

**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO - UNAERP
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA**

**PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS POMC DO ARC NAS ALTERAÇÕES DO
METABOLISMO ENERGÉTICO E DA GLICOSE EM ANIMAIS
SUBMETIDOS AO ESTRESSE METABÓLICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LUANE DA GUIA VIEIRA

RIBEIRÃO PRETO – SP

2020

LUANE DA GUIA VIEIRA

**PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS POMC DO ARC NAS ALTERAÇÕES DO
METABOLISMO ENERGÉTICO E DA GLICOSE EM ANIMAIS
SUBMETIDOS AO ESTRESSE METABÓLICO**

Dissertação apresentada à Universidade de
Ribeirão Preto, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia,
para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo C. Rorato

RIBEIRÃO PRETO – SP

2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico da Biblioteca Central da
UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto –

V658p Vieira, Luane da Guia, 1994
Participação dos Neurônios POMC do ARC nas
alterações do metabolismo energético e da glicose em animais
submetidos ao estresse metabólico / Luane da Guia Vieira. - -
Ribeirão Preto, 2020.
46 f.: il color.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rodrigo C. Rorato.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2020.

1. Metabolismo antioxidante. 2. Tolerância. 3. ERO.
3. RT-qPCR. I. Título.

CDD 660

LUANE DA GUIA VIEIRA

**PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS POMC DO ARC NAS ALTERAÇÕES DO
METABOLISMO ENERGÉTICO E DA GLICOSE EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE METABÓLICO**

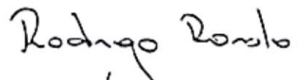
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 21 de dezembro de 2020

Resultado: Aprovada

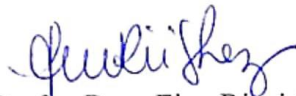
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rodrigo César Rorato
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Dr. Rafael Appel Flores
Universidade de São Paulo - USP



Profa. Dra. Elen Rizzi Sanchez
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO
2020**

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua infinita graça e amor incondicional, por me conceder a vida com seus obstáculos e ensejos. Por me dar força para continuar, e recursos internos para a conclusão dos meus sonhos, apesar das dificuldades.

Aos meus pais (Ademir e Rosane), minha irmã (Laísa) e meu esposo (Miquéias) pelo amor, incentivo e encorajamento em todas as horas, me acompanhando também em cada detalhe do meu percurso acadêmico.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo C. Rorato agradeço por todo carinho, compreensão, disposição de tempo e paciência em acolher minhas dúvidas e ensinar. Pela sua capacidade empática de abraçar os alunos, principalmente nos momentos de grande dificuldade.

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues e Profa Dra. Lucila Elias, por abrirem as portas de seu laboratório (laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP) contribuindo de maneira enriquecedora com parcerias em nosso projeto de pesquisa, e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP, pela oportunidade.

Agradeço á Taís do Nascimento e Alan Carlos por toda ajuda sem os quais não seria possível ter concluído este trabalho.

À todos os alunos que passaram algum momento pelo laboratório, contribuindo com as pesquisas em nosso projeto, agradeço pela ajuda e dedicação.

Aos professores que fizeram parte da banca examinadora (Profa. Dra. Elen Rizzi Sanchez e Dr. Rafael Appel Flores), agradeço pela atenção e disposição em aceitar nosso convite e por toda a contribuição na avaliação deste trabalho .

À Coordenadora do programa de pós-graduação em Biotecnologia (Profa Dra. Suzelei C. França) pelo apoio, imensa solicitude e compreensão, com que me ouviu e ajudou sempre demonstrando compaixão e empatia nos momentos de maior necessidade.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/18359-9, pela oportunidade, apoio financeiro, todo auxílio prestado.

Agradeço também à Universidade de Ribeirão Preto pela oportunidade de realização do mestrado e concretização de um grande sonho.

Á todos os professores e docentes que passaram pela minha vida, por contribuírem para o meu desenvolvimento pessoal, acadêmico e profissional.

À todos que de forma direta ou não, fizeram parte de minha formação, eu agradeço com todo o meu coração.

RESUMO

A elucidação da participação de diferentes grupamentos neurais no controle da homeostase energética e da glicose é essencial para o desenvolvimento de novas terapias no combate de distúrbios metabólicos. Nesse sentido, estudos tem indicado que o aumento da atividade de neurônios POMC do ARC induz redução do consumo de alimento e hipoglicemia. Ainda, tais ações atribuídas a estes neurônios foram observadas, ao menos em parte, em estudos utilizando modelos experimentais de deleção gênica durante o desenvolvimento embrionário. Contudo, é conhecido que a metodologia de deleção gênica embrionária desencadeia o recrutamento de mecanismos compensatórios, que por sua vez poderiam ocultar a real contribuição dos neurônios POMC do ARC para o controle do homeostase energética e da glicose. Para evitar o desenvolvimento de tais efeitos, no presente estudo foi utilizada a tecnologia DREADD para ativar especificamente os neurônios POMC do ARC durante o jejum, situação em que se observa queda da atividade dos mesmos, e observar as alterações no metabolismo energético e da glicose. Observamos que a ativação específica dos neurônios POMC do ARC durante o jejum promoveu redução na perda de peso corporal. Ainda, a ativação dos neurônios POMC do ARC reduziu a sensibilidade a glicose, como evidenciado pelo aumento do GTT, sem alterar a sensibilidade a insulina em animais jejuados. Estas respostas não estiveram associadas a alteração nas concentrações plasmáticas de leptina, insulina e corticosterona. O aumento na concentração plasmática de glicose durante o GTT parece estar associado a um aumento na expressão do RNAm do *G6pc* no fígado que pode converter glicose-6-fosfato em glicose livre. Adicionalmente, observamos queda na expressão do RNAm da *Lpl* e da *Cpt1a* no fígado após a ativação dos neurônios POMC do ARC durante o jejum. Portanto, nosso estudo indica que a ativação específica e seletiva de neurônios POMC do ARC durante o jejum e na ausência de desenvolvimento de mecanismos compensatórios desencadeados por mecanismos de deleção gênica, surpreendentemente induz uma menor perda e peso corporal e aumento da glicemia, associada com alteração na expressão de genes no fígado envolvidos em tais respostas. Embora conflitantes, nossos dados reforçam o envolvimento desse grupo neuronal na homeostase energética e no controle a glicose.

Palavras chave: POMC, homeostase energética e da glicose, jejum, DREADD.

ABSTRACT

The uncover of the role of different neural groups in the control of energy and glucose homeostasis is essential for the development of new therapies to handle metabolic disorders. In this context, studies have indicated that the increase in the activity of POMC neurons in the ARC reduces food consumption and causes hypoglycemia. In addition, such actions attributed to these neurons have been observed, at least in part, in studies using experimental models of gene deletion during embryonic development. However, it is known that the embryonic gene deletion methodology triggers the recruitment of compensatory mechanisms, which in turn could hide the real contribution of the ARC POMC neurons to the control of energy and glucose homeostasis. To avoid the development of such effects, the present study used the DREADD technology to activate the ARC POMC neurons during fasting and observe the effects on the energetic metabolism and plasma glucose levels. We observe that the activation of ARC POMC neurons during fasting promotes a reduction in body weight loss. In addition, the activation of the ARC POMC neurons reduces glucose sensitivity, as showed by the increase in GTT, without change insulin sensitivity in fasted animals. These responses were not associated with changes in plasma leptin, insulin and corticosterone levels. The increase in plasma glucose concentration during the GTT study seems to be associated with an increase in the mRNA expression of the enzyme *G6pc* in the liver, which can convert glucose-6-phosphate into free glucose. Additionally, we observed decreased mRNA expression of *Lpl* and *Cpt1a* in the liver after activation of the ARC POMC neurons during fasting. Therefore, our study indicates that the specific and selective activation of ARC POMC neurons during fasting, and in the absence of the development of compensatory mechanisms that can be triggered by the use of gene deletion techniques, surprisingly reduced the body weight loss and increased glycemia, associated with changes in the expression of genes in the liver involved in such responses. Although conflicting, our data highlight the involvement of this neuronal group in the energy homeostasis and glucose control.

Keywords: POMC, energy homeostasis and glucose, fasting, DREADD.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Foto do gel de agarose do produto da PCR para identificação da presença da Cre-recombinase em animais *Pomc-IRES-Cre*. Banda superior referente ao controle interno. Banda inferior indica a presença da Cre-recombinase. A presença das 2 bandas indica que o animal é heterozigoto para a presença da Cre-recombinase.19
- Figura 2:** Esquema representativo do constructo carreando DREADD-mCherry empregando a estratégia FLEX Switch, que usa 2 pares de locais de recombinação loxP (representados pelas setas) para obter inversão e expressão de transgene mediada por Cre . L-ITR, repetição terminal invertida à esquerda; R-ITR, repetição terminal invertida à direita; WPRE, elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite da marmota.20
- Figura 3 -** Fotomicrografias do ARC dos camundongos *Pomc-IRES-Cre* infectados com AAV8 carregando DREADD excitatório, fusionado ao mCherry (pontos vermelhos). Projeções dos neurônios POMC do ARC para neurônios do PVN.24
- Figura 4:** Alteração do peso corporal em gramas (A) e em porcentagem (B) de animais WT, *Pomc-IRES-Cre* expressando mCherry e *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD que foram jejuados e tratados com salina ou CNO. **** $p < 0.001$ vs *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD e # $p < 0.05$ vs demais grupos controle tratados com CNO. *As avaliações de peso corporal obtidas durante a primeira e terceira coleta de sangue não foram apresentadas pois foram efetuadas na ausência de jejum e de tratamento com fármacos, com o intuito de verificarmos o retorno do peso corporal dos animais aos níveis basais nos períodos de jejum....25
- Figura 5:** Concentração plasmática de corticosterona de animais WT, *Pomc-IRES-Cre* expressando mCherry e *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD que foram jejuados e tratados com salina ou CNO. **** $p < 0.001$ vs *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD e # $p < 0.05$ vs demais grupos controle tratados com CNO.....25
- Figura 6:** Concentração plasmática de insulina (A) e leptina (B) em animais WT, *Pomc-IRES-Cre* com mcherry e *Pomc-IRES-Cre* com DREADD excitatório em neurônios POMC do ARC durante jejum de 36 horas e tratamento com CNO.26
- Figura. 7:** Avaliação temporal do GTT (A), ITT (B) e área sob a curva do GTT (C) e ITT (D) de camundongos WT e *Pomc-IRES-Cre* expressando mCherry ou DREADD excitatório DREADD que foram jejuados e tratados com CNO. * $p < 0.05$ *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD vs WT e *Pomc-IRES-Cre* – mCherry tratados com CNO.....27

Figura 8: Alteração na expressão de genes no fígado relacionados ao metabolismo da glicose como *G6pc* (A), *Pck1* (B), *Gck* (C), *Gsk3a* (D), *Gsk3b* (E) e *Il6* (F) em animais jejuados WT, *Pomc-IRES-Cre* expressando *mCherry* e *Pomc-IRES-Cre* expressando DREADD que foram jejuados e tratados com CNO. *p<0.05 vs WT e # p<0.05 vs *Pomc-IRES-Cre::mCherry*27

Figura 9: Alteração na expressão de genes no fígado relacionados ao metabolismo de lipídios como *Fasn*(A), *Cd36*(B), *Lpl*(C), *Ppara* (D), *Prkaa2* (E), *Cpt1a*(F), *Acaca* (G), em animais WT, *Pomc-IRES-Cre* expressando *mCherry* e *Pomc-IRES-Cre* expressando DREADD que foram jejuados e tratados com CNO. *p<0.05 vs WT e #p<0.05 vs *Pomc-IRES-Cre::mCherry*.....29

LISTA DE ABREVIACES

ACTH	(Hormônio adrenocorticotrófico)
AgRP	(<i>Peptídeo relacionado ao Agout</i>)
ARC	(Núcleo arqueado do hiptlamo)
CNO	(Clozapina-N-xido)
<i>db/db</i>	(Animais com deleo do gene do receptor da leptina)
DREADD	(Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs).
Icv	Intracerebroventricular)
Lepr	(Receptor de leptina)
NPY	(Neuropeptdio Y)
NTS	(Núcleo do Trato Solitário)
<i>ob/ob</i>	(Animais com deleo do gene da leptina)
POMC	(Proopiomelanocortina)
PVN	(Núcleo Paraventricular)
SNC	(Sistema Nervoso Central)
α -MSH	(Hormônio Estimulante de Melanócitos alfa)
GnRH	(<i>Growth Hormone Releasing Hormone</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Genotipagem de animais <i>Pomc-IRES-Cre</i>	18
3.3 CNO e vetor viral	19
3.4 Cirurgia estereotáxica.....	20
3.5 Perfusão transcardíaca	21
3.6 Criostato e microscopia	21
3.7 Protocolo experimental 1	21
3.8 Protocolo experimental 2.....	22
3.9 Dosagem hormonal e metabólica (Protocolo 1)	22
3.10 Teste de tolerância a glicose e insulina	23
3.11 Avaliação da expressão gênica.....	23
3.12 Análise Estatística	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Verificação da expressão do DREADD em neurônios POMC do ARC.....	24
4.2 Avaliação do efeito da ativação quimiogénica dos neurônios POMC do ARC sobre o peso corporal e sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, leptina e insulina em animais jejuados.	24
4.3 Avaliação da tolerância a glicose (GTT) e sensibilidade a insulina (ITT) em animais jejuados e submetidos a ativação quimiogénica dos neurônios POMC do ARC.....	26
4.4 Avaliação do efeito da ativação quimiogénica dos neurônios POMC do ARC sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose em animais jejuados.	27
4.5 Avaliação do efeito da ativação quimiogénica dos neurônios POMC do ARC sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos em animais jejuados.....	28
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÃO	35

1. INTRODUÇÃO

Para que as células do organismo possam manter suas funções e homeostasia, é necessário um aporte contínuo de energia. Tal processo somente é possível devido ao auxílio de diversas enzimas que coordenadamente executam um conjunto de reações que culminam na produção de energia (CAMPBELL, FARRELL, 2008). Estas reações estão reunidas em duas vias metabólicas: o catabolismo e o anabolismo (HANSON, 1989; HARGREAVES, 2005). O catabolismo é importante na geração de moléculas mais simples, a partir da degradação de moléculas complexas, com a liberação de energia (BERG, 2007). Por sua vez, o anabolismo é importante para as reações nas quais moléculas complexas são sintetizadas a partir de moléculas simples. O anabolismo é essencial, por exemplo, para o processo de crescimento e manutenção do organismo (CAMPBELL, 2007).

Os principais substratos energéticos utilizados nessas reações são os carboidratos, os lipídios e as proteínas. As moléculas provenientes do processamento desses substratos energéticos são encaminhadas para as células, onde são oxidadas, produzindo então a energia na forma de ATP (HANSON, 1989; BERG, 2007; CAMPBELL, 2007). Muitos tecidos utilizam a energia produzida pelo processamento das diferentes fontes energéticas, mas algumas células, como os neurônios e as hemácias, utilizam preferencialmente o produto da clivagem dos carboidratos, a glicose, como fonte de energia. Além de ser produzida durante o processo de clivagem dos carboidratos, a glicose pode ser também armazenada no corpo (predominantemente no fígado) na forma de glicogênio, que pode ser convertido em glicose, quando há baixas concentrações da mesma no plasma (ANTUNES-RODRIGUES et al, 2005). Ainda, a glicose também pode ser sintetizada por meio de precursores não carboidratos, como piruvato, aminoácidos e glicerol. Este processo chamado de gliconeogênese, mantém as concentrações de glicose sanguínea, por exemplo, durante inanição e exercício intenso (AMABIS, 2006; SILVEIRA, 2011).

Os lipídios também são compostos com grande valor energético, adquiridos de forma endógena ou exógena. O tecido adiposo armazena na forma de gordura, os triacilgliceróis, para serem utilizados como fonte de energia. Assim, quando necessário, estes são hidrolisados, formando glicerol e os ácidos graxos, que posteriormente são utilizados pelos tecidos, como o fígado e os músculos, sendo o fígado o principal sintetizador de lipídios endógenos (NELSON, 2014). Assim, o processamento dos lipídeos pelo fígado durante a beta oxidação, também é uma importante fonte produtora de glicose, sendo a beta oxidação uma das principais vias metabólicas envolvidas nesse processo (NEWSHOLME, 1983).

O cérebro não metaboliza lipídios, mas faz uso de corpos cetônicos para obter energia quando suas concentrações de glicose estão baixas, como por exemplo, em situações de jejum (FARIA, 2007). Os corpos cetônicos facilitam o transporte da energia obtida pela oxidação dos ácidos graxos aos tecidos periféricos (NELSON, 2018).

De modo geral, todos estes processos periféricos necessários para obtenção e processamento dos substratos energéticos, essenciais para a manutenção da homeostase energética e da glicose, podem ser modulados pelo sistema nervoso central (SNC). Mais especificamente, o núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) é considerado uma das regiões mais importantes do SNC para o controle da homeostase energética e da glicose. Lesões nesta região podem desencadear um desequilíbrio severo dos estoques periféricos de energia. De fato, em um estudo de lesão química do ARC induzida pela administração de glutamato monossódico em neonatos e tioglicose em animais adultos, observou-se o desenvolvimento de obesidade severa (MEISTER et al, 1989; BERGEN et al, 1998).

Já é conhecido que o ARC apresenta grupamentos neuronais variados como RIP-cre (rat insulin-2 promoter), PNO (prepronociceptin), TH (Tirosina hidroxilase), AgRP/NPY (agouti-related peptide/neuropeptídeo Y), POMC (Proopiomelanocortina), GnRH (Growth Hormone Releasing Hormone), Kisspeptina e Somatostatina (KONG et al, 2012, Zhang, X.,2016). CASSIDY e KONG, 2017; CAMPEBELL et al, 2017; TIMPER e BRUNING, 2017; LOWELL, 2019; JAIS et al, 2020), podendo cada um destes grupamentos apresentar funções diferentes ou complementares. Contudo, é importante mencionar que os neurônios AgRP/NPY e POMC tem maior destaque em pesquisas relacionadas ao controle do metabolismo energético.

Há muitos anos a importância dos neurônios AgRP/NPY do ARC tem sido investigada pelo uso de técnicas de engenharia genética (WILLIAMS et al, 2001; MORTON et al, 2006) KRASHES et al, 2011; APONTE et al, 2011; XU et al, 2018). Desta forma, já está bem estabelecido que a ativação deste grupamento de neurônios induz aumento do consumo de alimento e redução do gasto de energia (KRASHES et al, 2011; APONTE et al, 2011). Estudos também o relacionam com queda na tolerância a glicose por mecanismos envolvendo a modulação da gliconeogênese e sensibilidade a insulina (STECULORUM et al, 2016; DODD et al, 2018).

Os neurônios AgRP/NPY do ARC são formados por uma população neuronal homogênea e respondem a diferentes sinais neurais ou hormonais, associados ao metabolismo energético. Durante o jejum, ocorre um aumento da expressão do RNAm dos neuropeptídeos *Agrp* e *Npy* (HAHN et al, 1998) e despolarização destes neurônios (TAKAHASHI e CONE, 2005). Contudo,

a ativação do Lepr (receptor de leptina) em resposta a administração exógena de leptina, promove hiperpolarização de neurônios AgRP/NPY, inibindo a liberação de seus neurotransmissores (MORTON et al, 2006). As ações hipoglicemiantes da leptina podem estar relacionadas à sinalização via neurônios AgRP/NPY do ARC, conforme mostram estudos mais recentes (XU et al, 2018).

Por outro lado, a POMC é um precursor expresso no ARC, núcleo do trato solitário (NTS), hipófise e tecidos periféricos (CONE, 2005). Da clivagem deste precursor, derivam os peptídeos α -MSH (Hormônio estimulante do melanócito alfa), Hormônio Estimulante de Melanócito beta, Hormônio Estimulante de Melanócito gama, ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e a β -endorfina (MERCER et al. 2013; TODA et al, 2017). Esse processo depende da presença das enzimas pró-convertases 1 e 2 e da carboxipeptidase, por isso a POMC é considerada tecido específico no ARC. A despolarização e aumento da atividade neuronal de POMC do ARC, promove a redução do consumo de alimento, aumento do gasto de energia e redução das concentrações plasmáticas de glicose (MORTON et al, 2006).

Estudos mostram que animais knockout para POMC desenvolvem obesidade relacionada com aumento de tecido adiposo e comprimento naso-anal (CHALLIS et al, 2004; YASWEN et al, 1999). A obesidade nestes animais estava associada a hiperfagia e queda no consumo de oxigênio em condições basais decorrente dos reduzidos níveis plasmáticos de T4 (tiroxina) e aumentados de leptina (CHALLIS et al, 2004; YASWEN et al, 1999). Ainda, devido a deleção global da POMC se observa falha no desenvolvimento da adrenal, com níveis circulantes reduzidos ou não detectáveis de corticosterona nestes animais (YASWEN et al, 1999). Vale destacar que estes estudos sugerem, mas não determinam, que estes efeitos sobre o metabolismo estão relacionados a deleção da POMC no ARC, tendo em vista que este precursor também é expresso no NTS e outros tecidos periféricos.

Considerando que a clivagem da POMC no SNC deriva diversos peptídeos, dentre eles o α -MSH, pode-se observar em animais com deleção do gene da POMC e administração de α -MSH, uma redução do peso corporal dos animais obesos, mas não em animais controle, e a após a interrupção da terapia com este peptídeo, os animais tendem a ganhar peso novamente (YASWEN et al. 1999). Contudo, outros estudos farmacológicos demonstraram que a administração icv (intracerebroventricular) de agonistas da melanocortina reduz o consumo de alimento e o peso corporal também em animais selvagens (MURPHY et al, 1998). Importante destacar que a sinalização via α -MSH, que modula negativamente a homeostase energética, está associada a ativação dos receptores 4 da melanocortina no Núcleo Paraventricular (PVN) e a

consequente despolarização neuronal (GHAMARI-LANGROUDI et al, 2015). Adicionalmente, a deficiência na produção ou na sinalização do α -MSH tem sido associado ao desenvolvimento de hiperfagia e ganho de peso (MERCER et al, 2013).

Estudos demonstraram que animais com deleção da POMC apresentam uma tolerância normal à glicose, mas têm uma sensibilidade aumentada à insulina (HOCHGESCHWENDER et al, 2003). Esta resposta aparentemente está associada aos baixos níveis circulantes de corticosterona encontrados nestes animais (HOCHGESCHWENDER et al, 2003). Existem também outros estudos mostrando que a administração icv (intracerebroventricular) de melaton II, análogo sintético do α -MSH, induz uma queda na liberação basal de insulina e paralelamente altera a tolerância a glicose, levando a uma situação de hiperglicemia (FAN et al. 2000). Por outro lado, também foi observado aumento na captação plasmática de glicose e redução periférica deste metabólito após administração central de MSH (OBICI et al, 2001). Ainda, outro estudo usando um modelo de expressão da enzima Cre - recombinase induzida por tamoxifeno, mostra que a deleção dos receptores de leptina (*Lepr*) de neurônios POMC resulta em um aumento significativo da glicemia plasmática a durante o Jejum, resultado que aponta para os efeitos dos neurônios POMC modulando a glicemia durante o jejum por meio da leptina (CARON, 2018). Desta forma, estes estudos indicam que a POMC também pode contribuir para o controle das concentrações plasmáticas de glicose.

Os neurônios POMC do ARC são sensíveis a alterações nos níveis circulantes de substratos energéticos e a alterações nas concentrações plasmáticas de hormônios relacionados aos estoques periféricos de energia (ELMQUIST et al, 2005; MORTON et al. 2006). Animais com deficiência na produção (*ob/ob*) ou na sinalização (*db/db*) da leptina são obesos e diabéticos, e em situações de jejum e redução de energia onde se observa uma queda nas concentrações plasmáticas de leptina, os neurônios POMC apresentam também redução da expressão do RNAm da *Pomc* e também atividade elétrica (SCHWARTZ et al, 1997; ATASOY et al, 2012). Por outro lado, em resposta ao estímulo com leptina, neurônios POMC aumentam a frequência de disparo axonal, diminuem o potencial de membrana e aumentam a expressão do RNAm deste peptídeo e da liberação de α -MSH (COWLEY et al, 2001; MORTON et al, 2006).

Em estudos de deleção gênica específica, utilizando o sistema de recombinação gênica Cre-LoxP, foi demonstrado que a deleção do *Lepr* em neurônios POMC induz aumento intermediário do peso corporal, não tão drástico como aquele observado em animais *ob/ob* ou *db/db*, e consequentemente aumento na concentração plasmática de leptina (BALTHAZAR et al, 2004). Curiosamente, não foram observadas alterações no consumo de alimento, na glicemia e

na corticosterona plasmática (BALTHALTHAZAR et al, 2004). Por outro lado, foi demonstrado que a reexpressão do *Lepr* em neurônios POMC de animais db/db reduz de forma expressiva o consumo de alimento, não altera o peso corporal e normaliza por completo a glicemia plasmática (HUO et al, 2009). Ainda, camundongos ob/ob com inserção de um transgene que induz aumento na expressão no gene da POMC especificamente em neurônios, apresentam redução parcial na obesidade e hiperfagia, e normalização por completo da glicemia e resistência a insulina (MIZUNO et al, 2003). De modo geral, estes resultados afirmam a importância dos neurônios POMC do ARC no controle da homeostase energética e da glicose e, também, sugerem que suas ações na homeostase da glicose podem ser independentes de seus efeitos sobre a homeostase energética.

Neurônios POMC do ARC constituem um grupamento neuronal heterogêneo (ERNST et al, 2009; WILLIAMS et al, 2010; PADILLA et al, 2010; LAN et al, 2017). Em resposta ao tratamento com leptina, parte dos neurônios POMC despolarizam, enquanto outros não respondem, e alguns até se tornam hiperpolarizados (WILLIAMS et al, 2010). Estudos de eletrofisiologia e imunomarcção determinaram que aproximadamente 30% dos neurônios POMC respondem a leptina (ERNST et al, 2009; WILLIAMS et al, 2010). Ainda, foi observado que durante o desenvolvimento embrionário, parte das células POMC podem diferenciar-se em neurônios NPY (PADILLA et al, 2010). Em um estudo utilizando single-cell RNA sequencing e animais *Pomc-eGFP*, foi demonstrado que aproximadamente 27% dos neurônios POMC expressam níveis elevados de *Agrp* e *Npy* (LAN et al, 2017). Adicionalmente, este grupamento de neurônios coexpressa tanto glutamato, quanto GABA, neurotransmissores reconhecidos por induzirem efeitos opostos sobre a atividade neuronal (HENTGES et al, 2009). Reforçando os achados em relação a expressão de glutamato e GABA nestes neurônios, no estudo de LAM et al (2017), foi demonstrado que 70% dos neurônios POMC que foram sequenciados (já excluindo os 27% que apresentam elevada expressão do RNAm do *Agrp* e *Npy*) demonstram elevados níveis da glutamato descarboxilase (*Gad67/Gad1*), indicando que apresentam a propriedade de secretar GABA, enquanto que 50% destes neurônios expressam o transportador vesicular de glutamato (*Slc17a6*) e podem liberar glutamato.

Além da heterogeneidade, parte das respostas observadas podem estar associadas ao desenvolvimento de mecanismos compensatórios decorrentes da perda de um determinado gene. A deleção neonatal dos neurônios *AgRP/NPY*, por exemplo, tem pouco efeito sobre o consumo de alimento e peso corporal dos animais (LUQUET et al, 2005), mostrando que o desenvolvimento de mecanismos compensatórios pode interferir na função de determinados

genes. Estes mesmos animais apresentam crescimento, desenvolvimento e comportamento alimentar semelhante ao de animais controle. Porém, quando realizada em animais adultos, a deleção deste grupamento de neurônios tem um efeito importante sobre a homeostase energética, levando os animais a morte por inanição (LUQUET et al, 2005). A formação do neurocircuito relacionado com a homeostase energética não está completo e maduro até o 16º dia vida pós-natal (BOURET et al, 2004). Portanto, qualquer perturbação nos componentes deste circuito, como aquelas relacionadas aos estudos de deleção gênica podem ter algum impacto sobre o desenvolvimento deste sistema. Ainda, foi demonstrado que a leptina tem a propriedade de modular o desenvolvimento deste neurocircuito (BOURET et al, 2004). Assim, parte dos resultados apresentados inicialmente, podem ter uma interpretação equivocada ou exagerada/subestimada sobre a participação da POMC nos mecanismos de controle da homeostase energética e da glicose em animais com deleção do gene da POMC, ou mesmo em animais ob/ob, db/db ou outros com deleção específica do Lepr antes da formação completa do neurocircuito hipotalâmico.

Resultados obtidos por meio de estudos de deleção embrionário relacionando genes com controles de determinadas funções, podem não ser tão precisos devido ao desenvolvimento de mecanismos compensatórios do organismo. Para superar este tipo de limitação, ferramentas inovadoras como os DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs), foram desenvolvidas. DREADDs são receptores muscarínicos mutantes que perderam a propriedade de responder ao seu ligante endógeno, mas foram desenvolvidos para ligar-se a uma droga sintética chamada CNO (Clozapina-N-óxido) (ROTH, 2016). Este sistema permite a modulação específica e reversível da atividade de grupamentos neuronais (KRASHES et al, 2011). Assim, espera-se que a ação dos neurônios POMC do ARC, tenha a propriedade de diminuir a ingestão alimentar, aumentar a sensação de saciedade e o gasto energético, em situações em que o organismo encontra-se alimentado ou com estoques de energia. Considerando que este agrupamento neuronal encontra-se inibido em situações de déficit energético, nosso objetivo foi investigar quais seriam os efeitos da atividade destes neurônios durante o estresse induzido pelo jejum. Para isso, utilizamos a tecnologia do DREADD para superar as limitações relacionadas aos estudos de deleção gênica e, investigar as consequências da ativação seletiva e específica dos neurônios POMC do ARC sobre o metabolismo energético e, da glicose na situação de estresse metabólico induzido pela privação de alimento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da ativação seletiva e específica de neurônios POMC do ARC sobre as alterações do metabolismo energético e da glicose em animais submetidos ao estresse metabólico.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito da ativação de neurônios POMC do ARC sobre a perda de peso corporal induzido pelo jejum prolongado de 36h;
2. Avaliar o efeito da ativação de neurônios POMC do ARC sobre as concentrações plasmáticas de leptina, insulina e corticosterona em animais jejuados por 36h;
3. Avaliar o efeito da ativação de neurônios POMC do ARC durante o GTT e ITT em animais jejuados por 36h;
4. Avaliar o efeito da ativação de neurônios POMC do ARC sobre a expressão de genes hepáticos envolvidos no metabolismo da glicose e de lipídeos em animais jejuados por 36h;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos, modificados geneticamente da linhagem *Pomc-IRES-Cre* (*Pomc^{tm1(cre)Low1}*) e seus respectivos controles mantidos no background C57/black, com idade entre 7-9 semanas (momento da administração do vetor viral), pesando entre 20 e 25 gramas no início da experimentação. Os animais foram mantidos em caixas individuais de acrílico, no Laboratório de Experimentação Animal da UNAERP, aclimatados à 23 ± 2 °C, sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes apagadas às 18:00). Durante todo o experimento, os animais tiveram livre acesso à água e alimento, a não ser quando submetidos aos protocolos específicos envolvendo o modelo de jejum. Em cada grupo experimental foram utilizados de 10 a 15 animais.

Toda a metodologia descrita no presente trabalho segue os princípios éticos da experimentação animal e foi aprovada pela Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA UNAERP (Processo N° 12/2017).

3.2 Genotipagem de animais *Pomc-IRES-Cre*

Para a determinação da presença ou ausência da Cre-recombinase (o transgene presente em camundongos *Pomc-IRES-Cre*), realizamos genotipagem utilizando primers específicos que permitiram identificar a presença da enzima Cre-recombinase em Hetero ou Homozigose (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos dos diferentes *primers* utilizados na identificação da ausência ou presença da Cre-recombinase em Hetero ou Homozigose em animais *Pomc-IRES-Cre* pelo emprego da técnica de genotipagem

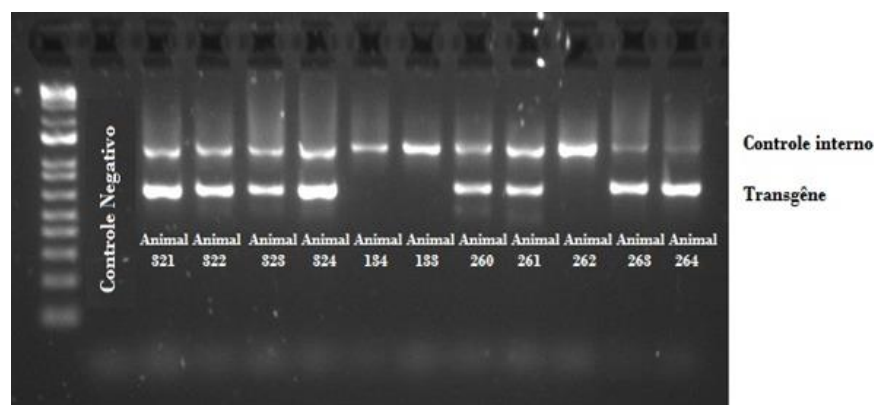
Genotipagem animais <i>Pomc-IRES-Cre</i>	
POMC 1	TGGCTCAATGTCCTTCCTGG
POMC 2	CACATAAGCTGCATCGTTAAG
POMC 3	GAGATATCTTTAACCTGATC

Tabela 2: Configuração (quantidade de ciclos, temperatura e tempo) da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizada para genotipagem de animais *Pomc-IRES-Cre*.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)					
Stage 1	Stage 2			Stage 3	
X 1	X 40			X 1	
94°C	94°C	57°C	72°C	72°C	4°C
5'	0'30	0'30	1'30	7'	∞
Step 1	Step 1	Step 2	Step 3	Step 1	Step 2
31 Ciclos					

A presença de um amplicon de aproximadamente 1300 pares de base no gel de poli-acrilamida (2%) indica a eficiência da reação de PCR (controle interno positivo). Um amplicon de 700 pares de base indica a presença da Cre recombinase. Animais Homozigotos para a Cre-recombinase (Figura 1) são definidos pela presença de uma banda única de 700 pares de base e animais Heterozigotos apresentam 1 banda de 1300 e outra de 700 pares de base.

Figura 1: Foto em gel de agarose do produto da PCR para identificação da presença da Cre-recombinase em animais *Pomc-IRES-Cre*. Banda superior referente ao controle interno. Banda inferior referente a presença da Cre-recombinase. A presença das 2 bandas indica que o animal é heterozigoto para a presença da Cre-recombinase.



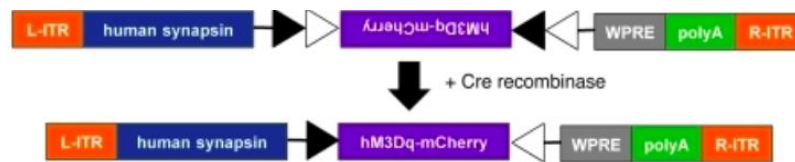
3.3 CNO e vetor viral

DREADD são receptores muscarínicos mutantes que respondem somente ao fármaco Clozapina-N-Óxido. Para modular a atividade do DREADD adquirimos CNO da Cayman

chemical (Ann Arbor, EUA- Catálogo 16882). O mesmo foi ressuspensão em solução salina 0,9% e administrado na dose de 1mg/kg, i.p, cinco vezes (à cada 8h) durante o período de jejum.

O AAV (*Adeno-Associated Virus*) é utilizado como carreador do DREADD (*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug*) excitatório ou da mCherry, que é uma proteína que expressa coloração vermelha fluorescente, usada como marcador. Os transgenes estão inseridos no AAV em configuração DIO (*Double-Inverted Open Reading Frame*), flanqueados por 2 pares diferentes de sequência LoxP em orientações opostas. A configuração DIO determina que a expressão destes transgenes dependa da presença da enzima Cre-recombinase. Assim, ao utilizarmos animais *Pomc-IRES-Cre*, que expressam a cre-recombinase apenas em neurônios POMC, teremos a expressão do DREADD-mCherry ou somente da mCherry em neurônios POMC. Esta técnica nos possibilita a modulação seletiva e específica de um grupamento de neurônio, conforme ilustra a figura 2 (Krashes 2011). O AAV carreando o DREADD-mCherry ou apenas a mCherry foi adquirido da empresa Addgene.

Figura 2: Esquema representativo do constructo contendo o DREADD-mCherry empregando a estratégia DIO, que usa 2 pares de locais de recombinação loxP (representados pelas setas) para obter inversão e expressão de transgene mediada por Cre. L-ITR, repetição terminal invertida à esquerda; R-ITR, repetição terminal invertida à direita; WPRE, elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite da marmota.



3.4 Cirurgia estereotáxica

O procedimento cirúrgico para administração do vetor AAV8-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry ou AAV8-hSyn-DIO-mCherry, foi feita por meio da utilização do aparelho estereotáxico digital (KOPF Model 963). O AAV foi administrado bilateralmente no núcleo arqueado (ARC) dos animais. Resumidamente, os camundongos foram pesados, previamente tratados com anti-inflamatório (meloxicam, 2 mg/kg) e 20 minutos após foram anestesiados com xilazina (5 mg/kg, ip) e ketamina (45 mg/kg, ip). Após anestesiados os camundongos foram colocados no estereotáxico, para alinhamento do cérebro nos planos rostro-caudal e medial-lateral segundo as coordenadas definidas por consulta ao atlas "The mouse brain in stereotaxic coordinates" do Paxinos e Franklin (antero-posterior -1,4mm, medial-lateral +/-0,25 e dorsal-

ventral -5.85mm). Após demarcações das coordenadas, um orifício pequeno foi feito no crânio do animal, para expor o encéfalo. Na sequência, uma pipeta de vidro (com diâmetro externo de 20 à 40µm) foi inserida no encéfalo do camundongo e posicionada na coordenada dorsal-ventral previamente definida para administração de 300 nL do vetor viral durante 5 minutos. Após 5 minutos adicionais (importante para a difusão do vetor) a pipeta foi removida. A seguir a abertura feita no crânio do animal foi ocluída com resina, a incisão feita na epiderme foi fechada com utilização de Band-Aid líquido e o animal foi monitorado até o término do efeito do anestésico.

3.5 Perfusão transcardíaca

Os animais foram anestesiados com isoflurano e submetidos à perfusão do SNC, após o desaparecimento dos reflexos raqui-medulares. A perfusão transcardíaca foi iniciada com a infusão de solução PBS 0,1M até o clareamento por completo do fígado, seguida pela infusão de 30ml de formalina 10% (Sigma-Aldrich). O tecido cerebral foi pós-fixado em formalina por 4h, e após este período, estocado em uma solução de sacarose 30% à 4 °C

3.6 Criostato e microscopia

Após concluída a desidratação, o tecido cerebral foi processado em triplicatas de 25 µm no criostato e armazenado em solução antifreezing a -20 °C para posterior verificação da expressão do DREADD-mCherry no ARC. O tecido foi montado em lâmina e coberto com meio de montagem (Fluoromount-G) e posteriormente coberto com lamínula. As imagens foram capturadas em microscópio de imunofluorescência (Leica Microsystems).

3.7 Protocolo experimental 1

Animais *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD-mCherry ou somente mCherry e animais WT (também infectados com DREADD-mCherry) foram alojados individualmente logo após a cirurgia para injeção do AAV. Uma semana depois, foi realizada uma coleta inicial de sangue da veia facial dos animais em condição *ad libitum*. Sete dias após, os mesmos animais foram submetidos ao jejum (36 horas), pesados e tratados com 5 i.p. injeções de salina 0,9% (22h - dia1, 6h, 14h, 22h - dia2 e 6h - dia3) e seu sangue foi coletado da veia facial por volta das

10h. Após uma semana de recuperação do jejum, os animais foram submetidos a uma coleta de sangue adicional, no estado alimentado, para verificarmos se a atividade do eixo HHA retornara ao estado basal. Finalmente, 1 semana depois, os animais foram submetidos a um novo período de jejum (36 horas), pesados e tratados com 5 i.p. injeções de CNO (1mg/kg - 22h - dia1, 6h, 14h, 22h - dia2 e 6h - dia3). Ao término das 36h de jejum, os animais foram anestesiadas rapidamente com isoflurano, o sangue foi coletado da cavidade intraperitoneal (após remoção do fígado), em tubo heparinizado, centrifugado (3000 rpm – 30min) para coleta de plasma que foi armazenado a -70°C para dosagem hormonal. Os tecidos periféricos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados no -70 °C para posterior avaliação da expressão gênica. Em seguida foi realizado o procedimento de perfusão para fixação do tecido cerebral que foi processado em criostato, em fatias de 25 um, para avaliação da expressão de mCherry.

3.8 Dosagem hormonal e metabólica (Protocolo 1)

Os níveis plasmáticos de corticosterona foram determinados por radioimunoensaio após extração com etanol, conforme descrito anteriormente (ELIAS et al, 1997, 2004; RORATO et al. 2008, 2009). As concentrações de leptina plasmática foram determinadas por ELISA (catálogo EZML-82K - Millipore, Billerica, EUA) usando kits comerciais de acordo com o protocolo do fabricante, e as concentrações de glicose plasmática foram determinadas pela utilização de kit comercial com metodologia enzimática colorimétrica, Analisa (Catálogo 434 MS 8002223067).

3.9 Protocolo experimental 2

Animais *Pomc-IRES-Cre* e animais WT, foram submetidos ao protocolo de jejum (36hrs) e tratados com CNO (1mg/Kg, 5 injeções como apresentado no protocolo 1). Após a última injeção os animais foram submetidos ao GTT (teste de tolerância à glicose). Logo após a finalização do GTT, os animais foram realocados às suas caixas com livre acesso a água e ao alimento até recuperarem o peso corporal observado no início do período do jejum (1 semana após). A seguir, os animais foram serem submetidos a um novo protocolo de jejum de 36 horas e tratamento com 5 injeções de CNO para o teste de tolerância à insulina (ITT) (item 4.9). Ao término dos protocolos experimentais, todos os animais, foram perfundidos para fixação do tecido cerebral e posterior avaliação da expressão de mCherry.

3.10 Teste de tolerância a glicose e insulina

Animais *Pomc-IRES-Cre* expressando DREADD-mCherry ou mCherry e WT foram submetidos ao jejum e tratados com CNO (5 injeções), como descrito previamente, e submetidos ao GTT e ITT ao final das 36hs de experimento (aproximadamente as 10 horas). Para a realização do GTT, animais receberam sobrecarga i.p. de glicose (2g/kg) às 09:40 e tiveram sua glicemia mensurada (Glicosímetro Accu Chek Active) nos tempos 0', 15', 30', 60' e 120'. Uma semana após a realização do GTT os animais foram submetidos ao ITT. A insulina foi administrada i.p. (1ui/kg), aproximadamente às 09:40, e glicemia dos animais foi avaliada (Glicosímetro Accu Chek Active) nos tempos 0', 15', 30', 60' e 120'. Os resultados estão expressos como área sobre a curva. Examinamos o cérebro quanto à expressão de mCherry de forma bilateral em relação ao ARC; animais com expressão unilateral do gene repórter foram excluídos do estudo.

3.11 Avaliação da expressão gênica

O tecido hepático, após congelado a -70 °C, foi separado em partes de aproximadamente 20mg para extração do RNA utilizando método caseiro com reagente Qiazol lysis (Qiagen-catálogo 79306). Em seguida 1000 ng de RNA foram transcritos reversamente utilizando o kit de síntese de cDNA QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen). A PCR quantitativa foi realizada utilizando o kit QuantiNova Probe (Qiagen) e os primers específicos Taqman adquiridos da IDT. A PCR quantitativa foi realizada em triplicata utilizando o termociclador QuantStudio 5,384 (Thermo Scientific, Foster City, CA). A expressão do RNAm foi calculada pelo método da curva padrão e normalizados para o nível de *Emc3* (gene usado como controle).

3.12 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm SEM e foram analisados usando o software Prism 7.0 (GraphPad). As amostras foram inicialmente avaliadas para exclusão de *outliers* pelo teste de Grubbs e posteriormente testadas em relação a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, que mostrou distribuição regular. Para os estudos de avaliação da alteração de peso corporal e da concentração plasmática de corticosterona, utilizamos ANOVA de 2 vias, seguido pelo teste de

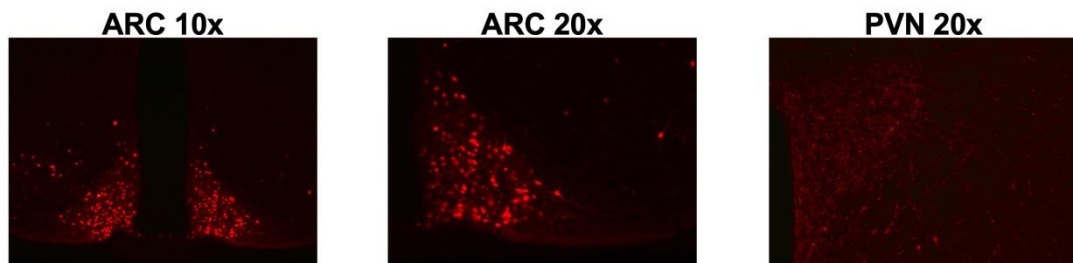
Tukey. Para a análise das alterações das concentrações plasmáticas de insulina, leptina, glicose e expressão gênica utilizamos ANOVA de 1 via seguido de pós teste de Tukey. As diferenças foram aceitas como significativas com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Verificação da expressão do DREADD em neurônios POMC do ARC.

A avaliação da eficiência do procedimento de administração do AAV, carregando o DREADD-mCherry ou somente mCherry, bem como da transcrição do DREADD foi feita pela visualização do gene repórter, mCherry. Observamos expressão de mCherry em neurônios do ARC (pontos vermelhos), bem como, suas fibras se projetando para o PVN, em animais *Pomc-IRES-Cre* mas não em animais WT.

Figura 3 - Fotomicrografias dos ARC dos camundongos *Pomc-IRES-Cre* infectados com AAV8 carregando DREADD excitatório, fusionado ao mCherry (pontos vermelhos). Projeções dos neurônios POMC do ARC para neurônios do PVN.



4.2 Avaliação do efeito da ativação quimiogenética dos neurônios POMC do ARC sobre o peso corporal e sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, leptina e insulina em animais jejuados.

Podemos observar em nosso gráfico de alteração do peso corporal (Fig. 4.A) e de % de alteração de peso corporal (Fig. 4.B), que os animais dos diferentes grupos apresentaram uma queda importante do peso durante o jejum de 36hrs quando receberam o tratamento com salina. Curiosamente, observamos uma porcentagem reduzida de perda de peso corporal após a ativação dos neurônios POMC do ARC quando comparados com os grupos controle WT e *Pomc-IRES-Cre* expressando mCherry (Fig. 4.B).

Conforme esperado, observamos aumento semelhante das concentrações plasmáticas de corticosterona em animais WT, *Pomc-IRES-Cre* expressando a mCherry e *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD-Gq que foram jejuados por 36h e que receberam administração i.p. de salina (Fig. 5). Ainda, observamos concentrações plasmáticas de corticosterona semelhantes entre todos os grupos experimentais após o tratamento com CNO, indicando que a alteração da atividade dos neurônios POMC do ARC parece não ser importante para a ativação do eixo HHA durante o estresse metabólico. Adicionalmente, os resultados das análises estatísticas não indicaram diferença significativa das concentrações plasmáticas de insulina (Fig. 6.A) ou leptina (Fig. 6.B) de animais *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD em comparação aos demais grupos controles que foram jejuados.

Figura 4: Alteração do peso corporal em gramas (A) e em porcentagem (B) de animais WT, *Pomc-IRES-Cre* expressando mCherry e *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD que foram jejuados e tratados com salina ou CNO. **** $p < 0.001$ vs *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD e # $p < 0.05$ vs demais grupos controle tratados com CNO. *As avaliações de peso corporal obtidas durante a primeira e terceira coleta de sangue não foram apresentadas pois foram efetuadas na ausência de jejum e de tratamento com fármacos, com o intuito de verificarmos o retorno do peso corporal dos animais aos níveis basais nos períodos de jejum.

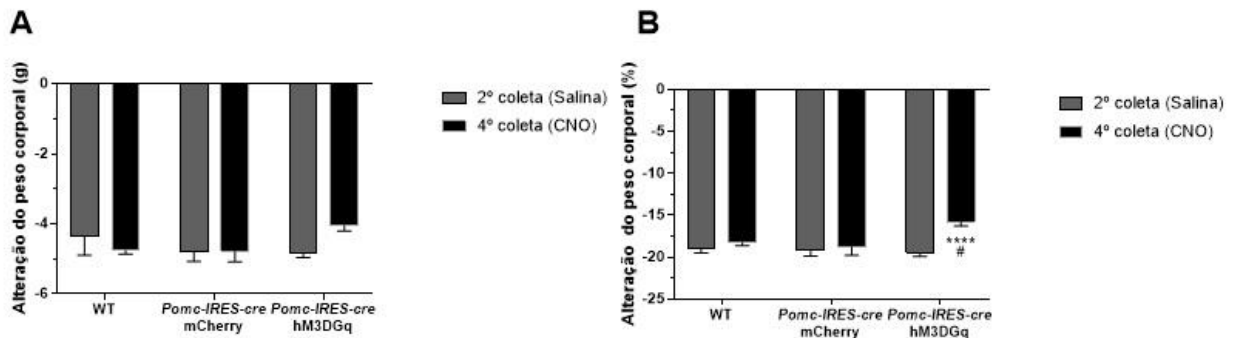


Figura 5: Concentração plasmática de corticosterona de animais WT, *Pomc-IRES-Cre* expressando mCherry e *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD que foram jejuados e tratados com salina ou CNO. **** $p < 0.001$ vs *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD e # $p < 0.05$ vs demais grupos controle tratados com CNO

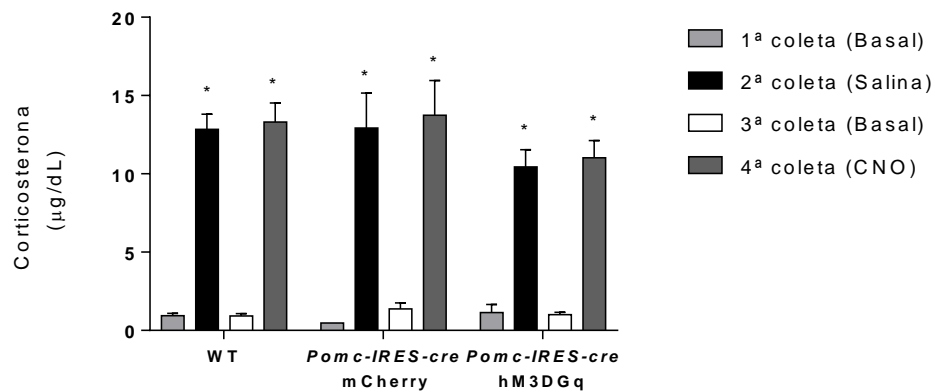
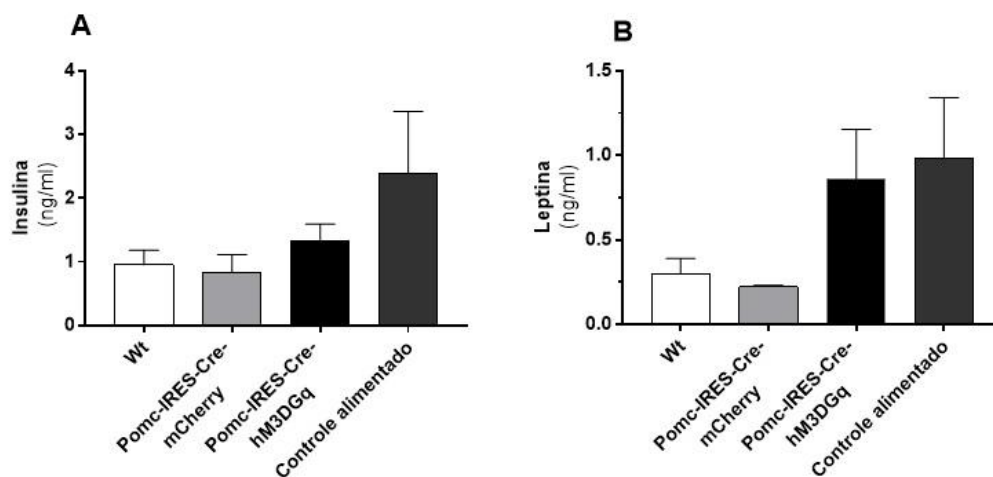


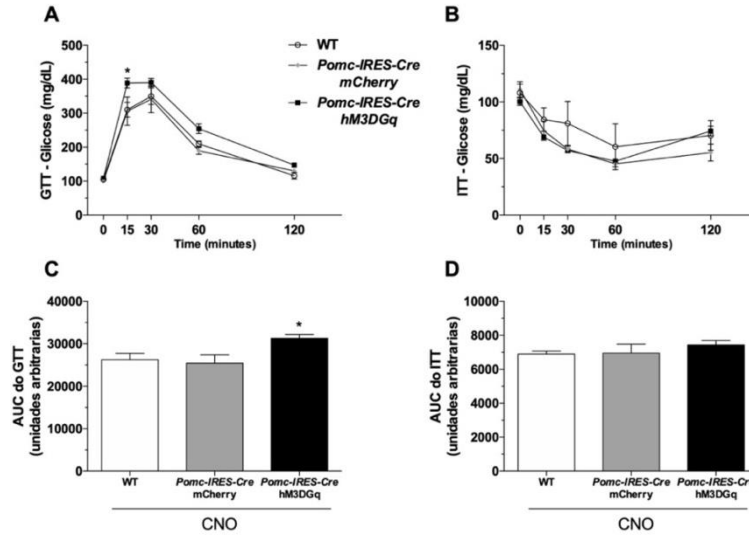
Figura 6: Concentração plasmática de insulina (A) e leptina (B) em animais WT, *Pomc-IRES-Cre* com mcherry e *Pomc-IRES-Cre* com DREADD excitatório em neurônios POMC do ARC durante jejum de 36 horas e tratamento com CNO.



4.3 Avaliação da tolerância a glicose (GTT) e sensibilidade a insulina (ITT) em animais jejuados e submetidos a ativação quimiogenética dos neurônios POMC do ARC.

Como podemos observar pelos gráficos de AUC relacionados a realização do nosso estudo de avaliação dos efeitos da sobrecarga com glicose (GTT) ou insulina (ITT), a ativação dos neurônios POMC do ARC induz o desenvolvimento de tolerância à glicose mas sem alteração da sensibilidade à insulina.

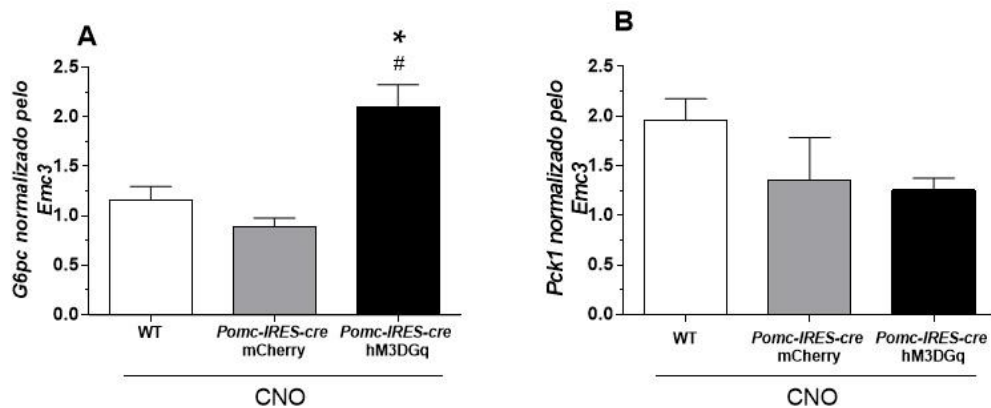
Figura 7: Avaliação temporal do GTT (A), ITT (B) e área sob a curva do GTT (C) e ITT (D) de camundongos WT e *Pomc-IRES-Cre* expressando mCherry ou DREADD excitatório DREADD que foram jejuados e tratados com CNO. * $p < 0.05$ *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD vs WT e *Pomc-IRES-Cre* – mCherry tratados com CNO.

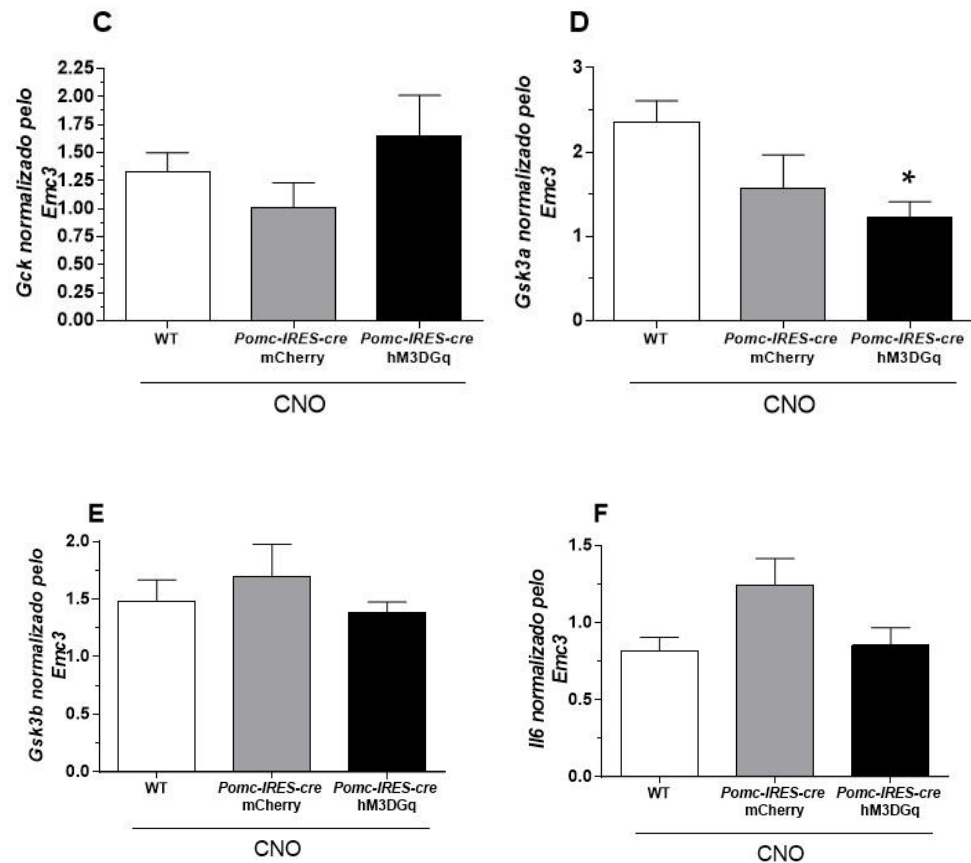


4.4 Avaliação do efeito da ativação quimiogênica dos neurônios POMC do ARC sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose no fígado de animais jejuados.

Ao avaliar a expressão de genes importantes no metabolismo da glicose, foi possível observar um aumento significativo da expressão gênica de *G6pc* em animais *Pomc-IRES-Cre* expressando DREADD-mCherry, durante o jejum e tratamento com CNO, em comparação aos grupos controle. Não observamos alteração na expressão do RNAm de *Pck1*, *Gck*, *Gsk3a*, *Gsk3b* e *Il6*.

Figura 8: Alteração na expressão de genes no fígado relacionados ao metabolismo da glicose como *G6pc* (A), *Pck1* (B), *Gck* (C), *Gsk3a* (D), *Gsk3b* (E) e *Il6* (F) em animais jejuados WT, *Pomc-IRES-Cre* expressando mCherry e *Pomc-IRES-Cre* expressando DREADD que foram jejuados e tratados com CNO. * $p < 0.05$ vs WT e # $p < 0.05$ vs *Pomc-IRES-Cre::mCherry*.

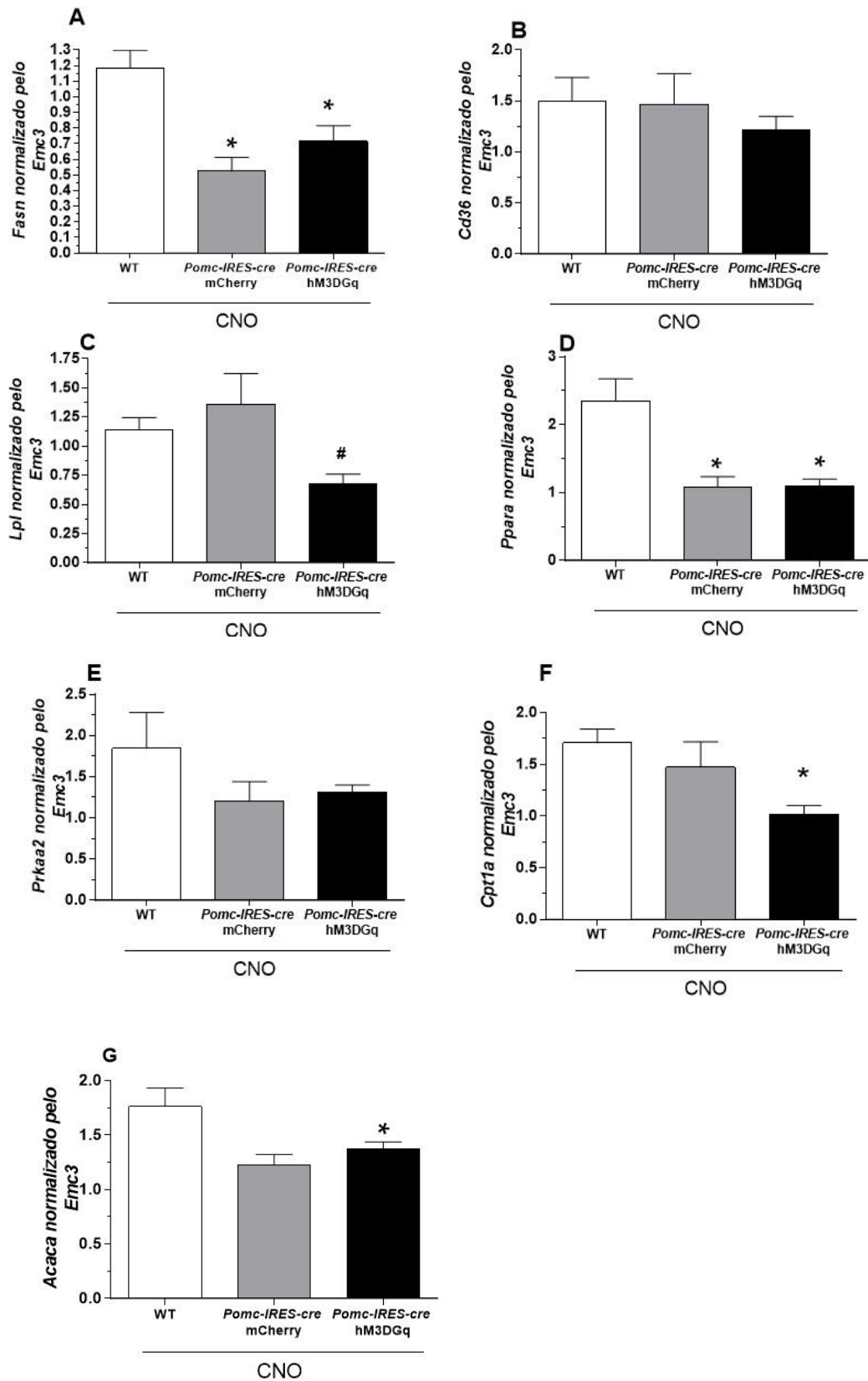




4.5 Avaliação do efeito da ativação quimiogenética dos neurônios POMC do ARC sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos no fígado de animais jejuados.

Os resultados obtidos, indicaram uma diminuição significativa da expressão do RNAm da *Lpl* e *Cpt1a* em animais *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD-mCherry, comparado com animais controle WT e *Pomc-IRES-Cre* expressando mCherry, durante o jejum e tratamento com CNO. Adicionalmente, observamos menor expressão do RNAm de *Fasn*, *Ppara* e *Acaca* em animais do genótipo *Pomc-IRES-Cre*. De fato, acreditamos que a alteração nos níveis de expressão genica de *Fasn*, *Ppara* e *Acaca* está associada ao genótipo do animal ao invés de um efeito relacionado a modulação da atividade neuronal, tendo em vista que, tanto animais DREADD-mCherry quanto animais mCherry apresentaram redução na expressão do RNAm destes genes durante o jejum e tratamento com CNO.

Figura 9: Alteração na expressão de genes no fígado relacionados ao metabolismo de lipídios como *Fasn*(A), *Cd36*(B), *Lpl*(C), *Ppara* (D), *Prkaa2* (E), *Cpt1a*(F), *Acaca* (G), em animais WT, *Pomc-IRES-Cre* expressando *mCherry* e *Pomc-IRES-Cre* expressando *DREADD* que foram jejuados e tratados com CNO. * $p < 0.05$ vs WT e # $p < 0.05$ vs *Pomc-IRES-Cre::mCherry*



5. DISCUSSÃO

Nossos achados demonstram que a ativação seletiva dos neurônios POMC do ARC, durante o jejum, reduziu a perda de peso corporal em comparação aos demais grupos controle. Contudo, neurônios POMC do ARC tem sido fortemente associados a redução de peso corporal por meio da queda do consumo de alimento e aumento do gasto energético (MERCER et al, 2013). Estes efeitos anorexígenos, são mediados pelo aumento da sinalização do α -MSH, produto da clivagem da POMC, via receptores da melanocortina (CONE, 2005; MERCER et al, 2013), conforme evidenciado pela hipofagia seguida da administração icv de agonistas da melanocortina (MURPHY et al, 1998). Ainda, a deficiência na sinalização do α -MSH promove desenvolvimento de hiperfagia e ganho de peso (MERCER et al, 2013). A sinalização via α -MSH, está associada a interação com os receptores 4 da melanocortina (MC-4) no PVN e a consequente ativação neuronal (GHAMARI-LANGROUD et al, 2015).

Como apresentado anteriormente, os efeitos da modulação da POMC sobre o peso corporal, estão associados a redução do consumo de alimento, mas também ao aumento do gasto energético (MERCER et al, 2013). Assim, foi demonstrado que o tratamento ICV com α -MSH modula a atividade do eixo tireoidiano, aumentando os níveis plasmáticos do Hormônio Estimulante da Tireóide (TSH) (KIM et al, 2000). Por outro lado, a clivagem da POMC também dá origem a β -endorfina, que apresenta efeitos orexígenos. A administração central deste neuropeptídeo induz aumento no consumo de alimento via sinalização μ -opióide central (MERCER et al, 2013). Estes achados reforçam a heterogeneidade e função paradoxal dos neurônios POMC. As ações dos opióides sobre o metabolismo energético são complexas, tendo em vista que animais modificados geneticamente e que não produzem β -endorfina são hiperfágicos e obesos (APPLEYARD et al, 2003). Contudo, estes mesmos animais apresentam hiperfagia em resposta a administração exógena de β -endorfina e reduzido consumo de alimento em resposta ao bloqueio da sinalização opióide com naloxana (APPLEYARD et al, 2003). Estudos adicionais investigando a expressão de β -endorfina devem ser realizados com intuito de determinar se uma alteração na expressão dos derivados da POMC pode estar associada com a menor perda de peso em animais *Pomc-IRES-Cre* expressando o DREADD-Gq que foram jejuados e tratados com o fármaco CNO.

Estudos recentes demonstraram que os neurônios POMC do ARC podem se diferenciar em neurônios NPY e que uma porcentagem significativa de neurônios POMC expressa níveis elevados de *AgRP* e *Npy* (PADILLA et al, 2010; LAM et al, 2017). A administração de AgRP ou

NPY diretamente no SNC (SMALL et al, 2001) e a ativação de neurônios AgRP/NPY do ARC pelo uso de optogenética e quimiogenética (APONTE et al, 2011; KRASHES et al, 2011) induz aumento do consumo de alimento e redução no gasto de energia. Parte desta redução no metabolismo esta associada a queda nas concentrações plasmáticas do hormônio tireoidiano (KIM et al, 2000). As ações mediadas pelos neurônios AgRP/NPY do ARC são decorrentes do antagonismo da sinalização da melanocortina e da sinalização inibitória via GABA e NPY em grupamentos de neurônios no núcleo Paraventricular (PVN), banda da estria terminal (BNST), área hipotalâmica lateral (LHA) e núcleo talâmico Paraventricular (PVT) (BETLEY et al, 2013) e em regiões que modulam a atividade do sistema nervoso autônomo (BELL et al, 2018). Nossos resultados iniciais de ativação seletiva e prolongada de neurônios POMC do ARC durante o estresse metabólico se somam a estes estudos sugerindo uma função diferente da classicamente determinada para estes neurônios e que poderia ser mediada por peptídeos (GABA e NPY) que tem a propriedade de diminuir o gasto de energia. Contudo, outros estudos serão realizados para verificar os mecanismos envolvidos na menor perda de peso corporal após a ativação seletiva dos neurônios POMC do ARC durante o jejum.

Em outro grupo de animais submetidos ao mesmo período de jejum e ativação seletiva dos neurônios POMC do ARC, houve aumento da área sobre a curva do GTT, mas não do ITT. Ainda, nossos estudos de expressão gênica demonstram aumento na expressão do RNAm da *glucose-6-phosphatase (G6pc)* que promove a hidrólise da glicose-6-fosfato, produzindo glicose livre e fosfato que pode retornar ao plasma corrigindo os níveis glicêmicos (van SCHAFTINGEN et al, 2002). Em um dos primeiros estudos publicados demonstrando as ações da leptina sobre a homeostase energética (Pellemounter e cols (1995) demonstraram que a reposição com dose de leptina incapaz de alterar o peso corporal e o consumo e alimento em animais *ob/ob*, foi suficiente para normalizar a glicemia. Posteriormente, foi demonstrado que a reexpressão do *Lepr* também normaliza por completo a glicemia plasmática de animais *db/db*, além de reduzir o consumo de alimento, e não alterar o peso corporal (HUO et al, 2009). Utilizando animais com deficiência reversível da expressão da *Pomc* (*arcPomc^{-/-}*) hipotalâmica, Alsina e cols (2018) demonstraram que deficiência da POMC, não altera a glicemia basal dos animais, mas induz intolerância a glicose e resistência as ações da insulina antes do desenvolvimento de obesidade. Já a inibição específica destes neurônios, por meio do tratamento com 2 injeções ip de CNO no período noturno, promoveu aumento glicêmico em resposta ao tratamento com piruvato (composto que causa hiperglicemia por ativar a gliconeogênese), aumento na expressão de enzimas hepáticas de *G6pc* e *Pck1* (*phosphoenolpyruvate*

carboxykinase) (DODD et al. 2018) e redução da sensibilidade à insulina. Ainda, em animais jejuados e tratados com piruvato, a ativação prolongada, mas não a aguda de neurônios POMC^{ARC} induziu menor glicemia plasmática (DODD et al, 2018). No estudo de Dodd e cols (2018) a glicemia em animais não tratados com piruvato não foi informada e a região rostro-caudal de infecção pelo AAV carreando o DREADD não foi informada. A modulação aguda de neurônios POMC do ARC também não alterou a glicemia em outros estudos que utilizaram animais *Pomc-IRES-Cre::loxSTOPloxhMD3^{Gq}* (STECULORUM et al, 2016). Por outro lado, Ünner e cols (2019) demonstraram que a inibição dos neurônios POMC do ARC, pelo uso da quimiogenética, induziu queda na glicemia plasmática (ÜNER et al, 2019); resultados este que se assemelham aos nosso achados. O aumento na expressão do RNAm da *G6pc* pode contribuir para o aumento da glicemia observado em nosso estudo e esta resposta pode estar associada a heterogeneidade dos neurônios POMC do ARC.

Adicionalmente, observamos redução na expressão do RNAm da *Lpl* e da *Cpt1a* no fígado. Em um estudo realizado por MERKEL et al (1998), foram utilizados animais com a expressão da lipoproteína lipase exclusivamente no fígado e os efeitos desta expressão para o metabolismo energético no período neonatal foram avaliados. Importante destacar que os pesquisadores observaram que animais expressando *Lpl* especificamente no fígado, eram viáveis após nascimento, diferente de animais com deleção completa que morriam aproximadamente 24h após o nascimento. Em comparação aos camundongos controle, animais com expressão de *Lpl* especificamente no fígado apresentaram níveis altos de triglicerídeos e glicose no plasma e acúmulo intracelular de lipídios no fígado (MERKEL et al, 1998). Em situações de estresse metabólico a *Lpl* hepática parece ser importante para captação dos triglicerídeos circulantes (Originários da lipólise do tecido adiposo) pelo fígado, poupando o gasto glicêmico. Tal fenômeno pode ser importante para sustentar a função cerebral e muscular em momentos de redução dos estoques periféricos de energia com disponibilidade limitada de glicose (MERKEL et al, 1998). Contudo, estudos utilizando o GTT e ITT, demonstraram que os camundongos com deleção de *Lpl* no fígado, apresentaram metabolismo normal da glicose (LIU et al, 2016). Adicionalmente, quando alimentados com dieta HFD, estes animais apresentaram intolerância à glicose e resistência à insulina semelhante a observada em animais controle (LIU et al, 2016). Por outro lado, o gene *Cpt1a* codifica a enzima carnitina palmitoiltransferase no fígado, que desempenha função importante para o processo da oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa (SCHAEFER e JOSHI, 2020). Estudos indicam que o déficit da *Cpt1a* acarreta uma diminuição da oxidação mitocondrial dos ácidos graxos de cadeia longa no fígado, e também nos rins,

resultando em hipoglicemia associada a reduzidos níveis circulante de corpos cetônicos e risco de insuficiência hepática (GOBIN et al, 2002; SCHAEFER e JOSHI, 2020). Portanto, a alteração na expressão destes genes no fígado após a ativação dos neurônios POMC do ARC durante o jejum, poderia estar associado a redução na utilização de lipídeos como fonte alternativa de energia, o que por sua vez poderia contribuir apenas para aumento dos triglicerídeos circulantes (não auxiliaria na gliconeogênese), que não foram mensurados no presente estudo.

Em relação aos nossos estudos hormonais, não observamos alteração nas concentrações plasmáticas de corticosterona, leptina e insulina. Considerando as ações destes hormônios sobre o metabolismo energético e da glicose, uma desregulação no padrão de secreção dos mesmos poderia contribuir para a menor perda de peso corporal e maior glicemia observada após a ativação dos neurônios POMC do ARC durante o jejum. De fato, o aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona durante o jejum é importante para alteração na utilização do substrato energético (carboidratos para lipídeos) e ativação da gliconeogênese (SCHWARTZ e SEELEY, 1997; ZHANG et al, 2019) porém, resultados conflitantes podem ser encontrados na literatura em relação aos efeitos de sinalização da melanocortina sobre as concentrações de corticosterona no organismo. Alguns estudos indicam que a ativação dos receptores MC-3 e MC-4 pode diminuir a atividade do eixo HHA (LEE et al, 2007; CRAGNOLININ et al, 2004), mas efeitos opostos já foram evidenciados (FEKETE et al, 2000; LU et al, 2003; CRAGNOLINI et al, 2004). Ainda, existem diversos outros estudos que também observaram resultados conflitantes em relação a sinalização de outros produtos da clivagem da POMC sobre a atividade do eixo HHA (IYENGAR et al, 1986; GUNION et al, 1991; YAMAUCHI et al, 1997).

Em relação a leptina e insulina, já é conhecido que em situações de privação de alimento ocorre uma queda nas concentrações plasmáticas destes hormônios (SCHWARTZ e SEELEY, 1997; MORTON et al, 2006). Esta resposta contribui para a ativação de neurocircuitos que determinam o aumento da procura por alimento e queda na utilização de energia; respostas adaptativas para preservar a integridade do organismo em resposta a esta situação de desafio (MORTON et al, 2006). Ainda, a queda nas concentrações plasmáticas destes hormônios modula de modo direto (insulina) e indireto (leptina via SNC) a produção hepática de glicose (PAZ-FILHO et al, 2012). Recentemente foi demonstrado que a queda nas concentrações plasmáticas de leptina durante o jejum depende da expressão do *Lepr* em neurônios POMC (CARON et al, 2018). Utilizando sistema de deleção gênica de *Lepr* em neurônios POMC durante o desenvolvimento embrionário ou na vida adulta, os pesquisadores observaram o bloqueio da queda das concentrações plasmáticas de leptina e do RNAm de leptina no tecido adiposo

induzido pelo jejum (CARON et al, 2018). Esta resposta esteve associada a modulação da sinalização adrenérgica, via alteração do SNA, no tecido adiposo visceral, a principal fonte de leptina em roedores (TRAYURN et al, 1995). Apesar de não observarmos alteração nas concentrações plasmáticas de leptina entre os diferentes grupos, observamos uma importante tendência ($p=0.08$) de aumento da leptina plasmática após a ativação dos neurônios POMC do ARC durante o jejum. Contudo, acreditamos que esta resposta possa estar mais associada a menor perda de peso corporal, e conseqüentemente de tecido adiposo e leptina, do que um efeito mediado pela ativação neuronal.

6. CONCLUSÃO

A ativação dos neurônios POMC do ARC durante o jejum induziu menor perda de peso e aumento da glicemia. Estes resultados são surpreendentes, considerando as ações anorexígenas e hipoglicemiantes clássicas deste grupamento neuronal, e podem estar relacionados à heterogeneidade desta população de neurônios.

O jejum induz aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona. Por outro lado, a ativação dos neurônios POMC do ARC não interfere com esta resposta, sugerindo que os efeitos farmacológicos induzidos pela modulação da sinalização via MC-3/MC-4 sobre a atividade do eixo HHA devem estar associados a ativação de outra população neuronal produtora de alfa-MSH ou talvez a sinalização via outro ligante para este receptor.

A queda semelhante nas concentrações plasmáticas de leptina e insulina entre os diferentes grupos que receberam administração de CNO, sugere que nesta condição experimental a ativação dos neurônios POMC do ARC não interfere com a secreção destes hormônios.

A ativação dos neurônios POMC do ARC durante o jejum aumentou a expressão do RNAm da *G6pc*, que por sua vez pode ter contribuído para o aumento das concentrações plasmáticas de glicose nestes animais. Adicionalmente, observamos alteração na expressão do RNAm da *Cpt1a* e *Lpl* após a ativação da POMC do ARC durante o jejum, indicando que este grupamento neuronal pode também estar envolvido no controle de genes atuantes no metabolismo de lipídeos.

Apesar de contraditórios, nossos dados destacam o envolvimento deste grupamento neuronal no controle da homeostase energética e da glicose.

REFERÊNCIAS

- ALSINA, R.; TROTTA, M.; BUMASCHNY, V. F. Hypothalamic proopiomelanocortin is necessary for normal glucose homeostasis in female mice. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. SEP, 19 set. 2018.
- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Fundamentos da biologia moderna**. 4^a ed. São Paulo: Moderna, 2006.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- APONTE, Y.; ATASOY, D.; STERNSON, S. M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 351–355, 5 mar. 2011.
- APPLEYARD, S. M. et al. A role for the endogenous opioid β -endorphin in energy homeostasis. **Endocrinology**, v. 144, n. 5, p. 1753–1760, 1 maio 2003.
- ATASOY, D. et al. Deconstruction of a neural circuit for hunger. **Nature**, v. 488, n. 7410, p. 172–177, 11 ago. 2012.
- BALTHASAR, N. et al. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. **Neuron**, v. 42, n. 6, p. 983–991, jun. 2004.
- BELL, B. B. et al. Differential contribution of POMC and AgRP neurons to the regulation of regional autonomic nerve activity by leptin. **Molecular Metabolism**, v. 8, p. 1–12, 1 fev. 2018.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 6. ed. New York, NY: WH Freeman, 2007.
- BERGEN, H. T. et al. Hyperphagia and weight gain after gold-thioglucose: Relation to hypothalamic neuropeptide Y and proopiomelanocortin. **Endocrinology**, v. 139, n. 11, p. 4483–4488, 1 nov. 1998.
- BETLEY, J. N. et al. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. **Cell**, v. 155, n. 6, p. 1337–1350, dez. 2013.
- BOURET, S. G.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 2797–2805, 17 mar. 2004a.
- BOURET, S. G.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 108–110, 2 abr. 2004b.
- CAMPBELL, J. N. et al. A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 484–496, 6 mar. 2017.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica: Volume 3 - Bioquímica Metabólica**. 1. ed. [s.l.] Cengage Learning, 2007.
- CARON, A. et al. POMC neurons expressing leptin receptors coordinate metabolic responses to fasting via suppression of leptin levels. **eLife**, v. 7, 12 mar. 2018.
- CASSIDY, R. M.; TONG, Q. Hunger and satiety gauge reward sensitivity. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. MAY, 18 maio 2017.
- CHALLIS, B. G. et al. Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY3-36. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4695–4700, 30 mar. 2004.
- CONE, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 571–578, 26 maio 2005.
- CRAGNOLINI, A. B. et al. α -MSH and γ -MSH inhibit IL-1 β induced activation of the hypothalamic-

- pituitary-adrenal axis through central melanocortin receptors. **Regulatory Peptides**, v. 122, n. 3, p. 185–190, nov. 2004.
- DODD, G. T. et al. TCPTP regulates insulin signaling in AgRP neurons to coordinate glucose metabolism with feeding. **Diabetes**, v. 67, n. 7, p. 1246–1257, jul. 2018a.
- DODD, G. T. et al. Insulin regulates POMC neuronal plasticity to control glucose metabolism. **eLife**, v. 7, 19 set. 2018b.
- ELMQUIST, J. K. et al. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 493, n. 1, p. 63–71, 5 dez. 2005.
- ERNST, M. B. et al. Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 37, p. 11582–11593, 16 set. 2009.
- FAN, W. et al. The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. **Endocrinology**, v. 141, n. 9, p. 3072–3079, 1 set. 2000.
- FARIA, M. H. G.; MUNIZ, L. R. F.; VASCONCELOS, P. R. L. DE. Ketone bodies metabolism during ischemic and reperfusion brain injuries following bilateral occlusion of common carotid arteries in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 125–129, abr. 2007.
- FEKETE, C. et al. α -Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. **Neuroscience Letters**, v. 289, n. 2, p. 152–156, ago. 2000.
- GHAMARI-LANGROUDI, M. et al. G-protein-independent coupling of MC4R to Kir7.1 in hypothalamic neurons. **Nature**, v. 520, n. 7545, p. 94–98, 19 abr. 2015.
- GOBIN, S. et al. Organization of the human liver carnitine palmitoyltransferase 1 gene (CPT1A) and identification of novel mutations in hypoketotic hypoglycaemia. **Human Genetics**, v. 111, n. 2, p. 179–189, 16 ago. 2002.
- GUNION, M. W. et al. μ -Receptor mediates elevated glucose and corticosterone after third ventricle injection of opioid peptides. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 261, n. 1 30-1, p. R70–R81, 1 jul. 1991.
- HAHN, T. M. et al. Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. **Nature Neuroscience**, v. 1, n. 4, p. 271–272, ago. 1998.
- HANSON, R. W. The role of ATP in metabolism. **Biochemical Education**, v. 17, n. 2, p. 86–92, abr. 1989.
- HARGREAVES, M.; SPRIET, L. **Exercise Metabolism**. 2. ed. [s.l.] Human Kinetics, 2005.
- HENTGES, S. T. et al. Proopiomelanocortin expression in both GABA and glutamate neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 43, p. 13684–13690, 28 out. 2009.
- HOCHGESCHWENDER, U. et al. Altered glucose homeostasis in proopiomelanocortin-null mouse mutants lacking central and peripheral melanocortin. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5194–5202, dez. 2003.
- HUO, L. et al. Leptin-Dependent control of glucose balance and locomotor activity by POMC Neurons. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 6, p. 537–547, jun. 2009.
- IYENGAR, S.; KIM, H. S.; WOOD, P. L. Kappa opiate agonists modulate the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 238, n. 2, p. 429–436, 1986.
- JAIS, A. et al. PNOCARC neurons promote hyperphagia and obesity upon high-fat-diet feeding. **Neuron**,

v. 106, n. 6, p. 1009- 1025.e10, jun. 2020.

KIM, M. S. et al. The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 7, p. 1005–1011, 1 abr. 2000.

KONG, D. et al. GABAergic RIP-Cre neurons in the arcuate nucleus selectively regulate energy expenditure. **Cell**, v. 151, n. 3, p. 645–657, out. 2012.

KRASHES, M. J. et al. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 4, p. 1424–1428, 1 abr. 2011.

LAM, B. Y. H. et al. Heterogeneity of hypothalamic pro-opiomelanocortin-expressing neurons revealed by single-cell RNA sequencing. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 5, p. 383–392, maio 2017.

LEE, M. et al. Transgenic MSH overexpression attenuates the metabolic effects of a high-fat diet. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 1, p. E121–E131, jul. 2007.

LIU, G. et al. Regulation of plasma lipid homeostasis by hepatic lipoprotein lipase in adult mice. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 7, p. 1155–1161, jul. 2016.

LOWELL, B. B. New neuroscience of homeostasis and drives for food, water, and salt. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 5, p. 459–471, 31 jan. 2019.

LU, X. Y. et al. Interaction between α -melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 21, p. 7863–7872, 27 ago. 2003.

LUQUET, S. et al. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 683–685, 28 out. 2005.

MEISTER, B. et al. Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. **Experimental Brain Research**, v. 76, n. 2, p. 343–368, jul. 1989.

MERCER, A. J. et al. Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, n. 7 FEB, 2013.

MERKEL, M. et al. Lipoprotein lipase expression exclusively in liver. A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 5, p. 893–901, 1 set. 1998.

MIZUNO, T. M. et al. Transgenic neuronal expression of Proopiomelanocortin attenuates hyperphagic response to fasting and reverses metabolic impairments in leptin-deficient obese mice. **Diabetes**, v. 52, n. 11, p. 2675–2683, 1 nov. 2003.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289–295, set. 2006.

MURPHY, B. et al. Melanocortin mediated inhibition of feeding behavior in rats. **Neuropeptides**, v. 32, n. 6, p. 491–497, dez. 1998.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. [s.l.] Artmed, 2018.

NEWSHOLME, E. A.; LEECH, A. R. **Biochemistry for the Medical Sciences**. [s.l.] John Wiley and Sons, 1983.

OBICI, S. et al. Central melanocortin receptors regulate insulin action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 7, p. 1079–1085, 1 out. 2001.

PADILLA, S. L.; CARMODY, J. S.; ZELTSER, L. M. Pomc-expressing progenitors give rise to

- antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits. **Nature Medicine**, v. 16, n. 4, p. 403–405, 28 abr. 2010.
- PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. [s.l: s.n.]. v. 2nd Editio
- PAZ-FILHO, G. et al. Leptin therapy, insulin sensitivity, and glucose homeostasis. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 9, p. 549, 2012.
- PELLEYMOUNTER, M. A. et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 540–543, 28 jul. 1995.
- ROTH, B. L. DREADDs for Neuroscientists. **Neuron**, v. 89, n. 4, p. 683–694, fev. 2016.
- SCHWARTZ, M. W. et al. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. **Diabetes**, v. 46, n. 12, p. 2119–2123, dez. 1997.
- SCHWARTZ, M. W.; SEELEY, R. J. Neuroendocrine Responses to Starvation and Weight Loss. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 25, p. 1802–1811, 19 jun. 1997.
- SILVEIRA, L. R. et al. Regulação do metabolismo de glicose e ácido graxo no músculo esquelético durante exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n. 5, p. 303–313, jun. 2011.
- SMALL, C. J. et al. Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. **Diabetes**, v. 50, n. 2, p. 248–254, 1 fev. 2001.
- STECULORUM, S. M. et al. AgRP Neurons Control Systemic Insulin Sensitivity via Myostatin Expression in Brown Adipose Tissue. **Cell**, v. 165, n. 1, p. 125–138, mar. 2016.
- TAKAHASHI, K. A.; CONE, R. D. Fasting induces a large, leptin-dependent increase in the intrinsic action potential frequency of orexigenic arcuate nucleus neuropeptide Y/Agouti-related protein neurons. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1043–1047, mar. 2005.
- TIMPER, K.; BRÜNING, J. C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: Pathways to obesity. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 10, n. 6, p. 679–689, 1 jun. 2017.
- TODA, C. et al. POMC Neurons: From Birth to Death. **Annual Review of Physiology**, v. 79, n. 1, p. 209–236, 10 fev. 2017.
- TRAYHURN, P. et al. Effects of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ob) mice. **FEBS Letters**, v. 368, n. 3, p. 488–490, 24 jul. 1995.
- ÜNER, A. G. et al. Role of POMC and AgRP neuronal activities on glycaemia in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13068, 10 dez. 2019.
- VAN SCHAFTINGEN, E.; GERIN, I. The glucose-6-phosphatase system. **Biochemical Journal**, v. 362, n. 3, p. 513–532, 15 mar. 2002.
- WILLIAMS, G. et al. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: Different circuits, different purposes. **Physiology and Behavior**, v. 74, n. 4–5, p. 683–701, nov. 2001.
- WILLIAMS, K. W. et al. Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 7, p. 2472–2479, 17 fev. 2010.
- XU, J. et al. Genetic identification of leptin neural circuits in energy and glucose homeostases. **Nature**, v. 556, n. 7702, p. 505–509, 18 abr. 2018.
- YAMAUCHI, N. et al. Brain β -endorphin and other opioids are involved in restraint stress- induced stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, the sympathetic nervous system, and the adrenal medulla in the rat. **Brain Research**, v. 777, n. 1–2, p. 140–146, nov. 1997.

YASWEN, L. et al. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. **Nature Medicine**, v. 5, n. 9, p. 1066–1070, 1 set. 1999.

ZHANG, X. et al. Unraveling the regulation of hepatic gluconeogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. JAN, 24 jan. 2019.

ZHANG, X.; VAN DEN POL, A. N. Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 1341–1347, 22 out. 2016.