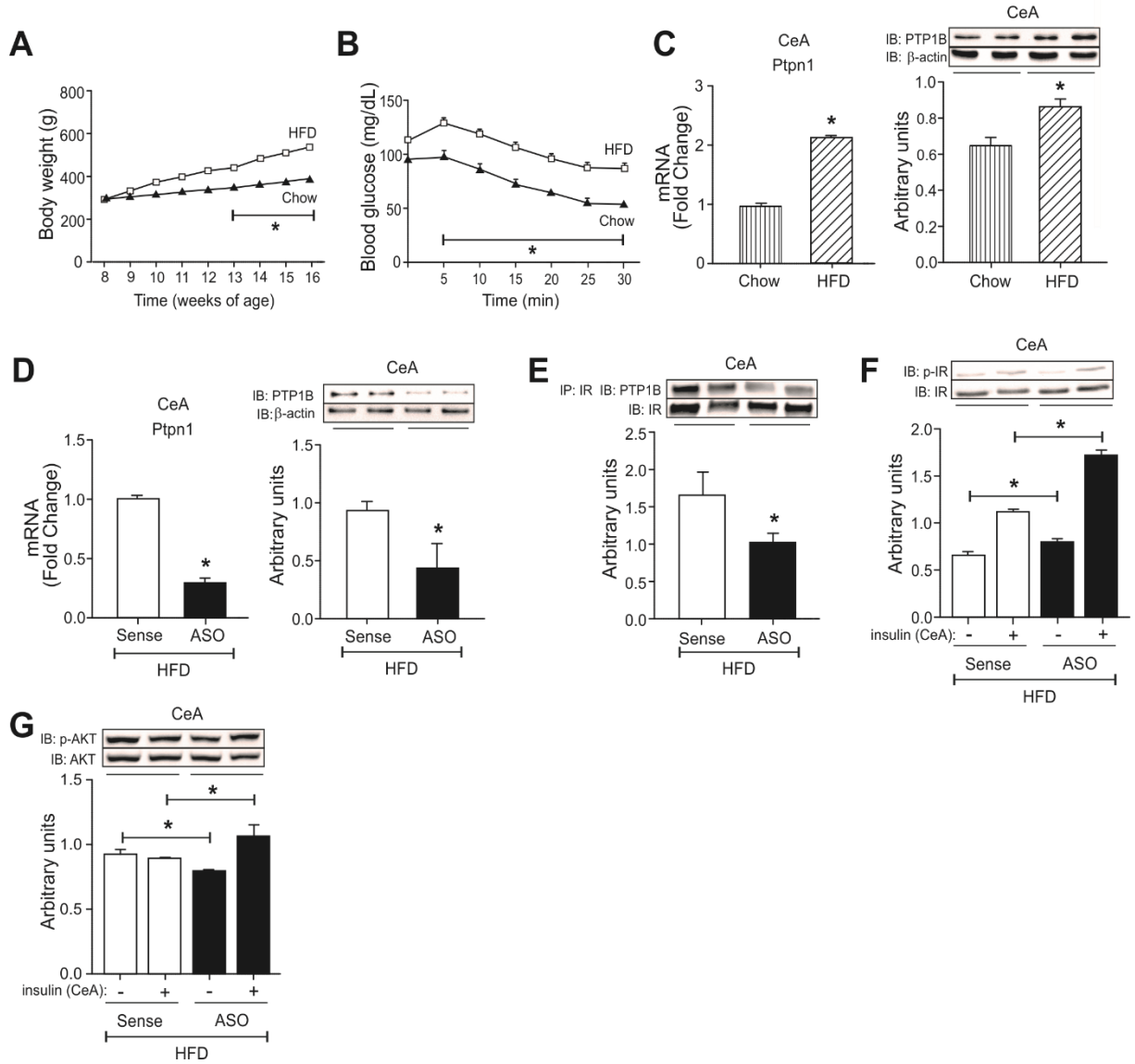


Figure 2

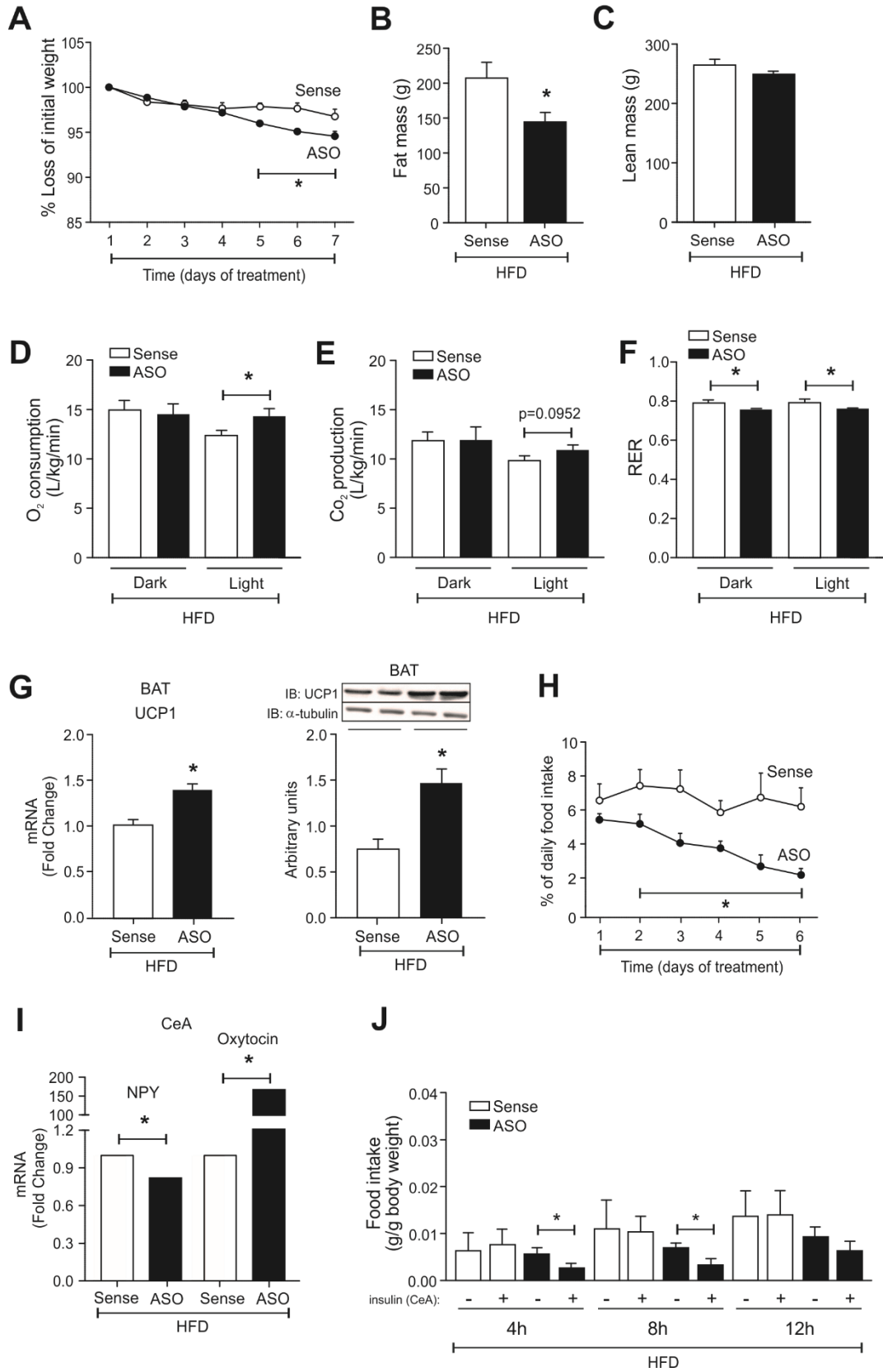


Figure 3

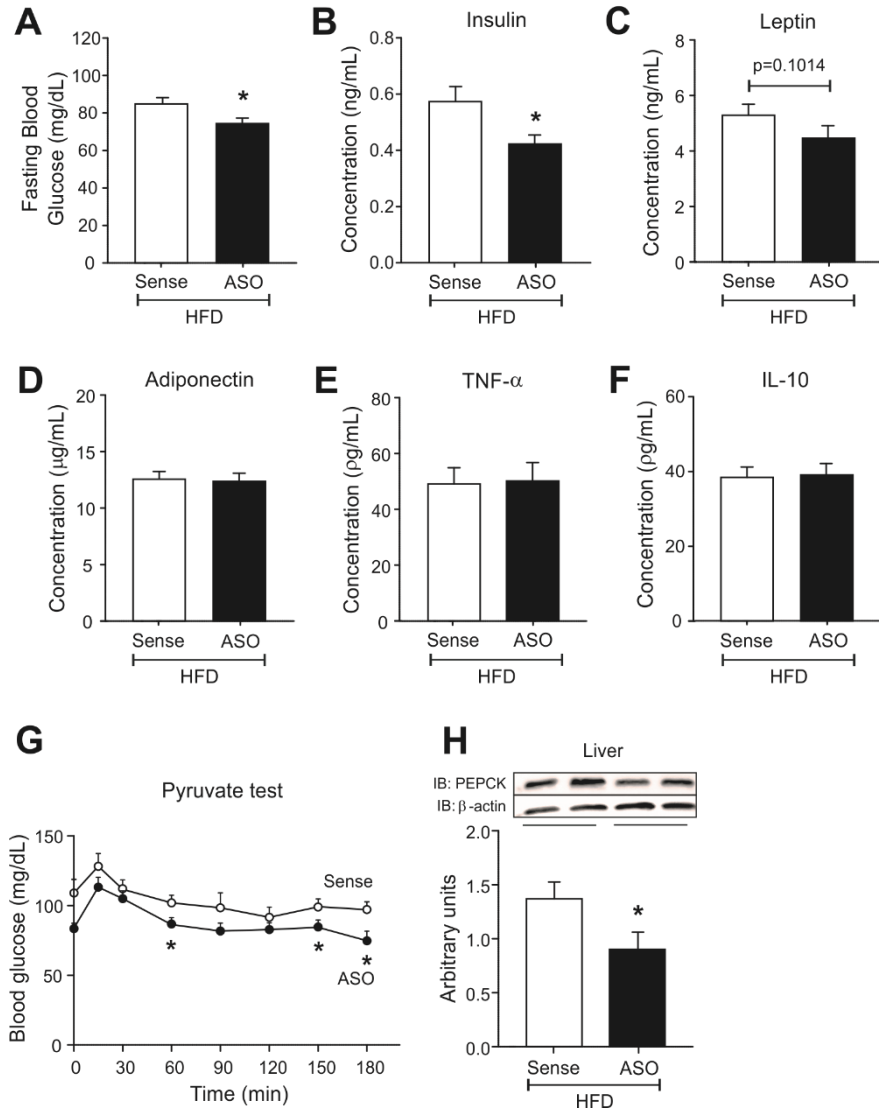
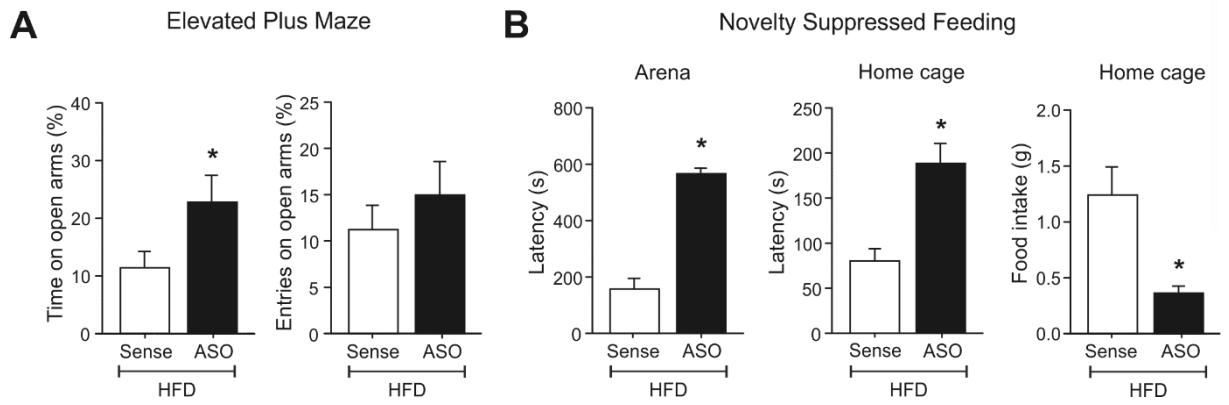


Figure 4





O aumento da obesidade e de suas comorbidades associadas em escala mundial vem exigindo da ciência cada vez mais estudos que visem encontrar terapêuticas eficazes para tratar, ou minimamente, prevenir essas doenças de grande impacto para a saúde pública.

O hipotálamo, que foi por muitos anos protagonista do controle da ingestão alimentar e da homeostase energética, possibilitou um melhor e mais detalhado entendimento dos mecanismos regulatórios do apetite e de suas principais alterações nas doenças, como na obesidade. Estudos mais recentes vêm buscando transpor esse conhecimento para outras áreas do SNC envolvidas com a regulação do apetite, e que apresentam conexões, não apenas com o hipotálamo, mas com todo o circuito cerebral envolvido no controle energético (Berthoud 2007; Cazes et al. 2011). Nesse sentido, o presente estudo foi pioneiro em desvendar o envolvimento da proteína fosfatase PTP1B como regulador negativo da via da insulina no núcleo central da amígdala (CeA) de ratos obesos.

Alguns estudos na literatura já demonstraram que na obesidade ocorre inflamação e estresse do retículo endoplasmático no CeA, culminando em resistência à insulina nessa região encefálica, com prejuízo da sua ação anorexigênica (Boghossian et al. 2009; Castro et al. 2013). Essa inflamação tem como uma de suas características o aumento de TNF- $\alpha$  e, conseqüentemente, a maior ativação de NF $\kappa$ B, que, por sua vez, estão diretamente relacionadas com uma maior expressão de PTP1B (Zabolotny et al. 2008; Picardi et al. 2010; Ito et al, 2012; Gouranton et al. 2014). O estresse do retículo endoplasmático também tem sido correlacionado positivamente com a expressão dessa proteína fosfatase (Gu et al. 2004; Popov, 2012; Panzhinskiy et al. 2013). Em nosso estudo, verificamos que animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica apresentam aumento da expressão de PTP1B no CeA. Até o momento, nenhum estudo tinha avaliado a expressão dessa fosfatase nessa região cerebral, embora, recentemente, já tenha sido demonstrado que ela está expressa no núcleo basolateral da amígdala (BLA) de animais submetidos a estresse crônico (Qin et al. 2015).

Em neurônios hipotalâmicos a expressão de PTP1B tem sido implicada na regulação do peso corporal, da adiposidade, e da sensibilidade periférica à insulina e leptina (Bence et al, 2006). Além disso, quando inibida no hipotálamo, promove *browning*

do tecido adiposo branco, aumenta o gasto energético e previne o desenvolvimento de obesidade induzida por dieta, de intolerância à glicose e de esteatose hepática (Zhang et al. 2015). No entanto, o papel da PTP1B parece variar de acordo com o tipo celular. A deleção de PTP1B em neurônios SF1, que expressam o fator de transcrição estereidogênico 1, no núcleo ventromedial do hipotálamo, melhora a sinalização da insulina, mas diminui o gasto energético, promovendo ganho de peso corporal em camundongos fêmeas (Chiappini et al. 2014).

Considerando esse importante papel da PTP1B no hipotálamo sobre o metabolismo energético e a homeostase glicêmica, avaliamos se a maior expressão dessa proteína no CeA de animais obesos também teria um papel de regulação negativa na via da insulina e quais seriam as principais alterações metabólicas consequentes. Para isso, utilizamos um modelo de *knockdown* para PTP1B com oligonucleotídeo antisense, que foi injetado diretamente no CeA de animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Os animais tratados com oligonucleotídeo antisense apresentaram redução da expressão da PTP1B e maior fosforilação do receptor de insulina (IR) após estímulo com insulina no CeA. Picardi et al (2008) já haviam observado redução significativa da expressão de PTP1B no hipotálamo de animais tratados com o mesmo oligonucleotídeo antisense via injeção intracerebroventricular, independente da dieta que o animal recebia (padrão ou hiperlipídica), muito embora a expressão de PTP1B estivesse elevada nos animais obesos. Os autores também observaram maior fosforilação do IR no hipotálamo desses animais tratados, mostrando que essa proteína fosfatase não só está aumentada na obesidade como também regula negativamente a via da insulina nessa região cerebral.

Castro et al (2013) ao avaliarem a sinalização de insulina no CeA de animais alimentados com dieta hiperlipídica, observaram menor fosforilação do IR, comprovando que a resistência à insulina, consequente do alto consumo de gordura saturada, não se restringe apenas ao hipotálamo no SNC. Nos animais tratados com oligonucleotídeo antisense também observamos redução da ingestão alimentar, independente de estímulo com insulina e, consequentemente, perda de peso corporal.

Outros estudos que utilizaram animais *knockout* ou algum *knockdown* para PTP1B no hipotálamo (Bence et al. 2006; Picardi et al. 2008) também observaram redução de peso corporal, da ingestão alimentar, além do aumento do gasto energético. Boghossian et al (2009), ao estudarem a ação da insulina na amígdala sobre a ingestão alimentar, verificaram que animais alimentados com dieta hiperlipídica perdem a resposta à ação

anorexigênica da insulina nessa região cerebral, o que é revertido quando a dieta hiperlipídica é trocada novamente por dieta padrão. Dessa forma, esse aumento da expressão da PTP1B, conseqüente da ingestão de dieta hiperlipídica no CeA, talvez seja fisiologicamente revertido quando a dieta do animal obeso é trocada por dieta padrão, semelhante ao que ocorre quando a PTP1B é inibida com oligonucleotídeo antisense, diminuindo a ingestão alimentar em resposta à ação endógena e ao estímulo exógeno com insulina.

Não há estudos na literatura, até o momento, que tenham avaliado o gasto energético ou o tecido adiposo marrom (TAM) de animais com algum tipo de tratamento ou manipulação genética no CeA. Já foi demonstrado que camundongos deficientes em PTP1B apresentam aumento do gasto energético sem alterações na expressão gênica de UCP1 no TAM (Klaman et al. 2000). A deleção de PTP1B especificamente nos neurônios SF-1, no entanto, aumenta a sensibilidade à leptina e insulina, mas reduz o gasto energético e a expressão de UCP1 no TAM. A explicação dos autores para esse fenômeno paradoxo é que a maior sensibilidade à insulina neste neurônio diminui a ativação do sistema nervoso simpático. Portanto, parece que a ação da PTP1B é neurônio-específica e depende da via de sinalização que predomina na região estudada. Em nosso estudo observamos que, no CeA, a redução da expressão de PTP1B promove o aumento do gasto energético e da expressão de UCP1 no TAM.

Essa regulação do metabolismo periférico pelo SNC não se restringe apenas às alterações observadas na homeostase energética; nossos dados apontam que a redução da PTP1B no CeA também modula a homeostase glicêmica. Os animais tratados com oligonucleotídeo antisense apresentam, ao final do tratamento, redução da glicemia e da insulina sérica de jejum, e menor expressão da enzima PEPCCK no fígado. A regulação do metabolismo periférico, incluindo a homeostase glicêmica, como *feedback* à ação da insulina no SNC, já é bem elucidada pela literatura. No hipotálamo, a ação e sinalização da insulina é essencial para modular a concentração de insulina circulante e a produção hepática de glicose (Obici et al. 2002). Ainda não se pode afirmar com certeza se a amígdala apresenta efeitos diretos no metabolismo periférico ou também o faz através do hipotálamo ou de outras regiões cerebrais. O que já está bem descrito na literatura é a existência de projeções diretas entre a amígdala e outras regiões de controle autonômico do SNC, como hipotálamo, núcleo parabraquial e núcleo motor dorsal do nervo vago (LeDoux, 2000; Petrovich et al. 2001; Aizawa et al. 2004;).

Boghossian et al (2009) observaram que a insulina no CeA é capaz de ativar populações de neurônios em diferentes regiões do SNC, incluindo os núcleos hipotalâmicos VMH, ARC e PVN. Uma vez que estas regiões também são conhecidas por afetar o metabolismo periférico, a hipótese mais sensata é de que o CeA module a homeostase glicêmica periférica através dos seus efeitos sobre estes núcleos hipotalâmicos. Recentemente foi demonstrado que o núcleo medial da amígdala (MAN) contém neurônios sensores de glicose que inervam o VMH (Zhou et al. 2010).

Não podemos descartar também o efeito da perda de peso sobre a redução da glicemia dos animais com redução da PTP1B no CeA. Park-York et al (2013) ao superexpressarem PKC $\theta$  no CeA de ratos alimentados com dieta hiperlipídica observaram aumento da expressão gênica de PEPCK hepática, associada a uma redução dos níveis de pAMPK, sugerindo que a amígdala tenha um *input* regulatório sobre o metabolismo hepático. Em nosso estudo, observamos que animais obesos apresentam aumento da expressão de PTP1B, provavelmente também regulada positivamente pela serina quinase PKC $\theta$  e, quando tratados com oligonucleotídeo antisense, verificamos redução da expressão de PEPCK no fígado.

Além das alterações no metabolismo periférico, também observamos que a redução da PTP1B no CeA diminui a ingestão alimentar em resposta à insulina e modula a expressão de neuropeptídeos, diminuindo a expressão gênica de NPY e aumentando a de oxitocina.

A regulação da ingestão alimentar e da homeostase energética pelo NPY no SNC, em especial no hipotálamo, já está bem estabelecida na literatura (Loh et al. 2015). No entanto, novos estudos vêm mostrando a relação positiva do NPY com comportamento de estresse e ansiedade, o que se deve, particularmente, à presença de receptores Y1, especialmente em neurônios da amígdala (Reichmann e Holzer, 2015). Castro et al. (2013) também verificaram expressão de NPY no CeA, que foi modulada pelo estímulo com insulina e pela inibição do estresse do retículo endoplasmático em animais obesos, concomitante a melhora da sensibilidade à insulina nessa região.

A oxitocina é um peptídeo sintetizado por tecidos periféricos e pelo SNC, principalmente em neurônios do núcleo PVN e supraóptico do hipotálamo (Deblon et al. 2011; Acevedo-Rodriguez et al. 2015). Apresenta importante efeito sobre a homeostase energética, modulando o peso corporal (Olszewski et al. 2010; Blevins e Ho, 2013), reduzindo a ingestão alimentar e aumentando a termogênese através da mobilização de reservas energéticas (Chaves et al. 2013). A administração central ou periférica de

oxitocina exógena afeta o metabolismo de glicose, melhorando a sensibilidade à insulina em ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Deblon et al. 2011). Portanto, o aumento dos níveis de oxitocina na amígdala dos animais com redução da PTP1B pode ser um elemento explicativo para a redução da ingestão e aumento do gasto energético desses animais.

Grande disponibilidade de oxitocina no SNC tem um papel ansiolítico, reduzindo não apenas comportamentos relacionados à ansiedade, mas também o medo e a fobia social (Neumann e Slattery, 2016). Alguns estudos vêm reportando a influência dessa alteração do comportamento de ansiedade sobre o comportamento alimentar e as preferências alimentares, que são mediados principalmente pelo CeA, muito rico em receptores de oxitocina (Olszewski et al. 2010; László et al. 2016).

Castro et al (2013) observaram que o estímulo com insulina no CeA aumenta a expressão gênica de oxitocina via PI3K em ratos controles. Ao inibir o estresse de retículo no CeA de ratos obesos os autores observaram resultado semelhante. Dessa forma, acreditamos que a maior expressão de oxitocina no CeA de animais obesos, após a redução da PTP1B, esteja diretamente relacionada com a melhora da sensibilidade à insulina nessa região cerebral. Juntos, estes resultados sugerem que a redução da ingestão alimentar em resposta à insulina nos animais tratados com oligonucleotídeo antisense foi mediada, pelo menos em parte, pela diminuição de NPY e aumento de oxitocina.

Já foi demonstrado que a maior expressão de PTP1B no núcleo basolateral da amígdala (BLA) está diretamente relacionada ao comportamento de ansiedade induzida por estresse, ao passo que a redução da PTP1B nessa região reflete em comportamento ansiolítico, o que foi avaliado por teste labirinto em cruz elevado (LCE) (Qin et al. 2015). Contudo, esses autores avaliaram o papel da PTP1B sobre a sinalização de endocanabinóides e não sobre a sinalização da insulina e/ou metabolismo energético. De acordo com os dados por eles apresentados, a PTP1B desfosforila o receptor de glutamato metabotrópico 5 (mGluR5), prejudicando a produção de endocanabinóides *downstream*. Essa sinalização, quando prejudicada, produz uma variedade de efeitos neurocomportamentais que espelham aqueles produzidos pela exposição ao estresse, tais como aumento da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), níveis elevados de ansiedade, alteração do comportamento de enfrentamento do estresse, e prejuízo na extinção do medo. Em nosso estudo, o experimento realizado no LCE mostrou que os animais com redução da expressão da PTP1B no CeA apresentaram atenuação

do comportamento de ansiedade. Esse resultado está condizente com a literatura, sugerindo que a PTP1B na amígdala tenha relação direta com o comportamento de ansiedade.

Estados emocionais alterados, como ansiedade e depressão, são comumente observados em indivíduos obesos e estão diretamente relacionadas com mudanças no comportamento alimentar, especialmente nas escolhas alimentares. Essas emoções negativas aumentam a preferência do indivíduo por *comfort foods*, ricos em açúcares e gorduras (de Oliveira et al. 2015). Por isso, desvendar os mecanismos moleculares que estão por trás do comportamento alimentar, em regiões do SNC que participam do sistema de recompensa, possibilita desenvolver novas abordagens terapêuticas que sejam eficazes não apenas em diminuir a fome, mas também em atenuar as alterações comportamentais negativas e complicações metabólicas características da obesidade.

## **CONCLUSÃO**

---

Em conjunto, nossos dados apontam que na obesidade a PTP1B está aumentada no CeA, interferindo na ação e sinalização da insulina nessa região. Quando a expressão dessa fosfatase foi reduzida observamos melhora da sensibilidade à insulina na amígdala, e melhora da sua ação e sinalização, resultando em redução do peso corporal e da ingestão alimentar, aumento do gasto energético, melhora da homeostase glicêmica periférica, bem como redução do comportamento de ansiedade. Além disso, a redução de PTP1B no CeA alterou a expressão de neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos envolvidos com a ingestão alimentar e com alterações metabólicas periféricas e comportamentais. Esse estudo reforça o importante papel que essas regiões extra-hipotalâmicas têm sobre a regulação da homeostase energética e do apetite, contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento de novas terapêuticas para o tratamento da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2.

**REFERÊNCIAS**

- 
- Acevedo-Rodriguez, A.; Mani, S.K.; Handa, R.J. Oxytocin and estrogen receptor  $\beta$  in the brain: an overview. **Front. Endocrinol.** v. 6, article 160, 2015.
- Ahima, R.S. Digging deeper into obesity. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2076-79, 2011.
- Ahmad, F. & Goldstein, B.J. Increased abundance of specific skeletal muscle protein tyrosine phosphatases in a genetic model of insulin-resistant obesity and diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 44, p. 1175-1184, 1995.
- Aizawa, H.; Sato, Y.; Maekawa, M.; Fujisawa, H.; Hirata, T.; Yuasa, S. Development of the amygdalohypothalamic projection in the mouse embryonic forebrain. **Anat Embryol.** v. 208, n. 4, p. 249-64, 2004.
- Areias, M.F.C.; Prada, P.O. Mechanisms of insulin resistance in the amygdala: Influences on food intake. **Behavioural Brain Research**, v. 282, p. 209-217, 2015.
- Asante-Appiah, E. & Kennedy, B.P. Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 284, p. 663-670, 2003.
- Bakke, J.; Haj, F.G. Protein tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, (2014) <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.09.020>.
- Barr, A.J. Protein tyrosine phosphatases as drug targets: strategies and challenges of inhibitor development. **Future Med. Chem.** v. 2, n. 10, p. 1563–1576, 2010.
- Batterham, R.L.; Cowley, M.A.; Small, C.J., Herzog, H.; Cohen, M.A.; Dakin, C.L.; Wren, A.M.; Brynes, A.E.; Low, M.J.; Ghatei, M.A.; Cone, R.D.; Bloom, S.R. Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake. **Nature** 418, 650-654, 2002.
- Bence, K.K.; Delibegovic, M.; Xue, B.; Gorgun, C.Z.; Hotamisligil, G.S.; Neel, B.G.; Kahn, B.B. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. **Nat. Med.** v.12, 917-924, 2006.
- Berthoud, H. Interactions between the “cognitive” and “metabolic” brain in the control of food intake. **Physiology & Behavior.** v. 91, p. 486-498, 2007.
- Blevins, J.E.; Ho, J.M. Role of oxytocin signaling in the regulation of body weight. **Rev Endocr Metab Disord.** v. 14, p. 311-329, 2013.



- Boghossian, S.; Lemmon, K.; Park, M.; York, D.A. High-fat diets induce a rapid loss of the insulin anorectic response in the amygdala. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 297, p.1302-1311, 2009.
- Carvalho, J.B.C.; Torsoni, M.A.; Ueno, M.; Amaral, M.E.; Araújo, E.P.; Velloso, L.A.; Gontijo, J.A.R.; Saad, M.J.A. Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. **Obes Res.** v.13, p. 48-57, 2005.
- Cani, P.D.; Amar, J.; Iglesias, M.A.; Poggi, M.; Knauf, C.; Bastelica, D.; Neyrinck, A.M.; Fava, F.; Tuohy, K.M.; Chabo, C.; Waget, A.; Delmée, E.; Cousin, B.; Sulpice, T.; Chamontin, B.; Ferrières, J.; Tanti, J.F.; Gibson, G.R.; Casteilla, L.; Delzenne, N.M.; Alessi, M.C.; Burcelin, R. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes.** v. 56, n. 7, p. 1761-72, 2007.
- Castro, G.; Areias, M.F.C.; Weissmann, L.; Quaresma, P.G.F.; Katashima, C.K.; Saad, M.J.A.; Prada, P.O. Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. **FEBS Open Bio** 3. p. 443-449, 2013.
- Cazettes, F.; Cohen, J.I.; Yau, P.L.; Talbot, H.; Convit, A. Obesity-mediated inflammation may damage the brain circuit that regulates food intake. **Brain Res.** v. 1373, p. 101-109, 2011.
- Chaves, V.E.; Tilelli, C.Q.; Brito, N.A.; Brito, M.N. Role of oxytocin in energy metabolism. **Peptides.** v. 45, p. 9-14, 2013.
- Cheatham, B. & Kahn, C.R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr Rev.** v. 16, p. 117-142, 1995.
- Chiappini, F.; Catalano, K.J.; Lee, J.; Peroni, O.D.; Lynch, J.; Dhaneshwar, A.S.; Wellenstein, K.; Sontheimer, A.; Neel, B.G.; Kahn, B.B. Ventromedial hypothalamus-specific Ptpn1 deletion exacerbates diet-induced obesity in female mice. **J Clin Invest.** v. 124, n. 9, p. 3781-3792, 2014.
- Cho, H. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and obesity. **Vitamins and Hormones.** v. 91, p. 405-424, 2013
- De Moura.; L.P.; Pauli, L.S.S.; Cintra, D.E.; De Souza, C.T.; Da Silva, A.S.R.; Marinho, R.; De Melo, M.A.R.; Ropelle, E.R.; Pauli, J.R. Acute exercise decreases PTP-1B protein level and improves insulin signaling in the liver of old rats. **Immunity and Ageing.** 10;8, 2013.

- De Oliveira, C.; De Oliveira, C.M.; Macedo, I.C.; Quevedo, A.S.; Filho, P.R.M.; Da Silva, F.R.; Vercelino, R.; De Souza, I.C.C.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. Hypercaloric diet modulates effects of chronic stress: a behavioral and biometric study on rats. **Stress**, v. 18, n. 5, p. 514-523, 2015.
- De Souza, C.T.; Araujo, E.P.; Bordin, S.; Ashimine, R.; Zollner, R.L.; et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**. v. 146, p. 4192-4199, 2005.
- Deblon, N.; Veyrat-Durebex, C.; Bourgoin, L.; Caillon, A.; Bussier, A.L.; Petrosino, S. et al. Mechanisms of the anti-obesity effects of oxytocin in diet-induced obese rats. **PLoS ONE**. v. 6, n. 9, e25565, 2011.
- Ding, H.; Zhang, Y.; Xu, C.; Hou, D.; Li, J.; Zhang, Y.; Peng, W.; Zen, Ke.; Zhang, C.; Jiang, X. Norathyriol reverses obesity- and high-fat-diet-induced insulin resistance in mice through inhibition of PTP1B. **Diabetologia**. v. 57, p. 2145-2154, 2014.
- Elchebly, M.; Payette, P.; Michaliszyn, E.; Cromlish, W.; Collins, S.; Loy, A.L. et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. **Science**. v. 283, p. 1544-1548, 1999.
- Farooqi, I.S.; Bullmore, E.; Keogh, J.; Gillard, J.; O'Rahilly, S.; Fletcher, P.C. Leptin regulates striatal regions and human eating behavior. **Science**. v. 317, n. 5843, p. 1355, 2007.
- Fletcher, P.C.; Napolitano, A.; Skeggs, A.; Miller, S.R.; Delafont, B.; Cambridge, V.C.; Nathan, P.J.; Brooke, A.; et al. Distinct modulatory effects of satiety and sibutramine on brain responses to food images in humans: a double dissociation across hypothalamus, amygdala, and ventral striatum. **J Neurosci**. v. 30, n. 43, p. 14346-55, 2010.
- Flier, J.S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**. n. 116, p. 337-350, 2004.
- Goldstein, B.J. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): a novel therapeutic target for type 2 diabetes mellitus, obesity and related states of insulin resistance. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord**. v. 1, n. 3, p.265-75, 2001.
- Goldstein, B.J. Protein-tyrosine phosphatases: emerging targets for therapeutic intervention in type 2 diabetes and related states of insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 87, p. 2474-2480, 2002.

- Gouranton, E.; Romier, B.; Marcotorchino, J.; Tourniaire, F.; Astier, J.; Peiretti, F.; Landrier, J. Visfatin is involved in TNF $\alpha$ -mediated insulin resistance via an NAD<sup>+</sup>/Sirt1/PTP1B pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Adipocyte**. v. 3, n. 3, p.180-189, 2014.
- Gu, F.; Nguyen, D.T.; Stuible, M.; Dube, N.; Tremblay, M.L.; Chevet, E. Protein-tyrosine phosphatase 1B potentiates IRE1 signaling during endoplasmic reticulum stress. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 48, p. 49689-93, 2004.
- Holsen, L.M.; Zarcone, J.R.; Brooks, W.M.; Butler, M.G.; Thompson, T.I.; Ahluwalia, J.S.; Nollen, N.L.; Savage, C.R. Neural mechanisms underlying hyperphagia in Prader-Willi syndrome. **Obesity (Silver Spring)**. v. 14, n. 6, p. 1028-37, 2006.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde 2013. [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2013. [citado 2016 jan 15]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pns/2013/>
- Ito, Y.; Banno, R.; Hagimoto, S.; Ozawa, Y.; Arima, H.; Oiso, Y. TNF $\alpha$  increases hypothalamic PTP1B activity via the NF $\kappa$ B pathway in rat hypothalamic organotypic cultures. **Regulatory Peptides**. v. 174, p. 58-64, 2012.
- Kakkar, A.K.; Dahiya, N. Drug treatment of obesity: Current status and future prospects. **Eur J Intern Med** (2015).
- King, B.M.; Cook, J.T.; Rossiter, K.N.; Theobald, L.M.; Sam, H. Posterodorsal amygdaloid lesions in rats: long-term effects on body weight. **Physiol. Behav.** v. 60, p. 1569–1571, 1996.
- King, B.M.; Rossiter, K.N.; Stines, S.G.; Zaharan, G.M.; Cook, J.T.; Humphries, M.D.; York, D.A. Amygdaloid-lesion hyperphagia: impaired response to caloric challenges and altered macronutrient selection. **Am J Physiol.** v. 275, p.485-493, 1998.
- King, B.M.; Sam, H.; Arceneaux, E.R.; Kass, J.M. Effect on food intake and body weight of lesions in and adjacent to the posterodorsal amygdala in rats. **Physiol. Behav.** v. 55 p. 963-966, 1994.
- Kitazawa, T.; Yoshino, Y.; Suzuki, S.; Koga, I.; Ota, Y. Lopinavir inhibits insulin signaling by promoting protein tyrosine phosphatase 1B expression. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 8, p. 851-855, 2014.

- Klaman, L.L.; Boss, O.; Peroni, O.D. et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. **Molecular and Cellular Biology**. v. 20, n. 15, p. 5479-5489, 2000.
- Koren, S. & Fantus, I.G. Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* v. 21, n. 4. p. 621-640, 2007.
- László, K.; Kovács, A.; Zagoracza, O.; Ollmann, T.; Péczely, L.; Kertész, E.; Lacyc, D.G.; Lénárda, L. Positive reinforcing effect of oxytocin microinjection in the rat central nucleus of amygdala. **Behavioural Brain Research**. v. 296, p. 279–285, 2016.
- LeDoux, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 23, p. 155–184, 2000.
- Loh, K.; Herzog, H.; Shi, Y. Regulation of energy homeostasis by the NPY system. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 26, n. 3, p. 125-135, 2015.
- Malik, S.; McGlone, F.; Bedrossian, D.; Dagher, A. Ghrelin modulates brain activity in areas that control appetitive behavior. **Cell Metab.** v. 7, n. 5, p. 400-9, 2008.
- Malik, V.S.; Willett, W.C.; Hu, F.B. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. **Nat. Rev. Endocrinol.** v. 9, p. 13-27, 2013.
- Mobasher, M.A.; de Toro-Martín, J.; González-Rodríguez, Á.; Ramos, S.; Letzig, L.G.; James, L.P.; Muntané, J.; Álvarez, C.; Valverde, Á.M. Essential role of protein-tyrosine phosphatase 1B in the modulation of insulin signaling by acetaminophen in hepatocytes. **J Biol Chem**. v. 289, n. 42, p. 29406-19, 2014.
- Montgomery, R.B.; Singer, G. Functional relationship of lateral hypothalamus and amygdala in control of eating. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 3, n. 5, p. 905-7, 1975.
- Myers, M.P.; Andersen, J.N.; Cheng, A.; Tremblay, M.L.; Horvath, C.M.; Parisien, J.P.; Salmeen, A.; Barford, D.; Tonks, N.K. TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem.* v. 276, n. 51, p. 47771-4, 2001.
- Nakazato, M. et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**. v. 409, p. 194 -198, 2001.
- Neumann, I.D.; Slattery, D.A. Oxytocin in General Anxiety and Social Fear: A Translational Approach. **Biological Psychiatry**. v. 79, p. 213-21, 2016.

- Obici, S.; Zhang, B.B.; Karkanas, G.; Rossetti, L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. **Nature Medicine**. v. 8, n. 12, p. 1376-1382, 2002.
- Oh, H.; Boghossian, S.; York, D.A.; Park-York, M.J. The effect of high fat diet and saturated fatty acids on insulin signaling in the amygdala and hypothalamus of rats. **Brain Res**. v. 1537, p. 191-200, 2013.
- Olszewski, P.K.; Klockars, A.; Schiöth, H.B.; Levine, A.S. Oxytocin as feeding inhibitor: maintaining homeostasis in consummatory behavior. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 97, n. 1, p. 47-54, 2010.
- Panzhinskiy, E.; Ren, J.; Nair, S. Protein tyrosine phosphatase 1B and insulin resistance: role of endoplasmic reticulum stress/reactive oxygen species/nuclear factor kappa B axis. **PLoS One**. v. 8, n. 10, e77228, 2013.
- Park-York, M.; Boghossian, S.; Oh, H.; York, D.A. PKC $\theta$  over expression in the central nucleus of the amygdala or hypothalamus has differential effects on energy balance and peripheral glucose homeostasis. **Brain Res**. v. 1498, p. 85-94, 2013.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 14, p. 149-167, 1985.
- Petrovich, G.D.; Canteras, N.S.; Swanson, L.W. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. **Brain Res Rev**. v. 38, p. 247-289, 2001.
- Petrovich, G.D.; Holland, P.C.; Gallagher, M. Amygdalar and prefrontal pathways to the lateral hypothalamus are activated by a learned cue that stimulates eating. **The Journal of Neuroscience**. v. 25, n. 36. p. 8295-8302, 2005.
- Picardi, P.K.; Calegari, V.C.; Prada, P.O.; Moraes, J.C.; Araújo, E.; Marcondes, M.C.C.G.; Ueno, M.; Carvalheira, J.B.C.; Velloso, L.A.; Saad, M.J.A. Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. **Endocrinology**. v. 149, n. 8, p. 3870-3880, 2008.
- Picardi, P.K.; Caricilli, A.M.; de Abreu, L.L.; Carvalheira, J.B.; Velloso, L.A.; Saad, M.J. Modulation of hypothalamic PTP1B in the TNF-alpha-induced insulin and leptin resistance. **FEBS Lett**. v. 584, n. 14, p. 3179-84, 2010.

- Plum, L.; Schubert, M.; Bruning, J.C. The role of insulin receptor signaling in the brain. **Trends Endocrinol Metab.** v. 16, p.59-65, 2005.
- Popov, D. Endoplasmic reticulum stress and the on site function of resident PTP1B. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 422, n. 4, p. 535-8, 2012.
- Popov, D. Novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: interaction requirements for improved intracellular efficacy in type 2 diabetes mellitus and obesity control. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 410, n. 3, p.377-81, 2011.
- Prada, P.O.; Zecchin, H.G.; Gasparetti, A.L.; Torsoni, M.A.; Ueno, M.; Hirata, A.E.; Amaral, M.E.C.; Hoer, N.F.; Boschero, A.C.; Saad, M.J.A. Western diet modulates insulin signaling c-Jun n-terminal kinase activity and insulin receptor substrate-1 phosphorylation in tissue specific fashion. **Endocrinology.** v. 146, n. 3, p. 1576-1587, 2005.
- Prada PO, Hirabara SM, de Souza CT, Schenka AA, Zecchin HG, Vassallo J, Velloso LA, Carneiro E, Carvalheira JB, Curi R, Saad MJ. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. **Diabetologia.** v. 50, n. 9. p. 1949-59, 2007.
- Purves, D.; Augustine, G.J.; Fitzpatrick, D.; Hall, W.C.; Lamantia, A.; Mcnamara, J.O.; Williams, S.M. The anatomy of amygdala. **Neuroscience.** 3rd edition. Chapter 28, Box B, page 696. Sunderland, Massachusetts U.S.A: Sinauer Associates. 2004.
- Qin, Z.; Zhou, X.; Pandey, N.R.; Vecchiarelli, H.A.; Stewart, C.A.; Zhang, X.; Lagace, D.C.; Brunel, J.M.; Béïque, J.C.; Stewart, A.F.; Hill, M.N.; Chen, H.H. Chronic stress induces anxiety via an amygdalar intracellular cascade that impairs endocannabinoid signaling. **Neuron.** v. 85, n. 6, p. 1319-31, 2015.
- Reichmann, F.; Holzer, P. Neuropeptide Y: A stressful review. **Neuropeptides.** pii: S0143-4179(15)00097-9, 2015.
- Ropelle, E.R.; Pauli, J.R.; Prada, P.O.; de Souza, C.T.; Faria, M.C.; Picardi, P.K.; Cintra, D.E.; et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **J Physiol.** v. 577, p. 997–1007, 2006.
- Schinner, S., Scherbaum, W.A., Bornstein, S.R., Barthel, A. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Diabet Med.** v. 22, n. 6, p.674-82, 2005.

- Schwartz, M.W.; Woods, S.C.; Porte Jr, D.; Seeley, R.J.; Baskin, D.G. Central nervous system control of food intake. **Nature**. v. 404, n. 6, p.661-671, 2000.
- Thaler, J.P. & Schwartz, M.W. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. **Endocrinology**. v.151, n. 9, p.4109-15, 2010.
- Tilg, H.; Moschen, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**. v. 6, n. 10, p.772-83, 2006.
- Tsukumo, D.M.L.; Carvalho-Filho, M.A.; Carvalheira, J.B.C.; Prada, P.O.; Hirabara, S.M.; Schenka, A.A.; Araújo, E.P.; Vassallo, J.; Curi, R.; Velloso, L.A. Saad, M.J.A. Loss-of-Function Mutation in Toll-Like Receptor 4 Prevents Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**. v. 56, p. 1986–1998, 2007.
- Tye, K.M.; Prakash, R.; Kim, S.; Fenno, L.E.; Grosenick, L.; Zarabi, H.; Thompson, K.; Grandinaru, V.; Ramakrishnan, C.; Deisseroth, K. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. **Nature**. v. 471, p. 358-362, 2011.
- Ukkola, O. & Santaniemi, M. Protein tyrosine phosphatase 1B: a new target for the treatment of obesity and associated co-morbidities. **Journal of Internal Medicine**. v. 251, p. 467-475, 2002.
- Venable, C.L.; Frevert, E.U.; Kim, Y.B.; Fischer, B.M.; Kamatkar, S.; Neel, B.G.; Kahn, B.B. Overexpression of protein-tyrosine phosphatase-1B in adipocytes inhibits insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity without altering glucose transport or Akt/protein kinase B activation. **J Biol Chem**. v. 275, p. 18318-26, 2000.
- Virkamäki, A.; Ueki, K.; Kahn, C.R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest**. v. 103, n. 7, p.931-43, 1999.
- Waki, H.; Tontonoz, P. Endocrine Functions of Adipose Tissue. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis**. v. 2, p. 31-56, 2007.
- White, N. M., & Fisher, A. E. Relationship between amygdala and hypothalamus in the control of eating behavior. **Physiology & Behavior**. v. 4, n. 2, p. 199-205, 1969.
- World Health Organization. Obesity and over-weight. WHO Web site. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> Acessado em 18 de janeiro de 2016.

- Zabolotny, J.M., Kim, Y., Welsh, L.A., Kershaw, E.E., Neel, B.G., Kahn, B.B. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. **J Biol Chem.** v. 283, n. 21, p. 14230-41, 2008.
- Zhang, Z.Y.; Dodd, G.T.; Tiganis, T. Protein tyrosine phosphatases in hypothalamic insulin and leptin signaling. **Trends Pharmacol Sci.** v. 36. n. 10, p. 661-74, 2015.
- Zhou, L.; Podolsky, N.; Sang, Z.; Ding, Y.; Fan, X.; Tong, Q.; Levin, B.E.; McCrimmon, R.J. The medial amygdalar nucleus: a novel glucose-sensing region that modulates the counterregulatory response to hypoglycemia. **Diabetes.** v. 59, n. 10, p. 2646-52, 2010.



**ANEXO 1 – Parecer do comitê de ética**

CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto "**EFEITOS DA INIBIÇÃO DE PTP1B SOBRE A SINALIZAÇÃO DE INSULINA EM AMÍGDALA DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA**" (protocolo nº **3354-1**), sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Prada / Natália Ferreira Mendes**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **03 de julho de 2014**.

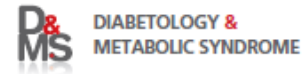
Campinas, 03 de julho de 2014.

  
 Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
 Presidente

  
 Fátima Alonso  
 Secretária Executiva

## ANEXO 2 – Publicação do resumo do trabalho em revista internacional

Mendes et al. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2015, **7**(Suppl 1):A143  
<http://www.dmsjournal.com/content/7/S1/A143>



### MEETING ABSTRACT

### Open Access

# Inhibition of PTP1b in the amygdala reduces food intake, body weight and modulates glycemic homeostasis in obese rats

Natália Ferreira Mendes\*, Gisele de Castro, Mário José Abdalla Saad, Patrícia de Oliveira Prada

From 20th Brazilian Diabetes Society Congress  
 Porto Alegre, Brazil. 11-18 November 2015

#### Background

The control of food intake depends, in part, of the action and signaling of hormones, such as insulin in hypothalamic neurons. In obesity, inflammatory cytokines activate protein phosphatases, such as protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B). PTP1B interacts with the insulin receptor (IR) and the insulin receptor substrate (IRS1), inhibiting them in hypothalamus. Other brain regions, that are part of the dopaminergic reward system, such as the amygdala, participate of the control of energy balance in parallel to the hypothalamus. Insulin exerts its anorexigenic effect also through the amygdala and, in obesity, this effect is abolished. However, it is not known whether PTP1B is expressed and participates of the regulation of insulin signaling in amygdala.

#### Aim

To investigate whether PTP1B expression is increased in the amygdala of diet induced obese (DIO) rats and whether the inhibition of PTP1B has any effect on energy metabolism or on insulin signaling, or action in the central nucleus of the amygdala (CeA) in DIO rats.

#### Materials and methods

Male Wistar rats with 8 weeks old were divided into two groups: Chow (n=25) fed with standard rodent chow, and DIO (n=25), that received high fat diet, both for more 8 weeks. To assess PTP1B protein expression, 5 animals from each group were anaesthetized and, then, performed the dissection of the CeA. The other 20 animals were underwent to stereotactic surgery for implantation of the cannula in CeA. After recovery, the animals were

treated with sense and antisense oligonucleotide (ASO) for 7 days, to inhibit the expression of PTP1B in CeA, giving rise to the subgroups: Chow+Sense, Chow+ASO, DIO+Sense e DIO+ASO. During treatment, the parameters evaluated were blood glucose and body weight. At the end of treatment was conducted the euthanasia of animals for extraction of CeA.

#### Results

Animals fed high fat diet had greater body weight gain, insulin resistance and increased PTP1B expression and activation in CeA compared to Chow group. When treated with ASO, DIO animals showed reduced expression of PTP1B in CeA, loss of body weight and food intake, and decrease in blood glucose levels, reaching values similar to those presented by the animals of the Chow group.

#### Conclusion

These data suggest that the inhibition of PTP1B in the amygdala improved glucose homeostasis and reduced food intake and body weight in obese rats.

Published: 11 November 2015

doi:10.1186/1758-5996-7-S1-A143

**Cite this article as:** Mendes et al.: Inhibition of PTP1b in the amygdala reduces food intake, body weight and modulates glycemic homeostasis in obese rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2015 **7**(Suppl 1):A143.

\* Correspondence: [nataliamendes@gmail.com](mailto:nataliamendes@gmail.com)  
 Universidade Estadual de Campinas, Sorocaba, Brazil



© 2015 Mendes et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.