UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

SABRINA MARA TRISTÃO

PARTICIPAÇÃO DA VIA DA STAT5 EM NEURÔNIOS SF1 DO HIPOTÁLAMO NO CONTROLE DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA

Ribeirão Preto

SABRINA MARA TRISTÃO

PARTICIPAÇÃO DA VIA DA STAT5 EM NEURÔNIOS SF1 DO HIPOTÁLAMO NO CONTROLE DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA

Versão original

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara

Elias

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Tristão, Sabrina Mara

Participação da via da STAT5 em neurônios SF1 do hipotálamo no controle da homeostase energética/ Sabrina Mara Tristão. Ribeirão Preto, 2019.

85pg; 30cm

Dissertação (Mestrado em Fisiologia) — Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

Orientação: Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias

1.Homeostase Energética. 2.STAT5. 3.Leptina. 4.GM-CSF. 5.Neurônios SF1. 6.Núcleo Ventromedial.

FICHA DE APROVAÇÃO

Sabrina Mara Tristão

Participação da via da STAT5 em neurônios SF1 do hipotálamo no controle da homeostase energética

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia.

Aprovado	em:
----------	-----

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr. (a)		
Instituição:		
	Assinatura:	
Prof.(a) Dr. (a)		
	Assinatura:	
Prof.(a) Dr. (a)		
Instituição:		
	Assinatura:	
Prof.(a) Dr. (a)		
Instituição:		
Julgamento:	Assinatura:	

Dedico este trabalho aos meus amados pais, K, Juju, Gustavo e às pequenas Larinha e Malu, por serem a minha base, meu refúgio, meu alento.

À Gabi (in memorian) pela sua luta.

Meu agradecimento especial à Profª. Drª. Kagohara pela Lucila Leico Elias sua orientação, esforços, ética, respeito, conselhos, ajuda e carinho, um grande exemplo de profissional e pessoa que buscarei seguir, e ao Gabriel H. M. Gonçalves por toda ajuda e apoio que tanto contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues por sua paixão e dedicação incansável pelo seu trabalho, por tornar o ambiente de trabalho tão agradável e nos ensinar sempre mais com sua grande experiência. Obrigada pelo exemplo maravilhoso de ser humano e profissional.

Aos colegas e amigos queridos do laboratório, inclusive aos que não mais ali trabalham, pela convivência, companheirismo, e muitas risadas ao longo desses anos, que tornaram o dia a dia mais prazeroso. Em especial, meu agradecimento à Rafaella Volpi, Marcus Celani, Gislaine Almeida e Rodrigo Rorato pelos importantes auxílios com o meu trabalho e à Maria Valci e Milene pela ajuda técnica e pelos vários "quebra galhos" feitos de maneira tão amistosa.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da FMRP pelos ensinamentos e conselhos e aos técnicos da FMRP, em especial ao Rubens Fernando de Melo, pela ajuda e prestatividade.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Fisiologia da FMRP pela atenção, ajuda e educação dispensada a mim sempre que precisei.

Aos bioteristas do Departamento de Clínica Médica da FMRP pelo auxílio com a manutenção e cuidado com os animais.

Aos colegas do Departamento de Fisiologia da FMRP pelas conversas animadas, risadas, auxílio mútuo com os estudos e convivência. Em especial às amigas Andrea Carvalho (agregada) e Susana, por vários momentos de conversas sobre tudo e sobre nada nos almoços diários e de companheirismo no dia a dia.

À minha grande família e amigos de BH, que se fazem tão perto mesmo de longe. À minha amada vó pelo amor e tantas orações.

À minha família paulista Gatto, que me recebe sempre com amor e calor humano e ajuda a colorir os meus dias.

À todos os amigos que tive o prazer de conhecer em São Paulo pelo carinho e alegria que me proporcionam.

Às empresas de fomento CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio à pesquisa.

"A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria"

Tristão, Sabrina Mara. **Participação da via da STAT5 em neurônios SF1 do hipotálamo no controle da homeostase energética.** 85pg. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

RESUMO

A regulação do balanço energético envolve interação de diferentes fatores metabólicos que sinalizam para o sistema nervoso o status energético do organismo. O hipotálamo integra esses sinais de forma coordenada por meio de circuitos neuronais envolvendo diferentes núcleos interconectados, como o núcleo arqueado (ARC), o núcleo paraventricular (PVN), o núcleo dorsomedial (DMH), núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) e a área hipotalâmica lateral (LHA), que regulam o apetite, a saciedade, o gasto energético e a homeostase da glicose. No VMH, há os neurônios que expressam o fator esteroidogênico 1 (SF1), que participa de muitos processos fisiológicos, incluindo a homeostase energética. Relacionado ao balanço energético, a leptina tem ação fundamental reduzindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto de energia. A leptina age no hipotálamo por meio da ligação ao seu receptor, LepR, e promove a fosforilação e ativação da tirosina quinase janus-kinase-2 (JAK2) que, por sua vez, fosforila fatores de transcrição chamados de STATs (transdutor de sinal e ativador da transcrição), como a STAT5, que regulam a expressão dos genes-alvo da leptina. Outros fatores promovem também a ativação de STAT5 em neurônios hipotalâmicos, como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), uma citocina pró-inflamatória. Alguns trabalhos demonstraram que a injeção central de GM-CSF no terceiro ventrículo cerebral diminuiu a ingestão alimentar e o peso corporal em ratos e camundongos, sendo que essa resposta é atenuada em animais com deleção de STAT5 no sistema nervoso central (SNC), indicando um papel da via da STAT5 no SNC na regulação da ingestão de alimentos por meio da ativação pelo GM-CSF. Contudo, a participação da via de sinalização da STAT5 em neurônios SF1 do VMH na homeostase energética ainda não está bem estabelecida. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram investigar a importância da via de sinalização da STAT5 em neurônios SF1 do VMH na homeostase energética, assim como avaliar a participação desta via de sinalização nos efeitos hipofágicos promovidos pelo GM-CSF. Para tanto, utilizamos a metodologia cre-loxP para geração de camundongos com deleção específica de STAT5 em neurônios SF1. Assim, camundongos SF1-cre(cre/+) foram acasalados com camundongos STAT5^{flox/flox}, para obtenção de animais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, com deleção de STAT5 especificamente em neurônios SF1, e animais controles

STAT5^{flox/flox}. Foram avaliados peso corporal, ingestão alimentar, gasto energético, metabolismo glicêmico e concentrações séricas de insulina e leptina, em animais experimentais e controles, machos e fêmeas, tratados com dieta normocalórica ou hiperlipídica. Avaliamos também o peso corporal e a ingestão alimentar dos camundongos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} e STAT5^{flox/flox} machos, tratados com dieta normocalórica e após receberem dose única de GM-CSF (0,5 µg/2 µl) ou veículo (2 µl) intracerebroventricular. Observamos que o peso corporal, a ingestão de alimentos, o gasto energético, o metabolismo glicêmico e os níveis séricos de leptina não se diferiram entre os grupos de animais experimentais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} e seus controles STAT5^{flox/flox}, tanto machos como fêmeas, com dieta regular ou hiperlipídica. Em relação aos parâmetros metabólicos avaliados nos animais machos, após receberem o estímulo com GM-CSF icv, observamos que a citocina induziu a redução da ingestão alimentar somente entre os animais controles STAT5^{flox/flox}. A redução do peso corporal foi maior e mais persistente no grupo de animais controles STAT5^{flox/flox}, quando comparados aos animais experimentais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}. Em conclusão, a deleção da via de sinalização da STAT5 em neurônios SF1 do VMH não afeta a homeostase energética em condições de dieta regular ou obesogênica. Por outro lado, esta via de sinalização participa nas ações do GM-CSF sobre a ingestão alimentar e o peso corporal. A participação da via de sinalização da STAT5 em neurônios SF1 do VMH nos efeitos catabólicos de outras citocinas requer investigação futura.

Palavras-chave: Homeostase Energética. STAT5. Leptina. GM-CSF. Neurônios SF1. Núcleo Ventromedial.

Tristão, Sabrina Mara. Participation of STAT5 pathway in SF1 neurons of the hypothalamus in the control of energy homeostasis. 85pg. Dissertation (Masters) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

ABSTRACT

The regulation of the energy balance involves interaction of different metabolic factors that signal to the nervous system the energy status of the organism. The hypothalamus integrates these signals in a coordinated way through neuronal circuits involving different interconnected nuclei, such as the arcuate nucleus (ARC), the paraventricular nucleus (PVN), the dorsomedial nucleus (DMH), the hypothalamic ventromedial nucleus (VMH) and the lateral hypothalamic area (LHA), which regulate appetite, satiety, energy expenditure and glucose homeostasis. In VMH, there are neurons that express steroidogenic factor 1 (SF1), which participates in many physiological processes, including energetic homeostasis. Related to the energy balance, leptin has a fundamental action reducing food intake and increasing energy expenditure. Leptin acts on the hypothalamus through binding to its receptor, LepR, and promotes the phosphorylation and activation of the janus-kinase-2 tyrosine kinase (JAK2), which in turn phosphorylates transcription factors called STATs (signal transducer and transcriptional activator), such as STAT5, that regulate expression of the target genes of leptin. Other factors also promote the activation of STAT5 in hypothalamic neurons, such as the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), a proinflammatory cytokine. Some studies have shown that the central injection of GM-CSF in the third cerebral ventricle decreased food intake and body weight in rats and mice, and this response is attenuated in animals with STAT5 deletion in the central nervous system (CNS), indicating a role of the STAT5 pathway in the CNS in regulating food intake through GM-CSF activation. However, the participation of the STAT5 signaling pathway in VMH SF1 neurons in energetic homeostasis is still not well established. Thus, the objectives of this work were to investigate the importance of the STAT5 signaling pathway in VMH SF1 neurons in energetic homeostasis, as well as to evaluate the participation of this signaling pathway in the hypophagic effects promoted by GM-CSF. For this, we used the cre-loxP methodology for the generation of mice with specific deletion of STAT5 in SF1 neurons. Thus, SF1-cre(cre/+) mice were mated with STAT5^{flox/flox} mice, to obtain SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} animals, with STAT5 deletion specifically on SF1 neurons, and STAT5^{flox/flox} control animals. Body weight, food intake, energy expenditure, glycemic metabolism and serum insulin and leptin

concentrations were evaluated in experimental and control animals, male and female, treated with normocaloric or hyperlipidic diet. We also evaluated body weight and food intake of SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} and STAT5^{flox/flox} mice, treated with normocaloric diet and after receiving a single dose of GM-CSF (0.5 µg/2 µl) or intracerebroventricular vehicle (2 µl). We observed that body weight, food intake, energy expenditure, glycemic metabolism and serum leptin levels did not differ between groups of experimental animals SF1-cre(cre/+); STAT5^{flox/flox} and its controls STAT5^{flox/flox}, both male and female, on a regular or hyperlipidic diet. Regarding the metabolic parameters evaluated in the male animals, after receiving the stimulation with GM-CSF icv, we observed that the cytokine induced the reduction of food intake only among STAT5^{flox/flox} control animals. The reduction of body weight was greater and more persistent in the group of STAT5^{flox/flox} control animals, when compared to experimental animals SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} . In conclusion, the deletion of the STAT5 signaling pathway in VMH SF1 neurons does not affect energy homeostasis under regular or hyperlipidic dietary conditions. On the other hand, this signaling pathway participates in GM-CSF actions on food intake and body weight. Participation of the STAT5 signaling pathway in VMH SF1 neurons in the catabolic effects of other cytokines requires further investigation.

Key Words: Energy Homeostasis. STAT5. Leptin. GM-CSF. SF1 Neurons. Ventromedial Nucleus.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-MSH: hormônio estimulante de melanócito α

AgRP: peptídeo relacionado ao Agouti

ARC: núcleo arqueado

BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo

CART: transcrito regulado por cocaína e anfetamina

CNTF: fator neurotrófico ciliar

CO2: gás carbônico

CRF: neuropeptídeo liberador de corticotrofina

DMH: núcleo dorsomedial hipotalâmico

ERK: proteína quinase reguladora do sinal extracelular

GABA: ácido gama-aminobutírico

GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e de macrófagos

GM-CSFR: receptor de GM-CSF

GTT: teste de tolerância à glicose

HFD: dieta hiperlipídica

IL: interleucina

IMC: índice de massa corporal

JAK2: janus-kinase-2

LepR: receptor de leptina

LHA: área hipotalâmica lateral

MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos

MC4R: receptor de melanocortina 4

NPY: neuropeptídeo Y

PI3K: proteína fosfatidil inositol-3-kinase

POMC: pró-opiomelanocortina

PVN: núcleo paraventricular

PYY: peptídeo YY

SF1: fator esteroidogênico 1

SH2: domínio de homologia de Src

SHP2: domínio de homologia Src-2

SNC: sistema nervoso central

SOCS3: supressor de sinalização de citocina 3

STATs: transdutores de sinal e ativadores da transcrição

TMB: taxa metabólica basal

TNF: fator de necrose tumoral

VMH: núcleo ventromedial hipotalâmico

VMHdm: subdivisão dorsomedial do VMH

VMHvl: subdivisão ventrolateral do VMH

SUMÁRIO

1.	. INTRODUÇÃO	18
2.	OBJETIVOS	30
	2.1. Objetivo geral	30
	2.2. Objetivos específicos	30
3.	. MATERIAL E MÉTODOS	32
	3.1. Animais	32
	3.2. Protocolos experimentais	32
	3.2.1. Protocolo 1 – Geração de camundongos com deleção específica de STAT5 en	า neurônios
	SF1 do VMH	32
	3.2.2. Protocolo 2 – Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 no pe	so corporal,
	ingestão de alimentos e glicemia em camundongos fêmeas e machos SF1-cre(cre/+);	STAT5 ^{flox/flox}
	com dieta padrão ou após desafio com HFD	33
	3.2.3. Protocolo 3 – Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF	1 no gasto
	energético em camundongos fêmeas e machos SF1-cre ^(cre/+) ; STAT5 ^{flox/flox} com dieta pa	adrão 34
	3.2.4. Protocolo 4 — Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 na	colerância a
	glicose (GTT) em camundongos fêmeas e machos SF1-cre ^(cre/+) ; STAT5 ^{flox/flox} com dieta	padrão . 34
	3.2.5. Protocolo 5 – Efeitos da administração central de GM-CSF no peso corporal e	ingestão de
	alimentos em camundongos machos SF1-cre ^(cre/+) ; STAT5 ^{flox/flox} com dieta padrão	35
	3.3. Procedimentos Experimentais	35
	3.3.1. Gasto energético	35
	3.3.2. Teste de Tolerância a Glicose	36
	3.3.3. Coleta de sangue	36
	3.3.4. Canulação intracerebroventricular	36
	3.3.5. Administração central de GM-CSF	37
	3.3.6. Perfusão Cerebral	37
	3.4. Métodos Laboratoriais	38
	3.4.1. Genotipagem dos camundongos SF1-cre ^(cre/+) ; STAT5 ^{flox/flox}	38
	3.4.2. Imunofluorescência para p-STAT5	39
	3.4.3. Dosagens Hormonais	40
	3.4.4. Análise Estatística	40
	PEG. 11 TA P. 0.0	40

	4.1. Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 em camundongos fêmeas e machos
	no peso corporal e ingestão de alimentos com dieta padrão ou após desafio com HFD 42
	4.2. Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 em camundongos fêmeas e machos
	no consumo de O_2 , produção de CO_2 e de calor com dieta padrão
	4.3. Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 em camundongos fêmeas e machos
	na glicemia com dieta padrão ou após desafio com HFD
	4.4. Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 em camundongos fêmeas e machos
	na resposta aos testes de tolerância à glicose com dieta padrão
	4.5. Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 em camundongos fêmeas e machos
	nos níveis séricos de leptina e insulina com dieta padrão ou após desafio com HFD 56
	4.6. Efeitos da administração de dose única de GM-CSF sobre o peso corporal e ingestão de
	alimentos em camundongos machos SF1-cre $^{(cre/+)}$; STAT5 $^{flox/flox}$ e seus controles, com dieta padrão
	58
	$\textbf{4.7. Efeitos do tratamento com leptina ip em camundongos SF1-cre} (cre^{(cre/+)}; STAT5^{flox/flox} e STAT5^{flox/flox})$
	sobre a imunoexpressão de p-STAT5 no VMH
5.	DISCUSSÃO
6.	SUMÁRIO E CONCLUSÃO
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é um distúrbio metabólico considerado uma epidemia mundial, presente tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Emergiu como uma epidemia em países desenvolvidos durante o final do século XX e, atualmente, é uma questão preocupante que atinge todo o mundo e afeta indivíduos de todos os níveis socioeconômicos (POPKIN, DOAK, 1998). A obesidade, definida pelo índice de massa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m², resulta do acúmulo de adiposidade devido ao consumo e armazenamento de calorias em excesso às necessidades metabólicas (PAN, MYERS JR, 2018). É um fenômeno resultante da ação de fatores, como hábitos alimentares e atividade física, sobre indivíduos geneticamente predispostos a apresentar excesso de tecido adiposo (POPKIN, DOAK, 1998).

A maioria da população mundial vive em países onde o excesso de peso e a obesidade matam mais pessoas do que a decorrência de baixo peso (WHO, 2018). Dados de 2018 da Organização Mundial da Saúde mostram que a obesidade mundial quase triplicou, desde 1975. Em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos, com 18 anos ou mais, apresentavam excesso de peso. Destes, mais de 650 milhões eram obesos (WHO, 2018). Essa tendência é preocupante, pois o IMC de 30 kg/m² está associado a taxas de morbidade significativamente aumentadas, tais como diabetes mellitus (BELL, KIVIMAKI, HAMER, 2014) e doença arterial coronariana (MONGRAW-CHAFFIN *et al.*, 2015), e de mortalidade (BELL, KIVIMAKI, HAMER, 2014; AUNE *et al.*, 2016; GLOBAL BMIMC *et al.*, 2016).

Pode-se afirmar que as tendências de transição nutricional ocorrida no século passado em diferentes países do mundo convergem para uma dieta mais rica em lipídeos, particularmente os de origem animal, açúcares e alimentos industrializados, e reduzida em carboidratos complexos e fibras, também conhecida como "dieta ocidental" (MONTEIRO et al., 1995). Aliando esse fator com o declínio progressivo da atividade física dos indivíduos, ocorrem alterações concomitantes na composição corporal, principalmente o aumento do tecido adiposo. No caso do Brasil, estudos comprovam que essa transição nos padrões relacionando-os com mudanças demográficas, socioeconômicas nutricionais. epidemiológicas ao longo do tempo, estão refletindo na diminuição progressiva da desnutrição e no aumento da obesidade (MONTEIRO et al., 1995). Dados da Global Burden of Disease, de 2013, apontam que 10 países concentram mais de 50% dos obesos do mundo. O Brasil, neste cenário, ocupa a quinta posição, ficando atrás dos Estados Unidos, China, Índia e Rússia e seguido por México, Egito, Alemanha e Paquistão (MARIE et al. 2014). Uma pesquisa do Ministério da Saúde de 2006 indicou que a prevalência de obesidade na população brasileira acima de 18 anos residente nas capitais era igual a 12%. Em 2016, segundo essa mesma fonte de dados, esse percentual aumentou para 19%, ou seja, um crescimento de 60% em uma década. Nesse período, foi registrado um aumento de 61,8% nos casos de diabetes no país (BRASIL, 2017).

A obesidade não é uma doença singular e, sim, um grupo heterogêneo de condições com múltiplas causas que, em última análise, resultam no fenótipo de obesidade (FRANCISCHI *et al.*, 2000). Há evidências sugerindo forte influência genética no desenvolvimento da obesidade, mas seus mecanismos ainda não estão esclarecidos (FRANCISCHI *et al.*, 2000). Acredita-se que esses fatores possam estar relacionados ao consumo e gasto energético e à ingestão alimentar. Há evidências de que o componente genético atua sobre o gasto energético, em especial sobre a taxa metabólica basal (TMB) (BARON, 1995; GRUNDY, 1998), a qual é determinada principalmente pela quantidade de massa magra (HILL, DROUGAS, PETERS, 1993; JEBB, 1997).

Devido à sua etiologia multifatorial, é difícil estabelecer a contribuição de cada uma das variáveis envolvidas no processo do ganho excessivo de peso (BERNARDI, CICHELERO, VITOLO, 2005). O controle de energia consumida está baseado em um conjunto de interações que formam a neurobiologia do comportamento alimentar, envolvendo o apetite, os processos fisiológicos e metabólicos, e o sistema nervoso (BERNARDI, CICHELERO, VITOLO, 2005). Certo número de desordens endócrinas também pode conduzir à obesidade como, por exemplo, lesões no hipotálamo (FRANCISCHI *et al.*, 2000). Outros problemas dessa mesma origem incluem o excesso endógeno e exógeno de corticoesteróides, hipogonadismo em homens e mulheres, e a síndrome do ovário policístico (BARON, 1995; JEBB, 1997).

O cérebro regula a homeostase energética em resposta a sinais do tecido adiposo e do trato gastrointestinal (STANLEY et al., 2005). A maioria das pessoas mantém um peso corporal e adiposidade estável em longo prazo, como consequência dos sistemas homeostáticos que servem para contrabalançar as flutuações no consumo e dispêndio de energia (PAN, MYERS JR, 2018). Distúrbios deste mecanismo homeostático levam à obesidade e suas complicações associadas. A compreensão dos sistemas fisiológicos que regem a ingestão de alimentos e o peso corporal é fundamental para estabelecer terapias eficazes para o tratamento da obesidade (STANLEY et al., 2005).

O hipotálamo é essencial para a regulação do apetite e do balanço energético (STANLEY *et al.*, 2005). No hipotálamo existem duas importantes regiões, lateral e

ventromedial, que regulam a homeostase energética a partir da atividade endócrina, autonômica e do controle do dispêndio e armazenamento de energia de forma coordenada (BERTHOUD, 2006). A área hipotalâmica lateral (LHA) é responsável pela regulação da alimentação e o núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) tem função primordial no controle da ingestão alimentar (NAGAMINE et al., 2003; KING, 2006). Hetherington e Ranson (1940) e Anand e Brobeck (1951) propuseram pela primeira vez um modelo experimental que evidenciou a participação específica do hipotálamo no controle da ingestão alimentar e do peso corporal. Assim, estes autores demonstraram que a lesão bilateral da LHA em ratos causava hipofagia e perda de peso, enquanto a lesão do VMH resultava em obesidade. Além dessas regiões, o hipotálamo contém outros núcleos envolvidos no controle da ingestão alimentar, como o núcleo arqueado (ARC), o núcleo paraventricular (PVN) e o núcleo dorsomedial (DMH) (OLNEY, 1969). Lesões no ARC, induzidas pela utilização de glutamato monossódico, por exemplo, provocam um quadro de obesidade e hiperfagia. Da mesma forma, lesões mais dorsais no PVN também levam à hiperfagia e ganho de peso (OLNEY, 1969). Assim, algumas regiões morfologicamente bem definidas do hipotálamo desempenham um importante papel na regulação do peso corporal e na função endócrina. No entanto, em vez de núcleos hipotalâmicos específicos, circuitos neuronais são apontados como responsáveis pelo controle da homeostase energética, por meio de sinalizações utilizando neuropeptídeos específicos (STANLEY et al., 2005).

O ARC desempenha um papel fundamental na integração de sinais que regulam o apetite. Situado lateralmente à base do terceiro ventrículo cerebral e superior à eminência mediana, os neurônios do ARC respondem aos sinais hormonais circulantes, como leptina e insulina, já que é uma região desprovida de barreira hematoencefálica (BROADWELL, BRIGHTMAN, 1976) e mais rapidamente acessível a fatores de circulação (nutrientes, hormônios etc) do que outras áreas do cérebro (FLAK, MYERS JR, 2016).

O ARC apresenta dois grandes grupos de neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos envolvidos na regulação da ingestão alimentar (MAIOR, 2012). Os neuropeptídeos orexígenos, que estimulam a ingestão alimentar, são o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado à Agouti (AgRP) (um antagonista endógeno dos receptores de melanocortina). Os neuropeptídeos anorexígenos, que reduzem a ingestão alimentar, são a pró-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (CART) (GRILL, 2006). A ação dos hormônios que potencializam o efeito anorexígeno no sistema nervoso central (SNC) ocorre a partir da ativação de neurônios no ARC que expressam a POMC, cuja clivagem resulta na formação do hormônio estimulador de melanócito alfa (α-MSH). Este

neuropeptídeo se liga aos receptores da melanocortina4 (MC4R), expressos em neurônios do PVN e LHA, promovendo a redução da ingestão alimentar (WOODS *et al.*, 1998; GRILL, 2006; MORTON *et al.*, 2006) e é importante na integração de informações do status energético, a partir de fatores periféricos como a insulina e leptina (COWLEY *et al.*, 2001). O aumento da expressão do CART no ARC também é responsável pela inibição da ingestão alimentar (GRILL, 2006; MORTON *et al.*, 2006).

Por outro lado, os hormônios que potencializam o efeito orexígeno, como a grelina, contribuem com o balanço energético positivo por aumentar a ativação dos neurônios NPY/AgRP que se opõem aos efeitos da ativação dos neurônios POMC (WOODS *et al.*, 1998; GRILL, 2006; MORTON *et al.*, 2006). Estes efeitos estão relacionados à inibição dos neurônios do PVN que expressam o neuropeptídeo liberador de corticotrofina (CRF), que possui potente função anorexígena (GRILL, 2006; MORTON *et al.*, 2006). Além disso, neurônios NPY liberam o ácido gama-aminobutírico (GABA) inibindo neurônios POMC adjacentes (STANLEY *et al.*, 2005). Contrariamente, a LHA expressa a orexina que exerce função orexigênica (GRILL, 2006; MORTON *et al.*, 2006). Assim, com a liberação de orexina, há aumento da resposta excitatória para os neurônios NPY/AgRP e inibição dos neurônios POMC/CART (GRILL, 2006; MORTON *et al.*, 2006).

O VMH compreende um grupamento de células hipotalâmicas localizado próximo à base do diencéfalo, adjacente ao terceiro ventrículo acima da eminência mediana. Tem sido conhecido por desempenhar um papel na homeostase energética desde a constatação de que lesões bilaterais neste núcleo induzem hiperfagia e obesidade, como mencionado anteriormente (STANLEY et al., 2005). O VMH recebe projeções de neurônios do ARC -NPY, AgRP e POMC – e, por sua vez, os neurônios do VMH projetam-se para regiões dos núcleos hipotalâmicos LHA e DMH e do tronco cerebral (STANLEY et al., 2005). Adicionalmente, recebe aferências provenientes do tronco encefálico (núcleo parabraquial e núcleo do trato solitário) e da amígdala (HUANG et al., 2003). A expressão de neuropeptídeos no VMH é modulada pelo estado nutricional. Os animais submetidos à privação alimentar apresentam elevada produção de peptídeos orexígenos (GUAN, YU, VAN DER PLOEG, 1998) e aumento na expressão de receptores MC4R no VMH de ratos obesos induzidos pela dieta (HUANG et al., 2003). O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é altamente expresso no VMH. A expressão de BDNF no VMH é regulada pela privação de alimento e após a administração de agonistas de melanocortina em camundongos (XU et al., 2003). Camundongos com expressão reduzida de receptor para BDNF ou redução de expressão de BDNF, apresentam um aumento na ingestão alimentar e no peso corporal (RIOS *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2003). Portanto, os neurônios que expressam BDNF no VMH podem atuar como uma via adicional na regulação da ingestão de alimento e do balanço energético através da modulação do sistema de melanocortina.

O VMH possui vários tipos de células com padrões heterogêneos de expressão gênica. Um destes genes, o fator esteroidogênico1 (SF1) é um fator de transcrição necessário para a diferenciação terminal deste núcleo, além de participar de vários processos fisiológicos mediados pelo VMH, incluindo a homeostase energética (MAJDIC *et al.*, 2002; SEGAL *et al.*, 2005; KURRASCH *et al.*, 2007). No SNC, o SF1 é exclusivamente expresso no VMH (DHILLON *et al.*, 2006). A sua expressão em tecidos periféricos é verificada na adrenal e gônadas (PARKER, SCHIMMER, 1997). Camundongos *Knockout* para o gene SF1 possuem desenvolvimento anormal do VMH e são obesos (DELLOVADE *et al.*, 2000; MAJDIC *et al.*, 2002). Neurônios SF1 são importantes para a homeostase energética, principalmente por modular o gasto energético, especialmente em condições com dieta hiperlipídica (KIM *et al.*, 2011). Essa importância foi constatada em estudos usando camundongos com deleção específica de SF1 no VMH, em que o SF1 foi deletado após o completo desenvolvimento do VMH (KIM *et al.*, 2011).

Durante o jejum ocorre o aumento da atividade dos neurônios NPY/AgRP do ARC, os quais são estimulados a partir da elevação da secreção do hormônio grelina. Com a ingestão alimentar, ocorre o aumento dos hormônios leptina, insulina e peptídeo YY (PYY), que elevam a produção do α-MSH, consequentemente, opondo-se à atividade dos neurônios NPY/AgRP (GRILL, 2006; MORTON *et al.*, 2006). A leptina é um hormônio peptídico de 16 kDa composto por 146 aminoácidos, sintetizado e secretado principalmente pelas células do tecido adiposo branco (FRIEDMAN, HALAAS, 1998; STANLEY *et al.*, 2005). Produto do gene *Lep*, a leptina circula de acordo com a proporção de reserva energética disponível em forma de tecido adiposo, sendo um sinal anorexígeno de longo prazo, e possui diversas funções, como metabólicas e neuroendócrinas (BROBERGER, 2005; FARR, GAVRIELI, MANTZOROS, 2015).

A perda da ação da leptina provoca uma resposta fisiológica extensa, aumentando a demanda por alimento, diminuindo a saciedade e alterando uma série de sistemas neuroendócrinos e autonômicos para diminuir o gasto energético (AHIMA *et al.*, 1996). Além dos efeitos na regulação da homeostase energética, a redução de leptina inibe o desenvolvimento do eixo reprodutivo, bem como diminui a taxa metabólica geral pela redução do tônus simpático e da função tireoidiana. A diminuição da ação da leptina também promove aumento da produção de glicose hepática enquanto diminui a captação de glicose no

músculo (SCHWARTZ et al., 2000). Além disso, baixos níveis de leptina modificam uma variedade de sistemas cerebrais que alteram o humor e o comportamento, por exemplo, aumentando a motivação e ansiedade (FLAK, MYERS JR, 2016). A administração exógena de leptina, central ou periférica, reduz a ingestão alimentar, enquanto a administração crônica resulta também na perda de peso (STANLEY et al., 2005). Camundongos modificados geneticamente com deleção do gene *Lep*, resultando em deficiência completa de leptina, apresentaram fenótipo de obesidade grave, hiperfagia, diabetes, alterações neuroendócrinas e infertilidade. No entanto, quando tratados exogenamente com leptina, o quadro de obesidade foi revertido (HALAAS et al., 1995; CAMPFIELD et al., 1995; PELLEYMOUNTER et al., 1995; MORTON, MEEK, SCHWARTZ, 2014; DE GIT, ADAN, 2015).

A ação da leptina se dá via um receptor de domínio transmembrana da família de receptores de citocinas (TARTAGLIA et al., 1995), o receptor de leptina LepR. O LepR é altamente expresso em áreas do cérebro conhecidas por ser importantes no controle da ingestão e gasto energético, como no ARC, DMH e VMH (FLAK, MYERS JR, 2016). Há cinco isoformas do receptor da leptina (LepRa/e), resultantes de splicing alternativo do mRNA e do processamento pós-tradução, porém somente o receptor LepRb, receptor de citocina do tipo I da família dos receptores da IL-6, que possui um longo domínio intracelular, é capaz de transmitir o sinal de ligação com a leptina para dentro da célula (TARTAGLIA et al., 1995). A leptina age via células que expressam LepR no cérebro para controlar o balanço de energia, e os neurônios parecem formar a maioria, se não todas, células que expressam LepR no cérebro (PAN, MYERS, 2018). Os receptores de leptina são muito expressos no núcleo arqueado, mas o hipotálamo ventromedial e dorsomedial, a área hipotalâmica lateral e a área pré-óptica medial também são alvos da leptina para a regulação da homeostase energética (FRIEDMAS, HALAAS, 1998; WOODS et al., 1998; STANLEY et al., 2005; KING, 2006).

Uma vez produzida no tecido adiposo, a leptina entra na circulação sanguínea e é transportada ligada ao seu receptor solúvel (LepRe) para os órgãos alvo (MAFFEI *et al.*, 1995). A interação da leptina com seu receptor se dá no contexto dos neurônios produtores de neuropeptídeos e neurotransmissores orexígenos ou anorexígenos. Particularmente, a leptina age de modo conspícuo nos neurônios do ARC que expressam os neuropeptídeos NPY, AgRP, POMC e CART; a leptina suprime a atividade dos neurônios que produzem NPY/AGRP (efeito orexígeno) e estimula a atividade de neurônios produtores de POMC ou CART (efeito anorexígeno) (SCHWARTZ *et al.*, 2000).

A sinalização intracelular relacionada à leptina, da mesma forma que para as citocinas, ocorre por mecanismos de fosforilação, ativação da proteína *janus-kinase-2* (JAK2) e de fatores de transcrição chamados de STATs (transdutor de sinal e ativador da transcrição). Após fosforilação e dimerização, estes se translocam para o núcleo celular, regulando a expressão dos genes-alvo da leptina (HEGYI *et al.*, 2004). A JAK2 é uma tirosina quinase associada ao receptor da leptina e sua ativação representa um passo crucial, pois o LepRb não possui atividade enzimática intrínseca (TARTAGLIA, 1997; KLOEK *et al.*, 2002). Além de promover a autofosforilação de JAK2, a ativação desta proteína estimula a fosforilação de múltiplos resíduos no domínio intracelular de LepRb: Tyr985, Tyr1077 e Tyr1138 (GONG *et al.*, 2007). A fosforilação destes resíduos de tirosina recruta, assim, um conjunto distinto de proteínas efetoras contendo o domínio de homologia de Src (SH2). Atualmente sabe-se que a leptina é capaz de ativar a sinalização celular por outros mecanismos, como pela ativação da proteína fosfatidil inositol-3-kinase (PI3K) – um ponto de convergência (*cross-talk*) entre a sinalização da leptina e da insulina (HEGYI *et al.*, 2004) – e da MAPK, entre outras.

Em cultura de células, o resíduo Tyr₉₈₅ fosforilado recruta a proteína fosfatase contendo o domínio de homologia Src-2 (SHP2) para mediar o primeiro passo na ativação da cascata de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) (BANKS *et al.*, 2000; BJØRBAEK *et al.*, 2001; GONG *et al.*, 2007). O resíduo Tyr₉₈₅ fosforilado liga-se também ao supressor de sinalização de citocina3 (SOCS3), que atua como um regulador negativo do LepRb (BJØRBAEK *et al.*, 2000). A estimulação da via da ERK pela leptina também pode ocorrer pela interação direta com a JAK2, também dependente de SHP2 (BJØRBAEK *et al.*, 1999). Camundongos portadores de uma mutação no resíduo Tyr₉₈₅ mostram um fenótipo magro com sensibilidade exagerada à leptina (BJÖRNHOLM *et al.*, 2007). Adicionalmente, os animais mutantes para LepRb Tyr₉₈₅ apresentam função neuroendócrina normal. Assim, *in vivo*, o papel principal do Tyr₉₈₅ parece estar na atenuação da sinalização de LepRb, presumivelmente por meio da alça de *feedback* mediada por SOCS3. Mudanças na expressão de SOCS3 têm sido postuladas como um dos possíveis mecanismos que explicam o fenômeno da resistência à leptina (MÜNZBERG *et al.*, 2005).

Tyr₁₁₃₈ recruta o transdutor de sinal e ativador da transcrição-3 (STAT3), um fator de transcrição latente que se torna, então, fosforilado, dimeriza-se e se transloca para o núcleo e medeia a regulação da expressão gênica (WHITE *et al.*, 1997; BANKS *et al.*, 2000). Camundongos *knockout* para STAT3 no SNC e camundongos com mutação no resíduo Tyr₁₁₃₈, apresentam diminuição do gasto energético e hiperfagia, tornando-se assim obesos (BATES *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2007). Esse fato mostra o importante papel da STAT3 no

controle da ingestão alimentar e do gasto energético. Ademais, a sinalização Tyr₁₁₃₈-STAT3 promove a expressão de SOCS3, que atenua a sinalização de LepRb (BJØRBAEK *et al.*, 1999; BJØRBAEK *et al.*, 2000; GONG *et al.*, 2007).

Por fim, a fosforilação do resíduo Tyr₁₀₇₇ promove o recrutamento, a fosforilação da tirosina e a ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição-5 (STAT5), embora Tyr₁₁₃₈ também possa desempenhar um papel menor na regulação da fosforilação de STAT5 (HEKERMAN *et al.*, 2005; GONG *et al.*, 2007). STAT5 foi descrito pela primeira vez como um fator de transcrição presente na glândula mamária, induzido por prolactina, que era necessário para a expressão da proteína de leite β-caseína (WAKAO, GOUILLEUX, GRONER, 1994). A ativação de STAT5 é importante para a regulação de várias funções celulares, como proliferação celular, diferenciação e apoptose, dentre outras (GRIMLEY, DONG, RUI, 1999). Muitas espécies, incluindo primatas e roedores, apresentam dois genes, *Stat5a* e *Stat5b*, que codificam as proteínas STAT5a e STAT5b, respectivamente (GRIMLEY, DONG, RUI, 1999). Estas proteínas partilham 90-95% de identidade de aminoácidos e suas funções parecem ser hormônio e tecido específicos (TEGLUND *et al.*, 1998; GRIMLEY, DONG, RUI, 1999).

O papel específico das proteínas STAT5 tem sido estudado em vários tecidos. STAT5a é necessário para o desenvolvimento da glândula mamária adulta e lactogênese (LIU et al., 1997). No cérebro, a sinalização STAT5b tem sido implicada no controle da secreção hormonal. Por exemplo, camundongos deficientes em STAT5b exibem hiperprolactinemia e defeitos no feedback negativo da prolactina sobre neurônios dopaminérgicos da via tuberoinfundibular (GRATTAN et al., 2001; MA et al., 2005). Os níveis de mRNA de somatostatina são significativamente reduzidos no sistema periventricular de camundongos deficientes em STAT5b indicando comprometimento na retroalimentação negativa do hipotálamo (BENNETT et al., 2005).

Dados da literatura revelaram que a leptina promove a fosforilação e a localização nuclear de STAT5 em células dentro de áreas do hipotálamo conhecidas por regularem a alimentação e o balanço de energia, incluindo os núcleos hipotalâmicos dorsomedial e ventromedial e o LHA (LEE *et al.*, 2008), mostrando que a leptina ativa STAT5 *in vivo*. Também foi demonstrado em cultura de células – células HEK293, COS, HIT-T15 e RIN-M5F – que a sinalização de LepRb-STAT5 pode contribuir para a ação fisiológica da leptina e representa um potencial papel para o STAT5 na homeostase energética (GHILARDI *et al.*, 1996; HEKERMAN *et al.*, 2005; GONG *et al.*, 2007). A participação da STAT5 no controle do balanço energético foi demonstrada em camundongos com deleção de STAT5 no SNC, por

meio da metodologia cre-loxP, em que os animais apresentaram obesidade grave com hiperfagia, desregulação da termogênese em resposta ao frio, hiperleptinemia e resistência à insulina (LEE et al., 2008). Estes efeitos foram possivelmente causados pela falta da ativação da STAT5 induzida por leptina. Contudo, uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, incluindo hormônio de crescimento, prolactina, eritropoetina, fator estimulador de colônias de granulócitos e de macrófagos (GM-CSF) e outros promovem a fosforilação e a ativação transcricional de STAT5 em neurônios hipotalâmicos (LEE et al., 2008), constituindo um dos mecanismos de regulação da ingestão alimentar e homeostase energética. Assim, Lee et al. (2008) sugeriram que a falta de resposta a outras citocinas anorexigênicas que também recrutam a via de sinalização STAT5 pode ter contribuído para o comportamento de hiperfagia dos camundongos STAT5 com deleção de STAT5 especificamente no cérebro. Por exemplo, os autores demonstraram que a redução da ingestão de alimentos observada após a injeção central de GM-CSF está ausente nos camundongos com deleção de STAT5 especificamente no cérebro. Portanto, ainda não está claro se a obesidade desses camundongos reflete o papel de STAT5 na ação da leptina in vivo, já que outros fatores, além da leptina, podem ativar STAT5.

O GM-CSF é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos de células incluindo macrófagos, mastócitos, células T, fibroblastos e células endoteliais (COUSINS, STAYNOV, LEE, 1994; NIMER, UCHIDA, 1995), principalmente em resposta à ativação imune e ao estímulo com citocinas que medeiam a inflamação. Está presente no soro e na maioria dos tecidos, e é também encontrado associado com a matriz extracelular (FARRAR et al., 1990). O GM-CSF induz a diferenciação da linhagem mielóide de células hematopoiéticas (GOUGH et al., 1984; DRANOFF et al., 1994). Ele também promove a maturação e outras funções celulares das células da linhagem mielóide, particularmente as de granulócitos e macrófagos (METCALF et al., 1987; WOGNUM et al., 1994). O GM-CSF é um potente fator quimiotático para macrófagos e outras células imunes e induz a expressão de moléculas de adesão celular, incluindo CD11a e CD11c (PAINE et al., 2001). O GM-CSF também regula positivamente o fator de necrose tumoral (TNF) – α e a expressão gênica da interleucina (IL)-1β e é ainda induzida por TNF- α e IL-1β em células imunes infiltradas num local de inflamação (SEELENTAG et al., 1987; HERBELIN, MACHAVOINE, DY, 1990; VLAHOS et al., 2006). Receptores de GM-CSF foram identificados em cérebros fetais e neurônios isolados e em estudos in vitro de isolados oligodendrócitos e astrócitos (SAWADA et al., 1993; BALDWIN et al., 1993; BROSNAN et al., 1993; DAME, CHRISTENSEN, JUUL, 1999). Reed e colaborados (2005) indentificaram, por meio da técnica de imunofluorescência, que os receptores de GM-CSF eram mais proeminente detectáveis no ARC e PVN, ambos com papéis proeminentes no controle do equilíbrio energético (Reed *et al.*, 2005).

As atividades biológicas do GM-CSF são exercidas através da sua ligação a receptores heteroméricos de superfície celular que são expressos em monócitos, macrófagos, granulócitos, linfócitos, células endoteliais e células epiteliais alveolares (GRIFFIN *et al.*, 1990). O receptor de GM-CSF (GM-CSFR) é composto por cadeias α (CDw116; GM-CSFRα) e β (GM-CSFRβc). A cadeia βc é comum aos receptores para GM-CSF, IL-3, e IL-5 (MIYAJIMA, 1992) e se associa constitutivamente com JAK2. A ligação de GM-CSF ao ser receptor inicia a autofosforilação de JAK2 e sinalização pós- receptores. JAK2 então ativa STAT5 e a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (JENKINS, BLAKE, GONDA, 1998; DIJKERS *et al.*, 1999).

Em estudos anteriores, verificou-se que os receptores de GM-CSF são encontrados em neurônios hipotalâmicos como nos neurônios do ARC e PVN de forma mais proeminente (REED *et al.*, 2005). Injeção central de uma única dose de GM-CSF no terceiro ventrículo cerebral diminuiu a ingestão alimentar e do peso corporal em ratos e camundongos sem causar doença (REED *et al.*, 2005). Camundongos com deleção do *locus* GM-CSF tinham o peso corporal aumentado com aumento de duas a três vezes na massa adiposa (REED *et al.*, 2005). Tomados em conjunto, estes dados indicam um papel importante do GM-CSF na regulação central da ingestão de alimentos e conteúdo corporal de tecido adiposo.

Outra observação da literatura é a de que o efeito hipofágico do GM-CSF é atenuado em animais com deleção de STAT5 no SNC, mostrando que pelo menos uma parte do fenótipo destes animais segue muito provavelmente mecanismos independentes de leptina (LEE et al., 2008). Além disso, a deleção de STAT5 no SNC não altera a expressão de mRNA dos alvos conhecidos da leptina dentro do ARC, sugerindo que outros genes devem representar os principais alvos transcricionais do STAT5 na regulação do balanço energético (VILLANUEVA, MYERS, 2008). Em suma, um importante efeito metabólico do GM-CSF é a sua capacidade de atuar no SNC para regular a ingestão de alimentos e adiposidade corporal. Esse efeito parece ser o resultado de ações sobre os receptores GM-CSF em núcleos hipotalâmicos chave e a habilidade de ativar a sinalização mediada por STAT5 (LEE et al., 2008).

Tendo em vista os aspectos discutidos em relação à leptina e seus mecanismos de ação no controle energético, em especial o fato da via de sinalização da STAT5 para as funções cerebrais ainda ser mal compreendida, torna-se relevante estudar a importância dessa via em neurônios SF1 do VMH nos efeitos anorexígenos e de redução de peso corporal. Além disso,

considerando-se que o GM-CSF também apresenta ações na regulação do peso corporal e ingestão alimentar e que seus efeitos são mediados pela via da STAT5, o presente trabalho busca investigar, ainda, a participação desta via em neurônios SF1 do VMH nos efeitos desta citocina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a importância da via de sinalização da STAT5, mediada pelo hormônio leptina e pela citocina GM-CSF, na homeostase energética, em neurônios SF1 do VMH.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o peso corporal e ingestão alimentar em camundongos machos e fêmeas com deleção de STAT5 em neurônios SF1 do VMH com dieta padrão e dieta hiperlipídica.
- Avaliar o gasto energético em camundongos machos e fêmeas com deleção de STAT5 em neurônios SF1 do VMH com dieta padrão
- Avaliar a tolerância à glicose em camundongos machos e fêmeas com deleção de STAT5 em neurônios SF1 do VMH com dieta padrão.
- Avaliar a sensibilidade à citocina GM-CSF por meio do peso corporal e da ingestão alimentar em camundongos machos com deleção de STAT5 em neurônios SF1 do VMH após administração central da citocina GM-CSF.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

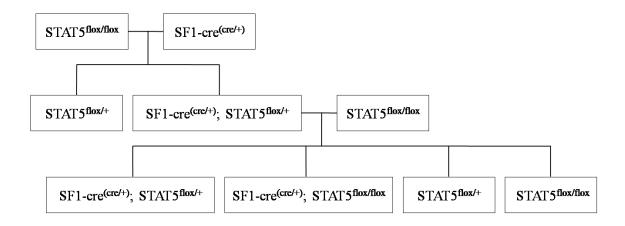
Foram utilizados camundongos de linhagem C57BL-6 adultos provenientes do Biotério Central do *Campus* de Ribeirão Preto – USP e camundongos geneticamente modificados (camundongos SF1-cre e STAT5^{flox/flox}), fornecidos gentilmente pelo Professor Dr. José Donato Júnior (ICB-USP). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento da Clínica Médica da FMRP-USP, em caixas individuais, ambiente com temperatura controlada de 23 ± 2°C, sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12/12 horas (período de luz: 06:00 h às 18:00 h), com livre acesso à água e ração. Os animais tiveram o peso corporal monitorado durante todo o período de experimentação. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP que segue as normas do "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" publicado por *US National Institutes of Health* (NIH, Publication N° 85-23, revisado em 1996) e com a legislação brasileira para experimentação animal, sob protocolo 38/2017.

3.2. Protocolos experimentais

3.2.1. Protocolo 1 — Geração de camundongos com deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 do VMH

Inicialmente, camundongos STAT5^{flox/flox} foram acasalados com camundongos SF1-cre^(cre/+) para a obtenção de animais STAT5^{flox/+} e SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/+}, na proporção de 50% para cada genótipo (Figura 1). Então, os camundongos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/+} foram selecionados e acasalados com camundongos STAT5^{flox/flox} para a obtenção de camundongos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} e STAT5^{flox/+}, na proporção de 25% para cada genótipo. Alguns dos animais com genótipo SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/+} foram utilizados para a manutenção das matrizes. Os demais animais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/+} e os animais STAT5^{flox/+} foram eutanasiados por meio do método de inalação de CO₂. Já os camundongos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} foram utilizados como

animais de estudo e os camundongos STAT5^{flox/flox} foram utilizados como animais controles. Animais da mesma ninhada foram usados para o estudo.



Camundongos SF1-cre(cre/+); STAT5flox/flox: animais de estudo

Camundongos STAT5^{flox/flox}: animais controles

Figura 1. Acasalamentos para obtenção de animais de estudo SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} e controles STAT5^{flox/flox}.

3.2.2. Protocolo 2 – Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 no peso corporal, ingestão de alimentos e glicemia em camundongos fêmeas e machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} com dieta padrão ou após desafio com HFD

Após o desmame, com três semanas de idade, camundongos fêmeas e machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} e seus controles, STAT5^{flox/flox}, foram colocados em caixas individuais com dieta regular ou HFD e água *ad libitum*.

Grupos (n=7):

Fêmeas e machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} com dieta padrão

Fêmeas e machos STAT5^{flox/flox} (Controle) com dieta padrão

Fêmeas e machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} com HFD

Fêmeas e machos STAT5^{flox/flox} (Controle) com HFD

O peso corporal e a média da ingestão de alimentos foram avaliados uma vez por semana até a 16^a semana. A glicemia foi avaliada na 8^a, 12^a e 16^a semanas. Na 16^a semana, os animais foram expostos previamente a ambiente com CO₂ e decapitados e o sangue foi coletado para dosagens hormonais de leptina e insulina.

3.2.3. Protocolo 3 – Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 no gasto energético em camundongos fêmeas e machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} com dieta padrão

Após o desmame, com três semanas de idade, camundongos fêmeas e machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} e seus controles, STAT5^{flox/flox}, foram colocados em caixas individuais com dieta regular e água *ad libitum*.

Grupos (n=5):

Fêmeas e machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} com dieta padrão

Fêmeas e machos STAT5^{flox/flox} (Controle) com dieta padrão

Entre a 17^a e a 20^a semana, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas (2 dias para adaptação e 1 dia de registro) para avaliação do gasto energético. Após a coleta de dados na gaiola metabólica, os animais foram eutanasiados por meio de inalação de CO₂.

3.2.4. Protocolo 4 — Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 na tolerância a glicose (GTT) em camundongos fêmeas e machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} com dieta padrão

Após o desmame, com três semanas de idade, camundongos fêmeas e machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} e seus controles, STAT5^{flox/flox}, foram colocados em caixas coletivas (três animais por caixa) até a 10^a semana, com dieta regular e água *ad libitum*.

Grupo (n=5):

Fêmeas e machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} com dieta padrão

Machos STAT5^{flox/flox} (Controle) com dieta padrão

Grupo (n=6):

Fêmeas STAT5^{flox/flox} (Controle) com dieta padrão

Na 11ª semana os camundongos foram colocados em caixas individuais e, após adaptação de três dias, foi realizado o GTT. O teste foi realizado após jejum prévio de 12 horas. Durante este período (10ª – 11ª semanas) foram avaliados o peso corporal e a ingestão alimentar. Para realização do GTT foram utilizados apenas os animais com pesos similares. Após o GTT, os animais foram eutanasiados por meio do método de inalação de CO₂.

35

3.2.5. Protocolo 5 – Efeitos da administração central de GM-CSF no peso corporal e

ingestão de alimentos em camundongos machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} com

dieta padrão

Após o desmame, com três semanas de idade, camundongos machos SF1-cre(cre/+);

STAT5^{flox/flox} e seus controles, STAT5^{flox/flox}, foram colocados em caixas individuais com

dieta regular e água ad libitum.

Grupos (n=7):

Machos SF1-cre(cre/+); STAT5flox/flox

Machos STAT5^{flox/flox} (Controle)

Animais com 18 semanas de idade, em média, tiveram o peso corporal e a média da

ingestão de alimentos avaliados por três dias consecutivos. Posteriormente, os animais foram

submetidos à canulação do ventrículo lateral direito, como descrito abaixo. Após os

procedimentos cirúrgicos, o peso corporal e a média da ingestão alimentar foram avaliados

diariamente durante 5 ou 6 dias até a recuperação após a cirurgia. Ao final desse período,

administrou-se uma dose de 0,5 µg/2µl de GM-CSF CSF ou veículo (2 µl) no ventrículo

lateral direito dos camundongos acordados. Por fim, A ingestão alimentar foi aferida 5, 7, 17,

27, 41 e 51 horas após a injeção da citocina/veículo, e o peso corporal foi aferido 17, 27, 41 e

51 horas após a injeção da citocina/veículo. Após os procedimentos citados, os animais foram

eutanasiados por meio do método de inalação de CO₂.

3.3. Procedimentos Experimentais

3.3.1. Gasto energético

O gasto energético foi avaliado pelo método de calorimetria indireta, pela avaliação do

consumo de O2, liberação de CO2 e produção de calor usando a gaiola metabólica da

Columbus Instruments. Os animais foram aclimatados por 48h, individualmente, na gaiola

metabólica antes da coleta dos dados. Eles tiveram livre acesso à água e ração durante todo o

procedimento.

36

3.3.2. Teste de Tolerância a Glicose

Após 12 horas de jejum, foi administrado glicose (0,75 mg/kg, intraperitoneal) em animais com 11 semanas de idade. A glicemia, então, foi avaliada 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose, pela coleta de uma pequena quantidade de sangue da caudal dos animais.

3.3.3. Coleta de sangue

Os animais foram decapitados após cerca de 30 segundos de exposição ao CO₂ e o sangue do tronco foi coletado em tubos contendo heparina, sobre o gelo. Para se obter o plasma, o sangue foi centrifugado por 20 minutos, 3.000 rotações/min, a 4°C e, posteriormente, estocado a -20°C, até o momento das dosagens hormonais de leptina e insulina.

3.3.4. Canulação intracerebroventricular

Os camundongos com 18 semanas de idade, em média, e com o peso compreendido entre 20-30 gramas, foram submetidos à cirurgia estereotáxica, após 1 semana de ambientalização em caixas individuais com dieta regular e água *ad libitum*. Para a realização da cirurgia, os animais foram anestesiados com administração intraperitoneal de ketamina (75 mg/Kg) e xilazina (16 mg/Kg) e, após a confirmação da ausência de reflexos dolorosos, foram posicionados no aparelho estereotáxico.

Por meio de uma incisão sagital na linha mediana da cabeça, o bregma e o lambda foram expostos e ajustados para ficarem no mesmo plano horizontal. O ponto de cruzamento entre as suturas sagital e coronal foi marcado e, assim, uma cânula de 10 mm foi implantada no ventrículo lateral direito segundo as coordenadas (PAXINOS, WATSON, 1998):

Ântero-posterior: 0,1 mm posterior ao bregma

Látero-láteral; 1,0 mm à direita do bregma

Vertical: 2,5 mm a partir da superfície da calota craniana.

A fixação da cânula à calota craniana do animal foi feita por meio do emprego de polímero acrílico dental. Além disso, um parafuso de aço inoxidável foi também fixado –

entre o bregma e o lambda – para oferecer uma maior superfície de adesão ao material acrílico. Os animais receberam uma dose profilática do antibiótico Pentabiótico (Penicilina benzatina/Procaína, 10 Estreptomicina), por via intramuscular (quadríceps), 50 μl, bilateralmente e fizeram uso de Dipirona, 200 mg/kg por via IP, cada 12 horas, por 24 horas.

3.3.5. Administração central de GM-CSF

Após cirurgia estereotáxica, os animais foram colocados em gaiolas individuais e o peso corporal e a ingestão de alimentos foram avaliados diariamente até o quinto ou sexto dia, período em que os camundongos já haviam restabelecido o peso corporal mensurado no dia da implementação das cânulas. Nesse período, também, os animais foram manipulados diariamente e os procedimentos a serem adotados no dia da injeção da droga ou veículo foram simulados. No dia do experimento, entre 14h00min-14h30min, o peso dos animais foi aferido e retirou-se a ração das gaiolas. Após 1 hora, iniciaram-se os procedimentos de injeção, utilizando uma seringa Hamilton de 10 μl acoplada a uma cânula de polietileno PE 10 que, por sua vez, era acoplado a uma agulha gengival que foi introduzida na cânula. O uso da cânula de polietileno, incorporado às cânulas dos animais, permitiram que as injeções fossem realizadas com os animais despertos, sem a necessidade de anestesiar ou conter o animal, e de modo a manter sua livre atividade na gaiola durante a injeção. Foram administrados 2 μl de veículo (albumina 0,1% em PBS 1X) ou GM-CSF – concentração de 0,5 μg/2μl. A injeção icv foi realizada lentamente, na velocidade de 1 μl por minuto.

Entre duas horas e meia e três horas após injeção icv de veículo ou GM-CSF, a ração dos animais, previamente pesada, foi reapresentada. A ingestão alimentar foi, então, aferida 2, 4, 14, 24, 38 e 48 horas após a reapresentação da dieta e o peso foi aferido 14, 24, 38 e 48 horas após a reapresentação da dieta.

3.3.6. Perfusão Cerebral

Os animais foram anestesiados com administração intraperitoneal de ketamina (75mg/Kg) e xilazina (16mg/Kg) e, após a confirmação da ausência de reflexos dolorosos, foram submetidos à perfusão cerebral. Para tal, foi feito uma incisão no abdômen e tórax, na superfície ventral, de forma que o coração fosse exposto. Foi feito, então, uma incisão no

38

ápice do ventrículo esquerdo por onde se introduziu uma agulha até a saída da aorta e uma

incisão no átrio direito, que permitiu a saída do sangue e da solução de perfusão durante o

procedimento. A perfusão iniciou-se com a infusão de solução de cloreto de sódio 0,9% por

aproximadamente 1 minuto, seguida da infusão de formalina a 10%, por aproximadamente 5

minutos. Os encéfalos foram recolhidos e colocados em tubos falcon com solução de

formalina a 10% e mantido a 4°C por 4 horas. Por fim, foram colocados em tubos falcon com

tampão fosfato salina (PBS) contendo 30% de sacarose e armazenados em geladeira a 4°C.

3.4. Métodos Laboratoriais

3.4.1. Genotipagem dos camundongos SF1-cre(cre/+); STAT5flox/flox

Com aproximadamente 10 dias de vida, cada filhote recebeu uma marca na orelha

(utilizando um furador) e um número. Em seguida, foi retirado um fragmento

(aproximadamente 5mm) da cauda de cada camundongo e este foi mantido em eppendorf

numerado estéril em freezer a -20°C. Foi feito a extração do DNA da cauda dos camundongos

utilizando o Kit REDE-extract-N-AmpTissue PCR Kit (Sigma Aldrich Biotechnology) e

posterior realização de PCR, como descrito abaixo.

Reação de PCR para amplificação de SF1-cre: a reação de PCR para amplificação do gene

controle consistiu na adição de 5µl do Mix REDE-extract -N-Amp PCR, 1,56µl de água

estéril, 0,6µl dos *primers* e 0,24µl de MgCl₂ 50 mM. Para amplificação do transgene, a reação

consistiu na adição de 5µl do Mix REDE-extract –N-Amp PCR, 1,8µl de água estéril e 0,6µl

dos *primers*.

SF1-cre:

OIMR6243 - CTG AGC TGC AGC GCA GGG ACA T- Transgene

OIMR6244 - TGC GAA CCT CAT CAC TCG TTG CAT - Transgene

OIMR8744 - CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG - Controle

OIMR8745 - GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT - Controle

Tamanho das bandas esperadas: Controle: 200pb

Transgene: 250pb

39

Reação de PCR para amplificação de STAT5^{flox}: a reação de PCR para amplificação do transgene e gene controle consistiu na adição de 5μl do Mix REDE-extract –N-Amp PCR, 1,2μl de água estéril e 0,6μl dos *primers*.

STAT5flox:

11221 - GAA AGC ATG AAA GGG TTG GAG

11222 - AGC AGC AAC CAG AGG ACT AC

P3 - AAG TTA TCT CGA GTT AGT CAG G

Tamanho das bandas esperadas: Selvagem: 450pb

STAT5^{flox} homozigoto: 200pb

STAT5^{flox} heterozigoto: 200 pb e 450 bp

3.4.2. Imunofluorescência para p-STAT5

Cortes encefálicos coronais de 30µm dos animais perfundidos foram feitos, utilizando o criostato, e preservados em freezer a -20°C em solução anticongelante. Os cortes foram feitos nas regiões hipotalâmicas do VMH e ARC, em triplicata, sendo que para o procedimento da imunofluoresncência, foi utilizado apenas um em cada três cortes. As lavagens dos cortes foram feitas com TRIS 1X, sendo que os cortes foram incubados nas soluções, tempos e temperaturas seguintes: 1) solução contendo metanol a 90% e peróxido de hidrogênio a 10% por 10 minutos, à temperatura ambiente; 2) TRIS 1X + soro normal de cavalo + triton X 100 (0,4%), por 1 hora, à temperatura ambiente; 3) anticorpo primário (Tabela 1) diluído em TRIS 1X + soro normal de cavalo + triton X 100 (0,4%), por 48 horas, a 4°C; 4) anticorpo secundário (Tabela 1) diluído em TRIS 1X + soro normal de cavalo + triton X 100 (0,4%), por 1 hora, à temperatura ambiente. Os cortes foram montados em lâminas e observados ao microscópio confocal e as imagens foram analisadas pelo software ImageJ-Fiji.

Tabela 1: Anticorpos utilizados para a imunofluorescência

	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
p-STAT5	Rabbit anti-p-STAT5 (Cell	Alexa fluor 488 donkey anti rabbit
	Signaling Technology) [1:200]	(Molecular Probes-A21206) [1:500]

3.4.3. Dosagens Hormonais

As dosagens hormonais de insulina e leptina foram realizadas com Kits de ensaio de imunoadsorção ligado à enzima – ELISA (EZRMI-13K; EZRL-83K; Sigma-Aldrich Biotechnology; Merck KGaA)

3.4.4. Análise Estatística

Os dados foram apresentados como médias ± erro padrão da média (EPM). O nível de significância adotado foi de p≤0.05. As análises foram feitas pala análise de variância (ANOVA) *one-way* ou *two-way*, seguida do pós-teste de Bonferroni.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 em camundongos fêmeas e machos no peso corporal e ingestão de alimentos com dieta padrão ou após desafio com HFD

A média dos valores do peso corporal (g) de fêmeas durante 13 semanas de tratamento com dieta padrão e a média da ingestão acumulada (g) dos mesmos animais durante 12 semanas de tratamento com dieta padrão estão apresentadas na figura 2. Durante os períodos de tratamento, os valores do peso e da ingestão dos grupos de animais experimentais, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, e seus controles, STAT5^{flox/flox}, não se diferiram.

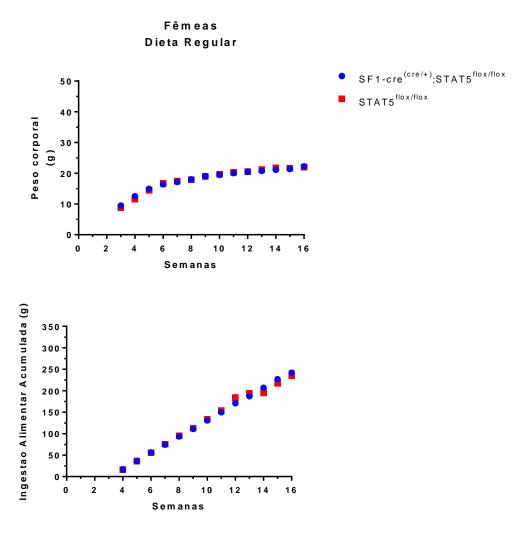
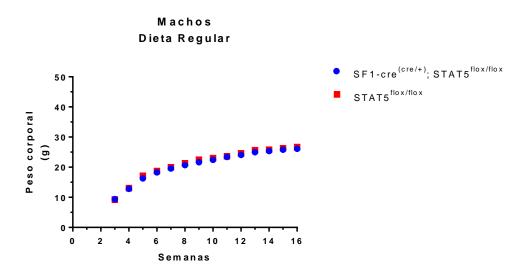


Figura 2. Peso corporal (média \pm EPM) – painel superior – e ingestão alimentar acumulada (média \pm EPM) – painel inferior – de camundongos fêmeas SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 8) e STAT5^{flox/flox} (n = 7), tratados com dieta regular.

A figura 3 apresenta a média dos valores do peso corporal (g) de machos durante 13 semanas de tratamento com dieta padrão e a média da ingestão acumulada (g) dos mesmos animais durante 12 semanas de tratamento com dieta padrão. Durante os períodos de tratamento, os valores do peso e da ingestão dos grupos de animais experimentais, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, e seus controles, STAT5^{flox/flox}, não se diferiram.



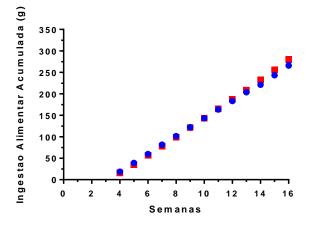
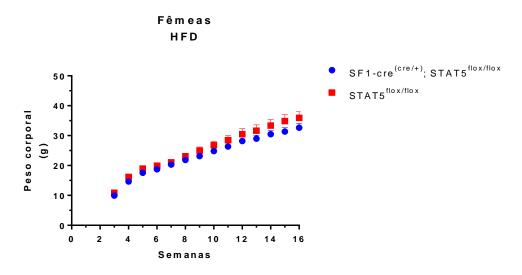


Figura 3. Peso corporal (média \pm EPM) – painel superior – e ingestão alimentar acumulada (média \pm EPM) – painel inferior – de camundongos machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 8) e STAT5^{flox/flox} (n = 7), tratados com dieta regular.

A média dos valores do peso corporal (g) de fêmeas durante 13 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica e a média da ingestão acumulada (g) dos mesmos animais durante 12 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica estão apresentadas na figura 4. Durante os períodos de experimentação, os valores do peso corporal e da ingestão dos animais dos grupos experimentais, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, e seus controles, STAT5^{flox/flox}, não se diferiram.



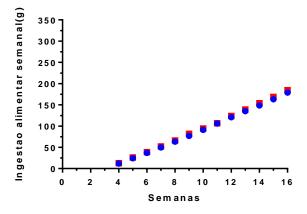
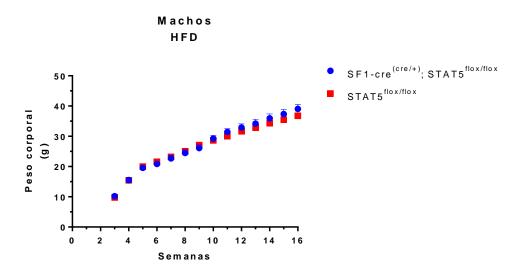


Figura 4. Peso corporal (média \pm EPM) – painel superior – e ingestão alimentar acumulada (média \pm EPM) – painel inferior – de camundongos fêmeas SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 7) e STAT5^{flox/flox} (n = 7), tratados com dieta hiperlipídica.

A figura 5 apresenta a média dos valores do peso corporal (g) de machos durante 13 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica e a média da ingestão acumulada (g) dos mesmos animais durante 12 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica. Durante os períodos de tratamento, os valores do peso e da ingestão dos grupos de animais experimentais, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, e seus controles, STAT5^{flox/flox}, não se diferiram.



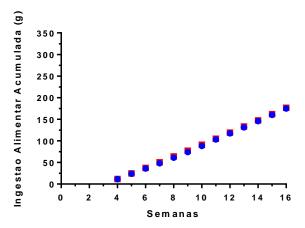


Figura 5. Peso corporal (média \pm EPM) – painel superior – e ingestão alimentar acumulada (média \pm EPM) – painel inferior – de camundongos machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 7) e STAT5^{flox/flox} (n = 8), tratados com dieta hiperlipídica.

4.2. Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 em camundongos fêmeas e machos no consumo de O2, produção de CO2 e de calor com dieta padrão

Os valores médios do consumo de oxigênio dos camundongos fêmeas durante o período de 24 horas estão apresentados na figura 6. O consumo de oxigênio foi maior no período de escuro, tanto nos animais controles, STAT5^{flox/flox}, como nos experimentais, SF1-cre^(cre/+);STAT5^{flox/flox}. Dentre os grupos, a diferença de consumo de oxigênio, um parâmetro para se avaliar o gasto energético, não foi significativa.

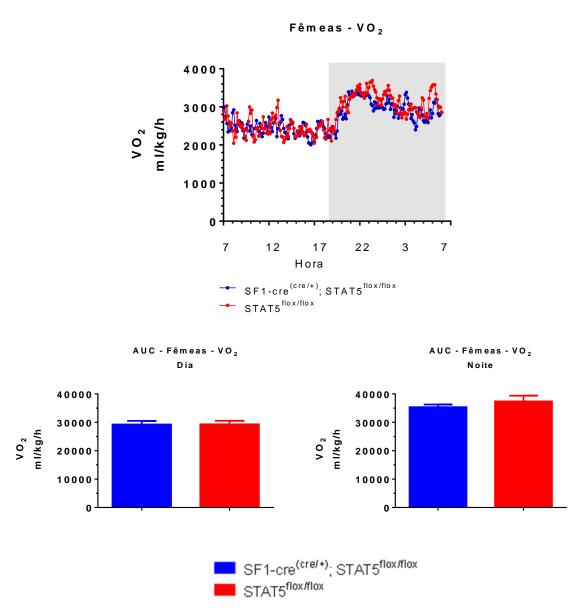
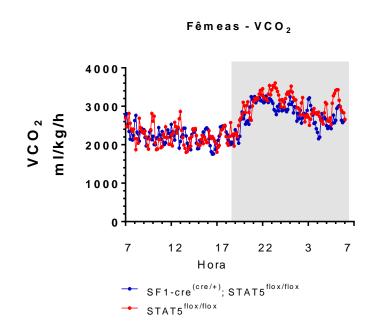


Figura 6. Valores médios (\pm EPM) de VO₂ (painel superior) e respectivas áreas sob a curva diurna (painel inferior à esquerda) e noturna (painel inferior à direita) de camundongos fêmeas SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 5) e STAT5^{flox/flox} (n = 5), tratados com dieta regular.

Na figura 7 são apresentados os valores médios da produção de gás carbônico dos camundongos fêmeas durante o período de 24 horas. Os valores de VCO₂ foram maiores no período de escuro, tanto nos animais controles, STAT5^{flox/flox}, como nos experimentais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}. Dentre os grupos, a diferença da produção de gás carbônico, outro parâmetro para se avaliar o gasto energético, não foi significativa.



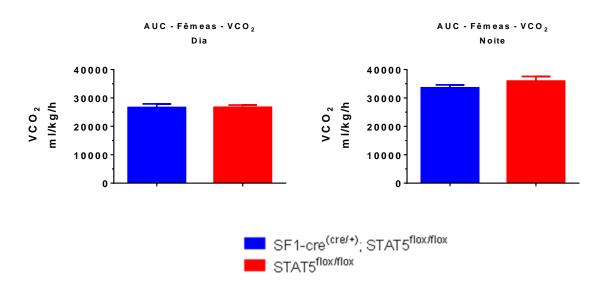
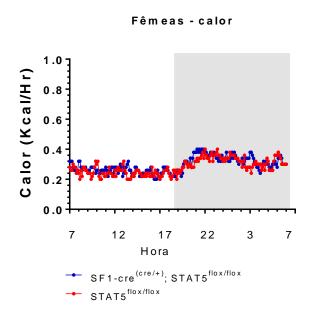


Figura 7. Valores médios (\pm EPM) de VCO₂ (painel superior) e respectivas áreas sob a curva diurna (painel inferior à esquerda) e noturna (painel inferior à direita) de camundongos fêmeas SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 5) e STAT5^{flox/flox} (n = 5), tratados com dieta regular.

Na figura 8 são apresentados os valores médios da produção de calor dos camundongos fêmeas durante o período de 24 horas. Dentre os grupos, a diferença de produção de calor, outro parâmetro para se avaliar o gasto energético, não foi significativa.



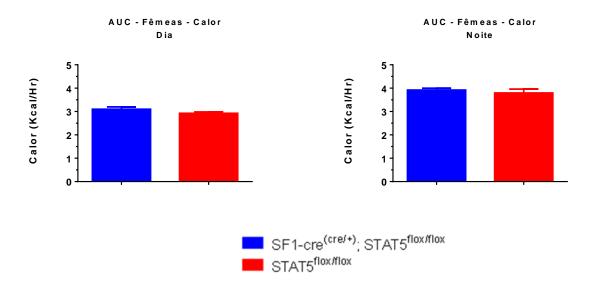
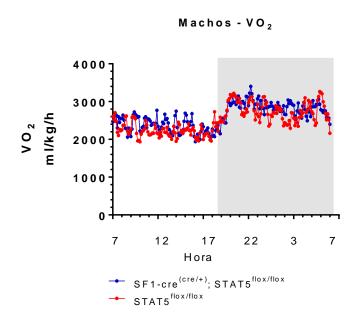


Figura 8. Valores médios (\pm EPM) de produção de calor (painel superior) e respectivas áreas sob a curva diurna (painel inferior à esquerda) e noturna (painel inferior à direita) de camundongos fêmeas SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 5) e STAT5^{flox/flox} (n = 5), tratados com dieta regular.

Na figura 9 são apresentados os valores médios do consumo de oxigênio dos camundongos machos durante o período de 24 horas. O consumo de oxigênio foi maior no período de escuro, tanto nos animais controles, STAT5^{flox/flox}, como nos experimentais SF1-cre^(cre/+);STAT5^{flox/flox}. Dentre os grupos, não houve diferença no consumo de oxigênio.



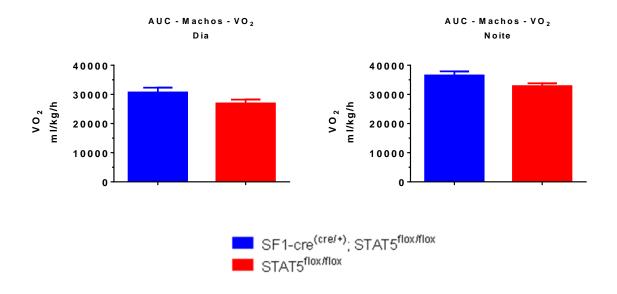
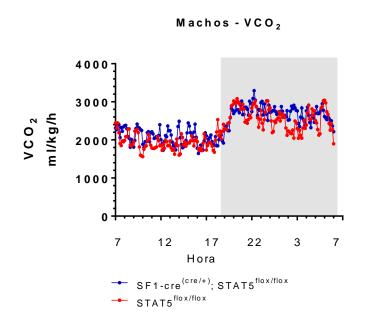


Figura 9. Valores médios (\pm EPM) de VO₂ (painel superior) e respectivas áreas sob a curva diurna (painel inferior à esquerda) e noturna (painel inferior à direita) de camundongos machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 6) e STAT5^{flox/flox} (n = 5), tratados com dieta regular.

Na figura 10 são apresentados os valores médios da produção de gás carbônico dos camundongos machos durante o período de 24 horas. Os valores de VCO₂ foram maiores no período de escuro, tanto nos animais controles, STAT5^{flox/flox}, como nos experimentais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}. Dentre os grupos, não houve diferença na produção de gás carbônico.



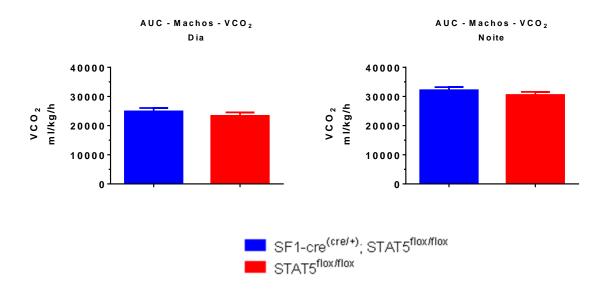
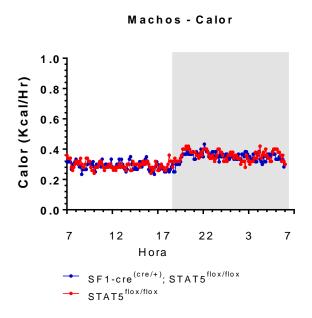


Figura 10. Valores médios (\pm EPM) de VCO₂ (painel superior) e respectivas áreas sob a curva diurna (painel inferior à esquerda) e noturna (painel inferior à direita) de camundongos machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 6) e STAT5^{flox/flox} (n = 5), tratados com dieta regular.

Os valores médios da produção de calor dos camundongos machos durante o período de 24 horas são apresentados na figura 11. Dentre os grupos, a diferença de produção de calor não foi significativa.



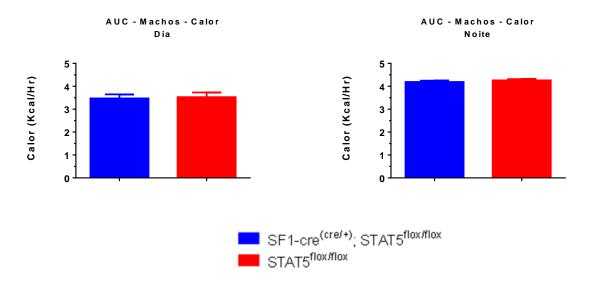


Figura 11. Valores médios (\pm EPM) de produção de calor (painel superior) e respectivas áreas sob a curva diurna (painel inferior à esquerda) e noturna (painel inferior à direita) de camundongos machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 6) e STAT5^{flox/flox} (n = 5), tratados com dieta regular.

4.3. Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 em camundongos fêmeas e machos na glicemia com dieta padrão ou após desafio com HFD

A figura 12 apresenta os valores médios da glicemia basal dos camundongos fêmeas e machos medida na oitava, décima segunda e décima sexta semana de vida dos animais tratados com dieta padrão. Os valores não tiveram diferenças significativas, nos períodos de análise, entre os grupos de animais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, e seus controles, STAT5^{flox/flox}.

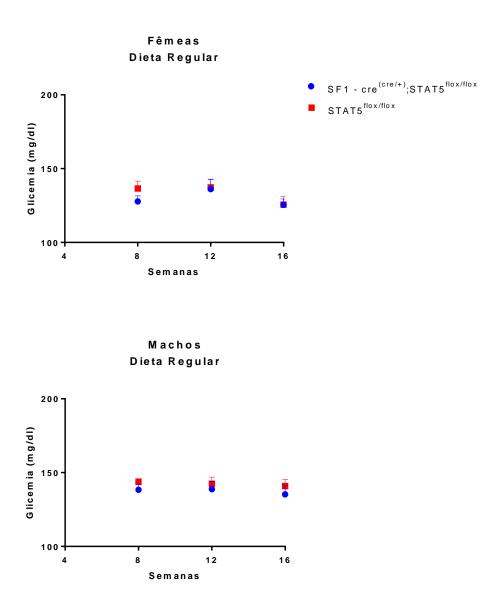


Figura 12. Valores médios (\pm EPM) da glicemia basal de camundongos fêmeas (painel superior) e machos (painel inferior) SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 8) e STAT5^{flox/flox} (n = 7), tratados com dieta regular.

A figura 13 apresenta os valores médios da glicemia basal dos camundongos fêmeas e machos medida na oitava, décima segunda e décima sexta semana de vida dos animais tratados com dieta hiperlipídica. Os valores não tiveram diferenças significativas, nos períodos de análise, entre os grupos de animais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, e seus controles, STAT5^{flox/flox}.

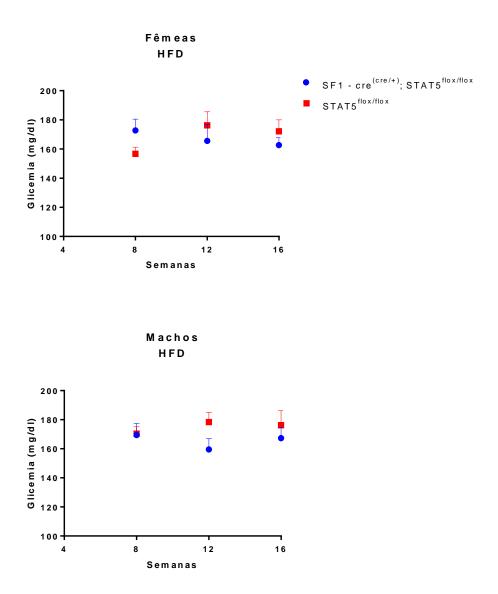


Figura 13. Valores médios (\pm EPM) da glicemia basal de camundongos fêmeas (painel superior) SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 7) e STAT5^{flox/flox} (n = 7) e machos (painel inferior) SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 7) e STAT5^{flox/flox} (n = 8), tratados com dieta hiperlipídica.

4.4. Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 em camundongos fêmeas e machos na resposta aos testes de tolerância à glicose com dieta padrão

A média da glicemia durante o teste de tolerância à glicose de camundongos fêmeas, tratados com dieta regular, é mostrada na figura 14. Os resultados, obtidos durante os minutos 30, 60, 90 e 120, não mostraram diferenças entre os grupos de animais com deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 do VMH e seus controles.

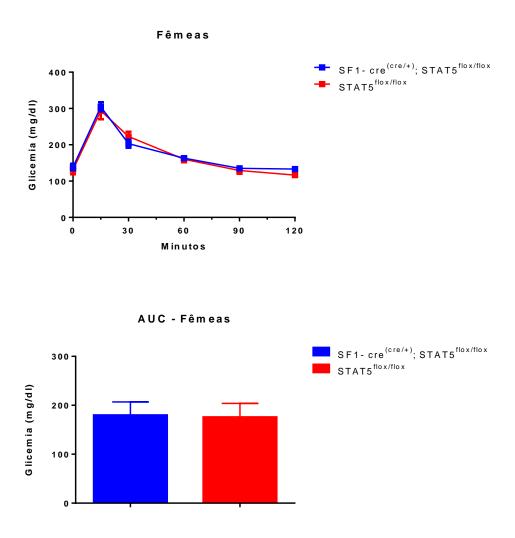


Figura 14. Valores médios (\pm EPM) da glicemia durante o teste de tolerância à glicose (painel superior) e respectivas áreas sob a curva (painel inferior) de camundongos fêmeas SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 5) e STAT5^{flox/flox} (n = 6), tratados com dieta regular.

A média da glicemia durante o teste de tolerância à glicose de camundongos machos, tratados com dieta regular, é mostrada na figura 15. Os resultados, obtidos durante os minutos 30, 60, 90 e 120, não mostraram diferenças entre os grupos de animais com deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 do VMH e seus controles.

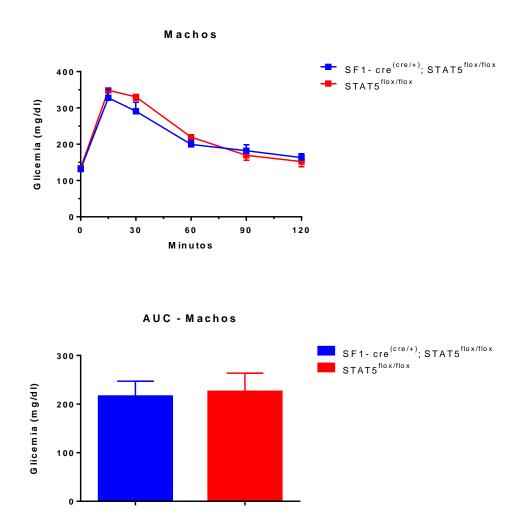


Figura 15. Valores médios (\pm EPM) da glicemia durante o teste de tolerância à glicose (painel superior) e respectivas áreas sob a curva (painel inferior) de camundongos machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 5) e STAT5^{flox/flox} (n = 5), tratados com dieta regular.

4.5. Efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios SF1 em camundongos fêmeas e machos nos níveis séricos de leptina e insulina com dieta padrão ou após desafio com HFD

As concentrações séricas de leptina são apresentadas na figura 16. Conforme demonstrado, não houve diferença estatística entre os grupos de animais experimentais, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, e o grupo de animais controles, STAT5^{flox/flox}, independente do sexo e do tipo da dieta. Observamos que os valores de leptina sérica foram maiores no grupo de animais tratados com dieta hiperlipídica, quando comparados ao grupo tratado com dieta padrão, tanto no animais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, como nos STAT5^{flox/flox}.

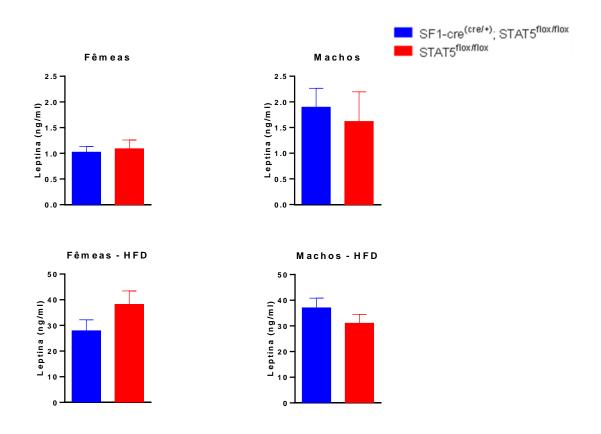


Figura 16. Concentração sérica de leptina (média \pm EPM) em camundongos fêmeas (painel superior, à esquerda) SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 8) e STAT5^{flox/flox} (n = 7), e machos (painel superior, à direita) SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 8) e STAT5^{flox/flox} (n = 6), tratados com dieta regular e em camundongos fêmeas (painel inferior, à esquerda) SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 6) e STAT5^{flox/flox} (n = 7), e machos (painel inferior, à direita) SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 7) e STAT5^{flox/flox} (n = 8), tratados com dieta hiperlipídica .

As concentrações séricas de insulina são apresentadas na figura 17. Conforme demonstrado, não houve diferença estatística entre os grupos de animais experimentais fêmeas, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, e os seus controles, STAT5^{flox/flox}, tratados com dieta regular ou hiperlipídica, assim como não houve diferença estatística entre os grupos de animais experimentais machos, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, e os seus controles, STAT5^{flox/flox}, tratados com dieta hiperlipídica. Observa-se, entretanto, que o grupo de animais machos experimentais, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, apresentou concentrações séricas de insulina significativamente menores do que os animais controles, STAT5^{flox/flox}, tratados com dieta regular.

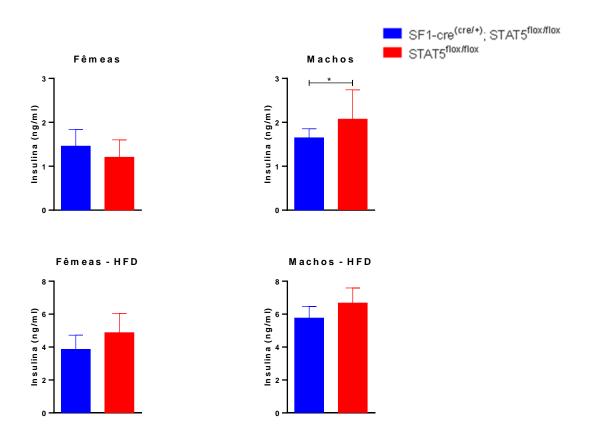
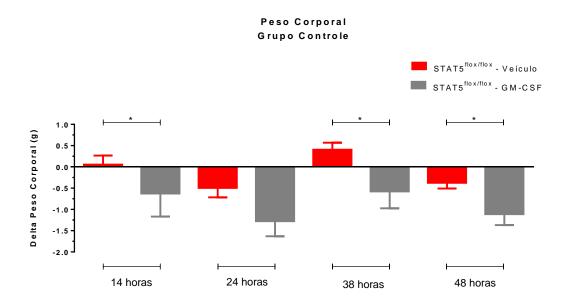


Figura 17. Concentração sérica de insulina (média \pm EPM) em camundongos fêmeas (painel superior, à esquerda) SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 8) e STAT5^{flox/flox} (n = 7), e machos (painel superior, à direita) SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 8) e STAT5^{flox/flox} (n = 6), tratados com dieta regular e em camundongos fêmeas (painel inferior, à esquerda) SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 7) e STAT5^{flox/flox} (n = 7), e machos (painel inferior, à direita) SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 6) e STAT5^{flox/flox} (n = 8), tratados com dieta hiperlipídica.

4.6. Efeitos da administração de dose única de GM-CSF sobre o peso corporal e ingestão de alimentos em camundongos machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} e seus controles, com dieta padrão

A figura 18, painel superior, apresenta a média da variação do peso corporal dos animais do grupo controle, STAT5^{flox/flox}, machos, nos períodos de 14, 24, 38 e 48 horas após reapresentação da dieta que, por sua vez, se deu aproximadamente 3 horas após a administração de dose única de GM-CSF (0,5 μg/2 μl) ou veículo (2 μl), icv. Podemos notar que o peso corporal dos animais STAT5^{flox/flox} que receberam estímulo com a citocina diminuiu de maneira significativa nos períodos de 14, 38 e 48 horas após a reapresentação da dieta, sendo que houve uma tendência de diminuição do peso corporal deste grupo no período de 24 horas após a reapresentação da dieta. Já o painel inferior da figura 18 apresenta a média da ingestão alimentar acumulada dos mesmos animais, nos períodos de 2, 4, 14, 24, 38 e 48 horas após reapresentação da dieta. A ingestão alimentar acumulada dos animais STAT5^{flox/flox} que receberam estímulo com a citocina diminuiu significativamente nos períodos de 38 e 48 horas após reapresentação de dieta, sendo que houve uma tendência de diminuição da ingestão alimentar acumulada dos animais deste grupo nos demais períodos analisados. Dessa forma, os resultados demonstram o efeito agudo do GM-CSF na perda de peso e diminuição da ingestão nos animais do grupo controle, STAT5^{flox/flox}.



Ingestão Acumulada após estímulo com GMCSF no grupo controle

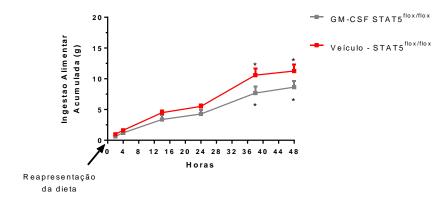
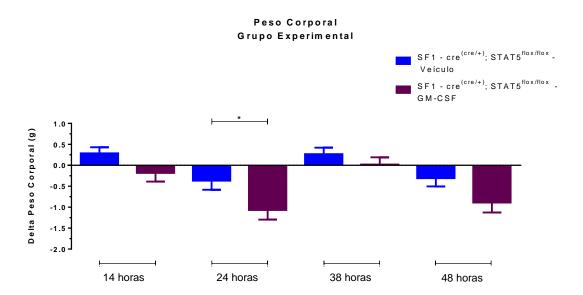


Figura 18. Variação do peso corporal (média \pm EPM) de camundongos machos STAT5^{flox/flox}, nos períodos de 14, 24, 38 e 48 horas após reapresentação de dieta (painel superior) e ingestão alimentar acumulada (média \pm EPM) dos mesmos animais, nos períodos de 2, 4, 14, 24, 38 e 48 horas (painel inferior) após reapresentação de dieta. Dieta foi reapresentada 3 horas após administração de GM-CSF ou veículo icv, sendo que em cinza está representado o grupo que recebeu dose única de GM-CSF (n = 7) e em vermelho está representado o grupo que recebeu veículo (n = 7).

A figura 19, painel superior, apresenta a média da variação do peso corporal dos animais do grupo experimental, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, machos, nos períodos de 14, 24, 38 e 48 horas após reapresentação da dieta que, por sua vez, se deu aproximadamente 3 horas após a administração de dose única de GM-CSF (0,5 μg/2 μl) ou veículo (2 μl), icv. Houve uma tendência de diminuição do peso corporal dos animais que receberam estímulo com a citocina em todos os períodos analisados, sendo que essa diferença foi significativa no período de 24 horas após a reapresentação da dieta. Já o painel inferior da figura 19 apresenta a média da ingestão alimentar acumulada dos mesmos animais, nos períodos de 2, 4, 14, 24, 38 e 48 horas após reapresentação da dieta. Podemos notar que não houve diferença significativa na ingestão alimentar acumulada entre os animais que receberam o estímulo com a citocina ou veículo, durante todo o período de análise. Esses dados demonstraram que o GM-CSF apresentou apenas modesto efeito de perda de peso e não apresentou efeito hipofágico característico quando administrado nos animais com deleção específica de STAT5 em neurônios do VMH, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}.



Ingestão Acumulada após estímulo com GMCSF no grupo experimental

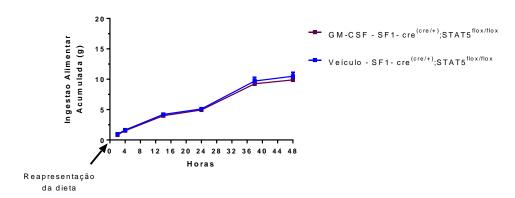


Figura 19. Variação do peso corporal (média \pm EPM) de camundongos machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, nos períodos de 14, 24, 38 e 48 horas após reapresentação de dieta (painel superior) e ingestão alimentar acumulada (média \pm EPM) dos mesmos animais, nos períodos de 2, 4, 14, 24, 38 e 48 horas (painel inferior) após reapresentação de dieta. Dieta foi reapresentada 3 horas após administração de GM-CSF ou veículo icv, sendo que em roxo está representado o grupo que recebeu dose única de GM-CSF (n = 7) e em azul está representado o grupo que recebeu veículo (n = 7).

A figura 20, painel superior, apresenta um comparativo entre a variação do peso corporal dos animais STAT5^{flox/flox} e SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} nos períodos de 14, 24, 38 e 48 horas após reapresentação da dieta que, por sua vez, se deu aproximadamente 3 horas após a administração de dose única de veículo (2 μl), icv. Observa-se que os animais não apresentaram diferença na variação do peso corporal, em nenhum dos períodos analisados. Já o painel inferior, da mesma figura, apresenta um comparativo entre a variação do peso corporal dos animais STAT5^{flox/flox} e SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} nos períodos de 14, 24, 38 e 48 horas após reapresentação da dieta que, por sua vez, se deu aproximadamente 3 horas após a administração de dose única de GM-CSF (0,5 μg/2 μl). Podemos notar uma tendência de diminuição do peso corporal dos animais STAT5^{flox/flox} em comparação aos animais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} em todos os períodos analisados, sendo que essa diferença foi significativa no período de 14 horas após reapresentação do alimento, demonstrando que há efeito de genótipo na ação anorexígena da citocina em questão. Em relação à ingestão alimentar, não houve diferenças entre os animais STAT5^{flox/flox} e SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, em nenhum dos períodos analisados.

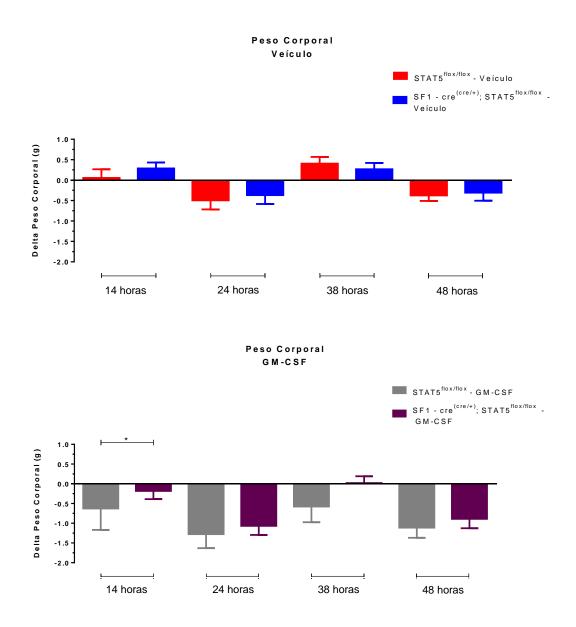


Figura 20. Variação do peso corporal (média \pm EPM) de camundongos machos STAT5^{flox/flox} (n = 7) e SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} (n = 7), que receberam dose única de veículo icv, nos períodos de 14, 24, 38 e 48 horas após reapresentação da dieta (painel superior) e variação do peso corporal (média \pm EPM) de camundongos machos STAT5^{flox/flox} (n = 7) e SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, que receberam dose única de GM-CSF icv, nos períodos de 14, 24, 38 e 48 horas após reapresentação da dieta (painel inferior).

4.7. Efeitos do tratamento com leptina ip em camundongos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} e STAT5^{flox/flox} sobre a imunoexpressão de p-STAT5 no VMH

A figura 21 apresenta microfotografias representativas da imunoexpressão de p-STAT5 no VMH dos grupos de animais controle, STAT5^{flox/flox}, e animais experimentais, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, após injeção intraperitonial de leptina (5mg/kg). Observa-se que a leptina promoveu a fosforilação e a localização nuclear de STAT5 no ARC e na região ventrolateral do VMH dos animais STAT5^{flox/flox} e SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}.

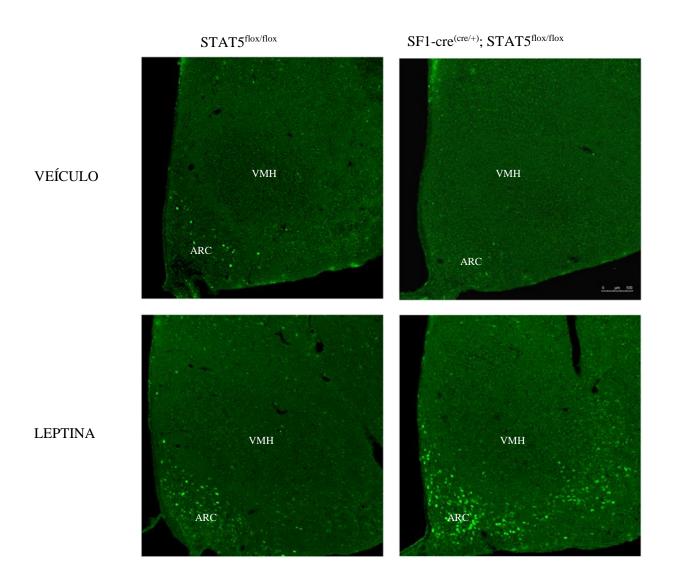


Figura 21. Microfotografias representativas de VMH contendo neurônios marcados para a forma fosforilada da proteína STAT5, de animais tratados com leptina ou veículo. ARC- núcleo arqueado; VMH – núcleo ventromedial.

5. DISCUSSÃO

O sistema nervoso central modula a ingestão alimentar e o gasto energético para manter o balanço energético e o metabolismo dentro de uma janela homeostática. Dentre os circuitos hipotalâmicos relacionados a essa função, encontramos populações neuronais que regulam a fome e a resposta à saciedade, tais como o ARC, LHA, PVN, DMH e VMH (LEE et al., 2008). Citocinas, tais como o fator neurotrófico ciliar (CNTF), leptina, fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GMCSF) e IL-6, por meio da ativação do receptor JAK2 e as vias dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT), medeiam muitas vias metabólicas para ativar sinais neuronais nessas regiões, regulando o balanço energético (LEE et al., 2008). Alguns estudos demonstraram que STAT3 é essencial para a regulação do balanço energético em resposta à leptina e outras citocinas (GHILARDI et al., 1996; BATES et al., 2003; XU et al., 2003; GAO et al., 2007). A expressão de STAT5 foi detectada em algumas áreas envolvidas na regulação da alimentação e balanço de energia, incluindo o ARC, DMH, VMH e a LHA, o que sugere um papel potencial para STAT5 na regulação da homeostase energética (LEE et al., 2008).

Os resultados do presente estudo expandem os dados descritos na literatura acerca da participação da STAT5 na regulação da homeostase energética, uma vez que analisamos os efeitos da deleção específica de STAT5 em neurônios que expressam SF1, específicos do VMH, em camundongos. Para tal, utilizamos a metodologia cre-loxP para gerar animais SF1cre(cre/+); STAT5flox/flox, ou seja, animais com a deleção citada. Assim, demonstramos que a deleção específica de STAT5 nos neurônios SF1 do VMH não afetou o peso corporal e ingestão alimentar de animais machos e fêmeas tratados com dieta regular ou dieta hiperlipídica quando comparados aos camundongos controles, STAT5^{flox/flox}. Estudos prévios acerca da importância da via da STAT5 na homeostase energética ou importância das ações da leptina no VMH no controle do peso e ingestão alimentar, utilizando modelos animais diferentes, demonstraram resultados diversos. Lee e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos com deleção de STAT5 no SNC apresentaram, sob dieta normocalórica, obesidade grave e hiperfagia, comprovando a importância de STAT5 em circuitos centrais no controle do peso e ingestão alimentar. Em relação ao modelo animal com deleção dos receptores de leptina nos neurônios SF1, há descrições na literatura de resultados divergentes: Bingham e colaboradoes (2008) verificaram que os camundongos machos e fêmeas com a deleção de LepR em neurônios SF1, sob dieta normocalórica, não apresentaram aumento de peso corporal e ingestão alimentar significativos em relação aos seus controles. No entanto, sob dieta hiperlipídica, machos e fêmeas com a referida deleção mostraram marcante diferença de peso corporal e uma pequena diferença, mas significativa, na ingestão alimentar, em relação aos seus controles. Já Dhillon e colaboradores (2006) verificaram significativa diferença de peso corporal entre machos e fêmeas e seus controles tanto sob dieta normocalórica quanto hiperlipídica, sendo que o aumento da ingestão alimentar entre machos e fêmeas e seus controles foi observada apenas sob dieta hiperlipídica.

Outros dados importantes acerca da participação da STAT5 na homeostase energética se verificam em trabalhos que utilizaram animais com deleção de STAT5 em neurônios que expressam receptores de leptina. Singireddy e colaboradores (2013) e Pan e colaboradores (2019) demonstraram que a deleção específica da sinalização de STAT5 nas ações da leptina não tem efeito sobre a regulação do peso corporal em camundongos sob dieta normocalórica. Além disso, também não foi verificada alteração na ingestão de alimentos entre os animais com a deleção de STAT5 em neurônios que expressam LepR e seus controles, sugerindo que a via da STAT5 não é necessária para os efeitos da leptina sobre a regulação do peso corporal. Por fim, o trabalho de Patterson e colaboradores (2012), demonstraram que camundongos com deleção do resíduo de tirosina Tyr₁₀₇₇ do receptor de leptina, ou seja, que apresentam bloqueio da ativação específica de STAT5 via receptor de leptina, apresentaram apenas discreto aumento no peso corporal quando submetidos à dieta hiperlipídica. Esses autores observaram também que não houve diferença na ingestão de alimentos em animais alimentados com dieta normocalórica em ambos os sexos, mas a ingestão cumulativa de alimentos foi aumentada em camundongos com a deleção citada sob dieta hipercalórica, em relação aos seus controles, em ambos os sexos. Esses dados sugeriram um modesto impacto da ação da leptina no balanço energético mediada pela via de sinalização da STAT5, notadamente sob desafio, como dieta hiperlipídica. Assim, nossos resultados sugerem que a via de sinalização da STAT5 nos neurônios SF1 do VMH não desempenha ação importante na regulação do peso corporal e ingestão alimentar.

Verificamos que a deleção específica de STAT5 nos neurônios SF1 do VMH não afetou o gasto energético e glicemia basal e nem exerceu efeito importante na tolerância à glicose avaliada pelo GTT de animais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} machos e fêmeas, tratados com dieta normocalórica, quando comparados aos camundongos controles, STAT5^{flox/flox}. Além disso, a deleção específica de STAT5 nos neurônios SF1 do VMH também não afetou a glicemia basal de animais machos e fêmeas SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} tratados com dieta hiperlipídica quando comparados aos camundongos controles, STAT5^{flox/flox}. Também observamos que as concentrações séricas de leptina e insulina não tiveram diferenças

estatísticas entre os grupos de animais machos e fêmeas sob condições de dieta normocalórica ou hiperlipídica, excetuando para as concentrações séricas de insulina encontrados nos animais machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} sob dieta normocalórica, que foram menores do que nos animais controle, STAT5^{flox/flox}. Sabe-se que o VMH desempenha um papel crítico no controle homeostático dos níveis de glicose no sangue, equilibrando a produção de glicose no fígado e a utilização de glicose nos tecidos periféricos, como músculo esquelético, tecido adiposo marrom e coração (SHIMAZU, MINOKOSHI, 2017). Além da ação da leptina nos neurônios do VMH, os neurônios sensíveis à glicose do VMH têm demonstrado contribuir para a manutenção da homeostase da glicose. Alguns desses neurônios parecem ser responsáveis pelo controle da utilização de glicose periférica em resposta à hiperglicemia aguda enquanto outros controlam a produção de glicose hepática em resposta à hipoglicemia (SHIMAZU, MINOKOSHI, 2017).

Assim como nos resultados do presente estudo, a homeostase da glicose não foi impactada em animais com deleção de STAT5 nos neurônios responsivos à leptina (PAN et al., 2019), em animais com deleção de LepR nos neurônios SF1 (BINGHAM et al., 2008) e nem em animais com deleção do resíduo de tirosina Tyr₁₀₇₇ do receptor de leptina (PATTERSON et al., 2012). Já em relação às concentrações séricas de leptina e insulina, ao contrário dos nossos achados, foram registradas concentrações elevadas de insulina e leptina em camundongos com deleção de STAT5 no SNC em comparação com seus controles, caracterizando um quadro de hiperleptinemia e resistência à insulina nesses animais (LEE et al., 2008). Bingham e colaboradores (2008) também observaram que os animais com deleção de LepR nos neurônio SF1 são hiperinsulinêmicos. Entretanto, as concentrações de insulina não diferiram entre os animais com deleção do resíduo de tirosina Tyr₁₀₇₇ do receptor de leptina e seus controles, em animais alimentados ou em jejum de ambos os sexos e tipos de dieta. Acerca dos níveis circulantes de leptina, houve sutil diferença em camundongos fêmeas com a deleção citada, sob condições de dieta normocalórica; não foram detectadas diferenças significativas entre os genótipos nos animais alimentados com HFD, independente do sexo (PATTERSON et al., 2012).

No geral, nossos dados sugerem que a STAT5 presente nos neurônios SF1 do VMH não desempenha um papel direto significativo nos níveis séricos de leptina e insulina por meio de sua ativação pela leptina. Além disso, podemos concluir que STAT5 presente nos neurônios SF1 do VMH, assim como nos neurônios responsivos à leptina, não tem papel significativo no metabolismo glicêmico.

Lee e colaboradores (2008) demonstraram que a deleção de STAT5 no sistema nervoso central resultou em alteração da regulação do gasto energético, apresentado por meio da taxa metabólica basal reduzida nos machos sob dieta normocalórica. A deleção de LepR nos neurônios SF1 também acarretou na diminuição do gasto energético em animais sob dieta hiperlipídica (DHILLON *et al.*, 2006; BINGHAM *et al.*, 2008). Já os animais machos e fêmeas com deleção do resíduo de tirosina Tyr₁₀₇₇ do receptor de leptina apresentaram um balanço energético levemente positivo, em relação aos controles, provavelmente devido ao aumento da ingestão de alimentos. Além disso, não ocorreram alterações no quociente respiratório (QR) em ambos os sexos (PATTERSON *et al.*, 2012).

Podemos concluir, a respeito dos nossos achados e somados aos dados presentes na literatura que a ação da leptina nos neurônios SF1 se apresenta importante para a manutenção da taxa metabólica basal apenas sob condições de dieta hiperlipídica e, embora a STAT5 presente no sistema nervoso também desempenhe papel importante na manutenção da taxa metabólica basal, não se pode atribuir um papel significativo da STAT5 presente nos neurônios SF1 do VMH nesta função, como também sugere-se que a importância da STAT5 na manutenção da taxa metabólica basal seja para além dos efeitos resultantes da ação da leptina.

Como descrito anteriormente, várias citocinas e outros fatores ativam muitas das vias de sinalização envolvidas no equilíbrio energético (LEE *et al.*, 2008). Dentre essas citocinas e fatores, podemos citar o hormônio de crescimento, prolactina, eritropoetina e fator estimulador de colônias de granulócitos e de macrófagos (GM-CSF) que, dentre outros, promovem a fosforilação e a ativação transcricional de STAT5 em neurônios hipotalâmicos (LEE *et al.*, 2008). Tendo em vista que o efeito hipofágico do GM-CSF é atenuado em animais com deleção de STAT5 no SNC (LEE *et al.*, 2008), sugere-se que o GM-CSF também desempenhe o seu papel importante na homeostase energética como mediador da ativação da STAT5 nos neurônios SF1, via JAK2. As análises da expressão de neuropeptídeos do ARC, feitas por Lee e colaboradores (2008), revelaram que a expressão de mRNAs desses neuropeptídeos não é alterada em camundongos com deleção de STAT5 no SNC, indicando que a ação da STAT5 na homeostase energética se dá em outras regiões cerebrais.

Os experimentos desenvolvidos para avaliar os efeitos da administração de dose única de GM-CSF sobre o peso corporal e ingestão de alimentos em camundongos machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} e seus controles, com dieta padrão, demonstraram que o peso dos animais diminuíram após administração da citocina, icv, porém, o padrão de resposta foi diferente entre os dois grupos de genótipo. A diminuição do peso corporal nos animais do

grupo controle foi mais persistente, sendo significativa 14, 38 e 48 horas, após a reapresentação da dieta, nos animais que receberam a citocina em relação aos animais que receberam veículo, porém nos animais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} a redução do peso foi observada apenas 24 horas após a reapresentação da dieta nos animais que receberam GM-CSF, em relação aos animais que receberam veículo. Acerca da ingestão alimentar, os animais do grupo controle tiveram hipofagia após injeção de GM-CSF. Contudo, nos animais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} não houve redução da ingestão alimentar induzida pelo GM-CSF.

Reed e colaboradores (2005) verificaram que ratos e camundongos selvagens que receberam dose icv de GM-CSF diminuíram significativamente a ingestão de alimento já nas primeiras 4 horas após a injeção e essa supressão durou pelo menos 24 horas após o tratamento, em associação com a diminuição do peso corporal após 24 horas, mostrando, assim como em nosso trabalho, os importantes efeitos de GM-CSF na homeostase energética. Lee e colaboradores (2008) verificaram que, enquanto a administração icv de GM-CSF resultou numa redução significativa do peso corporal e da ingestão alimentar em camundongos controle, esse efeito não foi observado em camundongos com deleção de STAT5 no SNC, indicando que, para esse efeito do GM-CSF, a via da STAT5 é necessária.

A respeito dos resultados do presente trabalho, podemos atribuir, em parte, a diminuição do peso dos animais controle, STAT5^{flox/flox}, à correspondente diminuição na ingestão alimentar. Reed e colaboradores (2005) verificaram que a administração central do GM-CSF causou não somente a diminuição da ingestão de alimentos e perda de peso, como também aumentou o gasto energético dos animais, enquanto a perda da sinalização de GM-CSF aumentou a ingestão alimentar e diminuiu o gasto energético. Assim, a perda de peso corporal após administração de GM-CSF, verificada no presente estudo, poderia ser atribuída à hipofagia e também a um aumento no gasto energético. Além disso, Reed e colaboradores (2005) verificaram que a perda da expressão de GM-CSF causou obesidade de início tardio em camundongos, com um gasto de energia diminuído. Contudo, o mais importante a se verificar é que a perda de peso corporal maior nos animais controles em relação aos animais experimentais – período de 14 horas após a administração da citocina – comprova o efeito do genótipo na ação da citocina e a importância do papel da STAT5 presente nos neurônios SF1 nas ações do GM-CSF na homeostase energética.

Vale ressaltar, no entanto, que o ganho de peso corporal observado em animais com deleção de STAT5 no SNC foi maior do que o observado em camundongos com deleção global do gene que expressa o GM-CSF, confirmando a participação da via de sinalização de

STAT5 em múltiplos mecanismos, não somente nos efeitos de GM-CSF na homeostase energética (LEE *et al.*, 2008).

Ao realizarmos a imunofluorescência para p-STAT5, após tratamento com leptina ip, observamos a proeminente expressão de p-STAT5 no ARC dos animais controles, STAT5^{flox/flox}, e experimentais, SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, e na subdivisão ventrolateral do VMH (VMHvl). Não se observou presença de STAT5 na subdivisão dorsomedial do VMH (VMHdm), local onde se encontram, predominantemente, os neurônios SF1 ativados por leptina (SOHN *et al.*, 2016). Sabe-se que a leptina ativa diretamente os neurônios SF1 do VMH (DHILLON *et al.*, 2006) e também que o receptor de leptina ativa as vias de STAT1, STAT3 e STAT5 em cultura de células HEK293, COS, HIT-T15 e RIN-M5F (GONG *et al.*, 2007; HEKERMAN *et al.*, 2005; BANKS *et al.*, 2000; BAUMANN *et al.*, 1996). Entretanto, a ausência de ativação da STAT5 nos neurônios SF1 após tratamento com leptina observada reforça ainda mais que a STAT5 não desempenha papel importante na ação da leptina in vivo. Para a visualização de STAT5 por meio de imunofluorescência, faz-se necessária a realização deste método para p-STAT5 após tratamento com GM-CSF icv, já que, como mencionado anteriormente, GM-CSF aumenta a expressão de STAT5 nuclear em neurônios hipotalâmicos (LEE *et al.*, 2008).

6. SUMÁRIO E CONCLUSÃO

Após análise de parâmetros metabólicos em animais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} e seus controles, STAT5^{flox/flox}, observamos:

- Peso corporal e ingestão de alimentos similares entre os grupos, independente do sexo e do tipo de dieta (dieta normocalórica ou hiperlipídica).
- Consumo de O₂, produção de CO₂ e de calor similares entre os grupos, independente do sexo, tratados com dieta normocalórica.
- Glicemia basal similar entre os grupos, independente do sexo e do tipo de dieta Resposta aos testes de tolerância à glicose similar entre os grupos, independente do sexo, tratados com dieta normocalórica.
- Níveis séricos de leptina similares entre os grupos, independente do sexo e do tipo de dieta.
- Níveis séricos de insulina similares entre os grupos de animais fêmeas, independente do tipo de dieta.
- Níveis séricos de insulina mais elevados no grupo de animais machos controle em relação aos animais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}, tratados com dieta normocalórica.
- Níveis séricos de insulina similares entre os grupos de animais machos tratados com dieta hiperlipídica.

Após administração de dose única de GM-CSF icv em animais machos SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox} e seus controles, STAT5^{flox/flox}, observamos:

- Redução do peso corporal e ingestão alimentar no grupo de animais controles,
 STAT5^{flox/flox}
- Nos animais SF1-cre^(cre/+);STAT5^{flox/flox} não houve redução da ingestão alimentar induzida pelo GM-CSF
- Maior redução do peso corporal no grupo de animais controles, STAT5^{flox/flox}, quando comparado ao grupo de animais SF1-cre^(cre/+); STAT5^{flox/flox}

Em resumo, considerando os dados da literatura, somados aos obtidos no nosso trabalho, concluímos que, embora a STAT5 seja importante no controle do balanço energético, a via de sinalização mediada por STAT5, presente nos neurônios SF1 do VMH,

não é necessária na regulação da homeostase energética tanto em condições de dieta regular como sob dieta obesogênica. Por outro lado, esta via de sinalização em neurônios SF-1 do VMH contribui para os efeitos do GM-CSF na homeostase energética. A ativação da STAT5 por meio da citocina GM-CSF promove um efeito anorexígeno e de perda de peso no organismo, sendo que os neurônios SF1 contribuem significativamente para esse efeito. Assim, nossos dados trazem informações relevantes que expandem os achados da literatura e têm o potencial de contribuir para as elucidações acerca dos mecanismos relacionados à regulação do balanço energético.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA RS, PRABAKARAN D, MANTZOROS C, QU D, LOWELL B, MARATOS-FLIER E, FLIER JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382(6588):250-2, 1996.

ANAND BK, BROBECK JR. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *ProcSocExpBiol Med*, 77: 323–324, 1951.

AUNE D, SEN A, PRASAD M, NORAT T, JANSZKY I, TONSTAD S, ROMUNDSTAD P, VATTEN LJ. BMI and all cause mortality: systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of 230 cohort studies with 3.74 million deaths among 30.3 million participants. *BMJ (Clinical research ed)*, 353:i2156, 2016.

BALDWIN GC, BENVENISTE EN, CHUNG GY, GASSON JC, GOLDE DW. Identification and characterization of a high-affinity granulocyte-colony-stimulating factor receptor on primary rat oligodendrocytes. *Blood*, 82:3279–3282, 1993.

BANKS AS, DAVIS SM, BATES SH, MYERS JR MG. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J BiolChem*, 275: 14563–14572, 2000.

BARON R. Understanding obesity and weight loss. 1995. Disponível em: http://wwwmed.stanford.edu/school/DGIM/Teaching/+Modules/obesity.html

BATES SH, STEARNS WH, DUNDON TA, SCHUBERT M, TSO AW, WANG Y, BANKS AS, LAVERY HJ, HAQ AK, MARATOS-FLIER E, NEEL BG, SCHWARTZ MW, MYERS MG JR. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*, 421(6925): 856-9, 2003.

BAUMANN H, MORELLA KK, WHITE DW, DEMBSKI M, BAILON PS, KIM H, LAI CF, TARTAGLIA LA. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:8374e8378,1996.

BELL JA, KIVIMAKI M, HAMER M. Metabolically healthy obesity and risk of incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Obes Rev*, 15(6):504-515, 2014.

BENNETT E, MCGUINNESS L, GEVERS EF, THOMAS GB, ROBINSON IC, DAVEY HW, LUCKMAN SM. Hypothalamic STAT proteins: regulation of somatostatinneurones by growth hormone via STAT5b. *J. Neuroendocrinol*, 17: 186e194, 2005.

BERNARDI F, CICHELERO C, VITOLO MR. Comportamento de restrição alimentar e obesidade. *Rev. Nutr.*, 18(1):85-93, 2005.

BERTHOUD HR. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring)*, 14 Suppl 5:197S-200S, 2006.

BINGHAM NC, ANDERSON KK, REUTER AL, STALLINGS NR, PARKER KL. Selective Loss of Leptin Receptors in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus Results in Increased Adiposity and a Metabolic Syndrome. *Endocrinology*, 149(5): 2138–2148, 2008.

BJØRBAEK C, BUCHHOLZ RM, DAVIS SM, BATES SH, PIERROZ DD, GU H, NEEL BG, MYERS MG JR, FLIER JS. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J BiolChem*, 276: 4747–4755, 2001.

BJØRBAEK C, LAVERY HJ, BATES SH, OLSON RK, DAVIS SM, FLIER JS, MYERS MG JR. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr₉₈₅. *J BiolChem*, 275: 40649–40657, 2000.

BJØRBAEK C, EL-HASCHIMI K, FRANTZ JD, FLIER JS. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J BiolChem*, 274: 30059–30065,1999.

BJÖRNHOLM M, MÜNZBERG H, LESHAN RL, VILLANUEVA EC, BATES SH, LOUIS GW, JONES JC, ISHIDA-TAKAHASHI R, BJØRBAEK C, MYERS MG JR. Mice lacking inhibitory leptin receptor signals are lean with normal endocrine function. *J Clin Invest*, 117: 1354–1360, 2007.

BRASIL. Vigitel Brasil 2006 - 2016. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, 2017.

BROADWELL RD, BRIGHTMANMW.Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J Comp Neurol*, 166: 257–283, 1976.

BROBERGER C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *Journal of Internal Medicine*, 258: 301–327, 2005.

BROSNAN CF, SHAFIT-ZAGARDO B, AQUINO DA, BERMAN JW. Expression of monocyte/macrophage growth factors and receptors in the central nervous system. *Adv. Neurol*, 59:349–361, 1993.

CAMPFIELD LA, SMITH FJ, GUISEZ Y, DEVOS R, BURN P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 28;269(5223):546-9, 1995.

COUSINS DJ, STAYNOV DZ, LEE TH. Regulation of interleukin-5and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression. *Am J RespirCrit Care Med*, 150:S50-3, 1994.

COWLEY MA, SMART JL, RUBINSTEIN M, CERDÁN MG, DIANO S, HORVATH TL, CONE RD, LOW MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network inthearcuate nucleus. *Nature*, 411(6836): 480-4, 2001.

DAME JB, CHRISTENSEN RD, JUUL SE. The distribution of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its receptor in the developing human fetus. *Pediatr. Res.*, 46:358–366, 1999.

DE GIT KCG, ADAN RAH.Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obesity Reviews*, 16(3): 207-24, 2015.

DELLOVADE TL, YOUNG M, ROSS EP, HENDERSON R, CARON K, PARKER K, TOBET SA. Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes. *J. Comp. Neurol*, 423: 579–589, 2000.

DHILLON HL, ZIGMAN JM, YE C, LEE CE, MCGOVERN RA, TANG V, KENNY CD, CHRISTIANSEN LM, WHITE RD, EDELSTEIN EA, COPPARI R, BALTHASAR N, COWLEY MA, CHUA S JR, ELMQUIST JK, LOWELL BB. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron*, 49(2): 191-203, 2006.

DIJKERS PF, VAN DIJK TB, DE GROOT RP, RAAIJMAKERS JA, LAMMERS JW, KOENDERMAN L, COFFER PJ. Regulation and function of protein kinase B and MAP kinase activation by the IL-5/GM-CSF/IL-3 receptor. *Oncogene*, 18:3334-42, 1999.

DRANOFF G, CRAWFORD AD, SADELAIN M, REAM B, RASHID A, BRONSON RT, DICKERSIN GR, BACHURSKI CJ, MARK EL, WHITSETT JA, MULLIGAN RC. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science*, 264: 713–716, 1994.

FARR OM, GAVRIELI A, MANTZOROS CS. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 22(5):353-9, 2015.

FARRAR WL, BRINI AT, HAREL-BELLAN A, KORNER M, FERRIS DK. Hematopoietic growth-factor signal transduction and regulation of gene expression. *ImmunolSer*, 49:379-410, 1990.

FLAK JN, MYERS MG JR. Minireview: CNS Mechanisms of Leptin Action. *Mol Endocrinol*, 30(1):3-12, 2016.

FRANCISCHI RPP, PEREIRA LO, FREITAS CS, KLOPFERM, SANTOS RC, VIEIRA P, LANCHA JÚNIOR AH. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Rev. Nutr*, 13(1): 17-28, 2000.

FRIEDMAN JM, HALAAS JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395:763-70, 1998.

GAO Q, MEZEI G, NIE Y, RAO Y, CHOI CS, BECHMANN I, LERANTH C, TORAN-ALLERAND D, PRIEST CA, ROBERTS JL, GAO XB, MOBBS C, SHULMAN GI, DIANO S, HORVATH TL. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med*, 13(1): 89-94, 2007.

GHILARDI N, ZIEGLER S, WIESTNER A, STOFFEL R, HEIM MH, SKODA RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13): 6231–6235, 1996.

GLOBAL BMIMC, DI ANGELANTONIO E, BHUPATHIRAJU SH N, *et al.* Body mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet*, 388:776-786, 2016.

GONG Y, ISHIDA-TAKAHASHI R, VILLANUEVA EC, FINGAR DC, MÜNZBERG H, MYERS JR MG. The long form of the leptin receptor regulates STAT5 and ribosomal protein S6 via alternate mechanisms. *J BiolChem*, 282: 31019–31027, 2007.

GOUGH NM, GOUGH J, METCALF D, KELSO A, GRAIL D, NICOLA NA, BURGESS AW, DUNN AR. Molecular cloninog of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Nature*, 309: 763–767, 1984.

GRATTAN DR, XU J, MCLACHLAN MJ, KOKAY IC, BUNN SJ, HOVEY RC, DAVEY HW. Feedback regulation of PRL secretion is mediated by the transcription factor, signal transducer, and activator of transcription 5b. *Endocrinology*, 142: 3935e3940, 2001.

GRIFFIN JD, SPERTINI O, ERNST TJ, BELVIN MP, LEVINE HB, KANAKURA Y, TEDDER TF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol*, 145:576-84, 1990.

GRILL HJ. Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. *Obesity*, 14(Suppl 5):216S–21S, 2006.

GRIMLEY PM, DONG F, RUI H. Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 10:131e157, 1999.

GRUNDY SM. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67(3):563S-572S, 1998.

GUAN XM, YU H, VAN DER PLOEG LH. Evidence of altered hypothalamic proopiomelanocortin/neuropeptide Y mRNA expression in tubby mice. *Brain Res*, 59: 273–279, 1998.

HALAAS JL, GAJIWALA KS, MAFFEI M, COHEN SL, CHAIT BT, RABINOWITZ D, LALLONE RL, BURLEY SK, FRIEDMAN JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encodedby the obese gene. *Science*, 28;269(5223):543-6, 1995.

HEGYI K, FULOP K, KOVACS K, TOTH S, FALUS A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell BiolInt*, 28:159-69, 2004.

HEKERMAN P, ZEIDLER J, BAMBERG-LEMPER S, KNOBELSPIES H, LAVENS D, TAVERNIER J, JOOST HG, BECKER W. Pleiotropy of leptin receptor signaling is defined by distinct roles of the intracellular tyrosines. *FEBS J* , 272: 109–119, 2005.

HERBELIN A, MACHAVOINE F, DY M. Potentiating effect of granulocytemacrophage colony-stimulating factor on interleukin-1-induced thymocyte proliferation: evidence for an interleukin-2 and tumor necrosis factorindependent pathway. *LymphokineRes*, 9: 155–165, 1990.

HETHERINGTON AW, RANSON SW. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec*, 78: 149–172, 1940.

HILL JO, DROUGAS H, PETERS JC. Obesity treatment: can diet composition play a role? *Annals of Internal Medicine*, 119(7): 694-697, 1993.

HUANG XF, HAN M, SOUTH T, STORLIEN L. Altered levels of POMC, AgRP and MC4-R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity. *Brain Res*, 992: 9–9, 2003.

JEBB SA. A etiology of obesity. British Medical Bullet inv, 53(2): 264-285, 1997.

JENKINS BJ, BLAKE TJ, GONDA TJ. Saturation mutagenesis of the beta subunit of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor shows clustering of constitutive mutations, activation of ERK MAP kinase and STAT pathways, and differential beta subunit tyrosine phosphorylation. *Blood*, 92:1989-2002, 1998.

KIM KW, ZHAO L, DONATO J JR, KOHNO D, XU Y, ELIAS CF, LEE C, PARKER KL, ELMQUIST JK. Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(26):10673-8, 2011.

KING BM. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *PhysiolBehav*, 87:221-44, 2006.

KLOEK C, HAQ AK, DUNN SL, LAVERY HJ, BANKS AS, MYERS JR MG. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J BiolChem*, 277: 41547–41555, 2002.

KURRASCH DM, CHEUNG CC, LEE FY, TRAN PV, HATA K, INGRAHAM HA. The neonatal ventromedial hypothalamus transcriptome reveals novel markers with spatially distinct patterning. *J. Neurosci*, 27:13624–13634, 2007.

LEE JY, MUENZBERG H, GAVRILOVA O, REED JA, BERRYMAN D, VILLANUEVA EC, LOUIS GW, LEINNINGER GM, BERTUZZI S, SEELEY RJ, ROBINSON GW, MYERS MG, HENNIGHAUSEN L. Loss of Cytokine-STAT5 Signaling in the CNS and pituitary gland alters energy balance and leads to obesity. *PLoS ONE*, 3: e1639, 2008.

LIU XW, ROBINSON GW, WAGNER KU, GARRETT L, WYNSHAWBORIS A, HENNIGHAUSEN L. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Gene Dev*, 11: 179e186, 1997.

MA FY, ANDERSON GM, GUNN TD, GOFFIN V, GRATTAN DR, BUNN SJ. Prolactin specifically activates signal transducer and activator of transcription 5b in neuroendocrine dopaminergic neurons. *Endocrinology*, 146: 5112e5119, 2005.

MAFFEI M, HALAAS J, RAVUSSIN E, PRATLEY RE, LEE GH, ZHANG Y, FEI H, KIM S, LALLONE R, RANGANATHAN S, KERN PA, FRIEDMAN JM. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, 1:1155-61, 1995.

MAIOR AS. Regulação hormonal da ingestão alimentar: um breve relato. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 45(3): 303-9, 2012.

MAJDIC G, YOUNG M, GOMEZ-SANCHEZ E, ANDERSON P, SZCZEPANIAK LS, DOBBINS RL. Knock-out mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology*, 143: 607–614, 2002.

MARIE NG, FLEMING T, ROBINSON M, THOMSON B, GRAETZ N, MARGONO C, *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 384: 766–81, 2014.

METCALF D, BEGLEY CG, WILLIAMSON DJ, NICE EC, DE LAMARTER J, MERMOD JJ, THATCHER D, SCHMIDT A. Hemopoietic responses in mice injected with purified recombinant murine GM-CSF. *ExpHematol*, 15: 1–9, 1987.

MIYAJIMA A. Molecular structure of the IL-3, GM-CSF and IL-5 receptors. *Int J CellCloning*, 10:126-34, 1992.

MONGRAW-CHAFFIN ML, PETERS SAE, HUXLEY RR, WOODWARD M. The sex-specific association between BMI and coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of 95 cohorts with 1.2 million participants. *Lancet Diabetes Endo*, 3(6):437-449, 2015.

MONTEIRO CA, MONDINI L, SOUZA ALM, POPKIN BM. Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. In: Monteiro CA. Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças. *Hucitec*, 247-255, 1995.

MORTON GJ, MEEK TH, SCHWARTZ MW. Neurobiology of food intake in health and desease. *Neuroscience*, 15: 366-328, 2014.

MORTON GJ, CUMMINGS DE, BASKIN DG, BARSH GS, SCHWARTZ MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443: 289-95, 2006.

MÜNZBERG H, BJÖRNHOLM M, BATES SH, MYERS JR MG. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 642-652, 2005.

NAGAMINE I, SUNAGAWA K, KURIWAKI J, SHINJO A. Changes in single unit activity in the lateral hypothalamic area of goats during feeding. *J Anim Sci*, 81:529-36, 2003.

NIMER SD, UCHIDA H. Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 expression. *Stem Cells*, 13: 324-35, 1995.

OLNEY JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164: 719–721, 1969.

PAINE R, 3RD MORRIS SB, JIN H, WILCOXEN SE, PHARE SM, MOORE BB, COFFEY MJ, TOEWS GB. Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-CSF-deficient mice. Am *J Physiol Lung Cell MolPhysiol*, 281: L1210–L1218, 2001.

PAN WW, ALLISON MB, SABATINI P, RUPP A, ADAMS J, PATTERSON C, JONES JC, OLSON DP, MYERS JR MG. Transcriptional and physiological roles for STAT proteins in leptin action. *Mol Metab*, 22:121-131, 2019.

PAN WW, MYERS MG JR. Leptin and the maintenance of elevated body weight. *Nat Rev Neurosci*, 19(2):95-105, 2018.

PARKER KL, SCHIMMER PB. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr. Rev*, 18: 361–377, 1997.

PATTERSON CM, VILLANUEVA EC, GREENWALD-YARNELL M, RAJALA M, GONZALEZ IE, SAINI N, JONES J, MYERS JR MG. Leptin action via LepR-b Tyr₁₀₇₇ contributes to the control of energy balance and female reproduction. Mol Metab, 1(1-2): 61–69, 2012.

PAXINOS G, WATSON C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, 1998.

PELLEYMOUNTER MA, CULLEN MJ, BAKER MB, HECHT R, WINTERS D, BOONE T, COLLINS F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 28; 269(5223):540-3, 1995.

POPKIN BM, DOAK CM. The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. *Nutr Rev*, 56(4): 106-14, 1998.

REED JA, CLEGG DJ, SMITH KB, TOLOD-RICHER EG, MATTER EK, PICARD LS, SEELEY RJ. GM-CSF action in the CNS decreases food intake and body weight. *J Clin Invest*, 15: 3035–3044, 2005.

RIOS M, FAN G, FEKETE C, KELLY J, BATES B, KUEHN R, LECHAN RM, JAENISCH R. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol*, 15:1748-57, 2001.

SAWADA M, ITOH Y, SUZUMURA A, MARUNOUCHI T. Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glial cells. *Neurosci. Lett*, 160:131–134, 1993.

SCHWARTZ MW, WOODS SC, PORTE D, JR., SEELEY RJ, BASKIN DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404:661-71, 2000.

SEELENTAG WK, MERMOD JJ, MONTESANO R, VASSALLI P. Additive effects of interleukin 1 and tumour necrosis factor-alpha on the accumulation of the three granulocyte and macrophage colony-stimulating factor mRNAs in human endothelial cells. *Embo J*, 6: 2261–2265, 1987.

SEGAL JP, STALLINGS NR, LEE CE, ZHAO L, SOCCI N, VIALE A. Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *J. Neurosci*, 25: 4181–4188, 2005.

SHIMAZU T, MINOKOSHI Y. SYSTEMIC GLUCOREGULATION BY GLUCOSE-SENSING. Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH). Journal of the Endocrine Society, 1(5): 449–459, 2017.

SINGIREDDY AV, INGLIS MA, ZUURE WA, KIM JS, ANDERSON GM. Neither Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) or STAT5 Signaling Pathways Are Required for Leptin's Effects on Fertility in Mice. *Endocrinology*, 154(7):2434-45, 2013.

SOHN W, OH Y, KIM KW, LEE S, WILLIAMS KW, ELMQUIST JK. Leptin and insulin engage specific PI3K subunits in hypothalamic SF1 neurons Jong. *Molecular Metabolism*, 5: 669e679, 2016.

STANLEY S, WYNNE K, MCGOWAN B, BLOOM S. Hormonal Regulation of Food Intake. *Physiol Rev*, 85: 1131–1158, 2005.

TARTAGLIA LA. The leptin receptor. J BiolChem, 272: 6093–6096, 1997.

TARTAGLIA LA, DEMBSKI M, WENG X, DENG N, CULPEPPER J, DEVOS R, RICHARDS GJ, CAMPFIELD LA, CLARK FT, DEEDS J. Identification and expression cloning of a leptin receptor, Ob-R. *Cell*, 83: 1263–1271, 1995.

TEGLUND S, MCKAY C, SCHUETZ E, VAN DEURSEN JM, STRAVOPODIS D, WANG DM, BROWN, M, BODNER S, GROSVELD G, IHLE JN. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, 93: 841e850, 1998.

VILLANUEVA EC, MYERS JR MG. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *International Journal of Obesity*, 32:S8–S12, 2008.

VLAHOS R, BOZINOVSKI S, HAMILTON JA, ANDERSON GP. Therapeutic potential of treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by neutralising granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GMCSF). *PharmacolTher*, 112: 106–115, 2006.

WAKAO H, GOUILLEUX F, GRONER B. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J*, 13: 2182e2191, 1994.

WHITE DW, KUROPATWINSKI KK, DEVOS R, BAUMANN H, TARTAGLIA LA. Leptin receptor (OB-R) signaling. *J BiolChem*, 272: 4065–4071, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and Overweight. WHO; 2018. Disponível em: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight

WOGNUM AW, WESTERMAN Y, VISSER TP, WAGEMAKER G. Distribution of receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on immature CD34* bone marrow cells, differentiating monomyeloid progenitors, and mature blood cell subsets. *Blood*, 84: 764–774, 1994.

WOODS SC, SEELEY RJ, PORTE JR. D, SCHWARTZ MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 280: 1378-83, 1998.

XU B, GOULDING EH, ZANG K, CEPOI D, CONE RD, JONES KR, TECOTT LH, REICHARDT LF. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci*, 6:736-42, 2003.