

# Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Departamento de Fisiologia

## Programa de Pós-Graduação em Fisiologia FMRP - USP

## Mecanismos da Sensibilidade à Baixa Glicose dos Neurônios do Núcleo do Trato Solitário de Ratos

PATRIK SAUL ZARPELLON BARBOSA

Ribeirão Preto - SP 2022

### PATRIK SAUL ZARPELLON BARBOSA

## Mecanismos da Sensibilidade à Baixa Glicose dos Neurônios do Núcleo do Trato Solitário de Ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre em ciências

Área de concentração: Fisiologia Orientador: Prof. Dr. Ricardo Maurício Xavier Leão

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Ribeirão Preto - SP 2022 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

Saul Zarpellon Barbosa, Patrik Mecanismos da Sensibilidade à Baixa Glicose dos Neurônios do Núcleo do Trato Solitário de Ratos. Ribeirão Preto, 2022. 88 p.: il.; 30 cm

-

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia. Orientador: Maurício Xavier Leão, Ricardo.

Neurônios GI. 2. Eletrofisiologia celular. 3. Sensibilidade à glicose.
Neurônios do NTS

Nome: SAUL ZARPELLON BARBOSA, Patrik

Título: Mecanismos da Sensibilidade à Baixa Glicose dos Neurônios do Núcleo do Trato Solitário de Ratos

> Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre em ciências

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Maurício Xavier Leão

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.:	 	 
Instituição:		
Julgamento:		
Prof. Dr.:	 	 
Instituição:	 	 
Julgamento:		
C		
Prof. Dr.:		
Instituicão:		
Julgamento:		
-		

Dedico este trabalho à minha mãe Mirna Zarpellon, ao meu irmão MD. Pabllo, a minha irmã CD. Ma. Paulla, e ao meu pai "Caboco" Sandoval Barbosa. Dedico também aos meus avós maternos Saul Nelson Zarpellon e Edviges Elza Zarpellon, bem como a meus avós paternos "Vaqueiro Santuca" Raimundo Mateus Barbosa e dona Maria Madalena Barbosa. A todos os cientistas, aos meus amigos na ciência e à sociedade que merece um retorno, em especial ao Estado de São Paulo, e à minha terra Ponta de Pedras - Ilha do Marajó – Pará e ao estado da Paraíba.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Ricardo Leão por aceitar me orientar no caminho da ciência, agradeço o aprendizado contínuo e de qualidade, bem como todo o apoio que venho recebendo.

Agradeço ao técnico Fernando Aguiar (Fernandinho) pela ajuda técnica e pelos aprendizados, o que seria do laboratório sem os arranjos técnicos nível bastião?!

Agradeço aos meus amigos e colegas Daniela, Marina, Beatriz, Daniel, Ricardo, Leonardo, Nikollas e Natália, por todo conhecimento e aprendizado trocado, bem como pela amizade. Sei que ainda vou aprender muito com vocês, e espero aproveitar ao máximo o meu tempo com pessoas tão diferentes e importantes.

Também sou grato pelas contribuições do Dr. Cahuê De Bernardis Murat, que, mesmo não estando presente, me ajudou na jornada do mestrado e foi o um dos responsáveis pela linha de pesquisa a qual o mestrado foi dedicado.

Gratidão a todos os professores que contribuem com o PPG em Fisiologia da FMRP-USP, foram muitos aprendizados. Me sinto privilegiado de ter participado de aulas com professores e cientistas de excelência.

Agradeço à secretaria do PPG em Fisiologia por todo apoio, em especial à Cláudia de Barcellos pela paciência e agilidade em auxiliar os alunos nos problemas burocráticos.

Agradeço aos demais componentes da FMRP-USP: a equipe de limpeza, a equipe de segurança, transporte, e demais órgãos responsáveis pela organização da FMRP-USP, sem vocês não teríamos um lugar seguro, limpo e organizado para desenvolver a ciência de qualidade.

Por fim, agradeço ao apoio estrutural e financeiro da FMRP-USP e ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (processo número: 1307140/2020-2) e com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"Tudo o que temos que decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado [...] O mundo não está em seus livros e mapas. Ele está lá fora!"

Gandalf (J.R.R. Tolkien)

"In this heroic time of what can be called classical biophysics (1935-1952), the ionic theory of membrane excitation was transformed from untested hypothesis to established fact." Bertil Hille

#### RESUMO

BARBOSA, P.S.Z. Mecanismos da Sensibilidade à Baixa Glicose dos Neurônios do Núcleo do Trato Solitário de Ratos. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022, 88 p.

A glicose é o principal substrato energético do sistema nervoso central (SNC). A regulação da glicemia se dá por mecanismos endócrinos e comportamentais, e o SNC controla esses mecanismos de respostas. A resposta contra-regulatória (CCR) é uma resposta autonômica que impede níveis glicêmicos muito baixos, e a falha dessa resposta é um problema de saúde, sobretudo para os diabéticos. Os neurônios do núcleo do trato solitário (NTS) são sensíveis às oscilações na concentração da glicose extracelular. E essas mudanças levam a alterações nas propriedades passivas da membrana celular. Grande parte dos neurônios do NTS desafiados com uma solução com baixa glicose (de 5 mM para 0,5 mM de glicose extracelular) tem seus potenciais de membrana despolarizados por um mecanismo não compreendido ainda. Neste trabalho decidimos investigar com mais detalhes os mecanismos da despolarização induzida por baixa concentração de glicose extracelular (baixa glicose) nos neurônios do NTS. Primeiro decidimos investigar se as alterações induzidas pela baixa glicose poderiam ser mimetizadas pela redução da síntese de ATP pela mitocôndria usando o desacoplador mitocondrial CCCP (1 µM). Mostramos que o CCCP reproduziu os efeitos da baixa glicose: despolarizando a membrana, induzindo uma corrente de entrada, diminuindo a resistência de entrada e mimetizando algumas alterações no potencial de ação (PA) desses neurônios. Para testar se glicose baixa, bem como o CCCP, estaria despolarizando a membrana via inibição da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase - afetando o gradiente iônico - inibimos a atividade da bomba com 10 µM de ouabaína. O potencial de membrana despolarizou como na baixa glicose, mas não houve diminuição na resistência de entrada, nem alterações nos parâmetros de PA. Por outro lado, a ativação ou inibição da AMP quinase (AMPK), uma enzima ativada em situações de baixa de ATP intracelular, não reproduziu ou antagonizou os efeitos da baixa glicose de forma geral. Como objetivo paralelo, verificamos se o BDNF, por estar envolvido na modulação de neurônios do NTS e de respostas no balanço energético, poderia mimetizar os efeitos da baixa glicose. No geral, o BDNF não reproduziu esses efeitos, mas reduziu o limiar de disparo e a latência para o disparo dos PAs. Concluímos que a perfusão dos neurônios do NTS subpostremal com uma solução de baixa glicose despolariza a membrana provavelmente por uma redução do ATP intracelular, mas não pela ativação de AMPK ou diminuição da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase.

Além disso, o BDNF não reproduziu os efeitos da baixa glicose e provavelmente não os medeia.

**Palavras-chave:** Neurônios GI. Eletrofisiologia celular. Sensibilidade à glicose. Neurônios do NTS.

#### ABSTRACT

BARBOSA, P.S.Z. Mechanisms of Low-Glucose Sensitivity of The Neurons of The Nucleus of The Solitary Tract from Rats. Dissertation (Master's Degree) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022, 88 p.

Glucose is the main energy source of the CNS. The regulation of blood glucose takes place through endocrine and behavioural mechanisms, with CNS controls of these responses. CCR (counter-regulatory response) is an autonomic response essential to counteract very low glycaemic levels, and the failure of this response is a health problem, especially for diabetics. Neurons in the nucleus of the solitary tract (NTS) are sensitive to concentration of extracellular glucose fluctuations, these changes lead to changes in the passive properties of the cell membrane. Most NTS neurons subjected to a quick change to a low solution glucose (from 5 mM to 0.5 mM extracellular glucose) have their membrane potentials depolarized by a mechanism that is still not understood. In this work, we investigate the mechanisms triggering the depolarization induced by low glucose in NTS neurons. First, we decided to investigate whether the changes induced by low glucose could be mimicked by reducing mitochondrial ATP synthesis using the uncoupler agent CCCP (1  $\mu$ M). We showed that CCCP reproduced the effects of low glucose: depolarizing the membrane, inducing an input current, decreasing input resistance, and mimicking some changes in the action potential (AP) of these neurons. To test whether low glucose, as well as CCCP, would be depolarizing the membrane via inhibition of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase - affecting the ion gradient - we inhibited the pump activity with 10  $\mu$ M of ouabain. Membrane potential depolarized as in low glucose, but there was no decrease in input resistance, as well as no change in AP parameters. On the other hand, activation or inhibition of AMPK, an enzyme activated by decreased intracellular ATP, did not reproduce the effects of low glucose in general. As a parallel objective, we verified whether BDNF, as it is involved in the modulation of NTS neurons and responses in energy balance, could mimic the effects of low glucose. We conclude that perfusion of neurons of the subpostremal NTS with a low glucose solution depolarizes the membrane by probably a reduction of intracellular ATP, but not by activation of AMPK or decreasing the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. Additionally, BNDF is unlikely to mediate the effects of low glucose in NTS neurons.

Keywords: GI neurons. Cell electrophysiology. Glucose sensitivity. NTS neurons

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo clássico insulina-glucagon do controle da glicemia17
Figura 2: A função central do NTS de integrar informações periféricas e as respostas na homeostase dos níveis de glicose
Figura 3: Identificação dos neurônios nas fatias subpostremais do NTS
Figura 4: Efeitos da baixa glicose no potencial de membrana de neurônios GI do NTS33
Figura 5: Efeitos da baixa glicose na resistência de entrada da membrana de neurônios GI do NTS
Figura 6: A baixa glicose induz uma corrente de entrada nos neurônios GI do NTS37
Figura 7: A baixa glicose extracelular não altera alguns parâmetros de PA em neurônios GI do NTS
Figura 8: A baixa glicose leva a modificações em parâmetros dos PAs de neurônios GI do NTS
Figura 9: Efeitos do CCCP no potencial de membrana de neurônios GI do NTS41
Figura 10: Efeitos do CCCP na resistência de entrada de neurônios GI do NTS43
Figura 12: Efeitos do CCCP nas propriedades eletrofisiológicas de neurônios NR do NTS44
Figura 13: O CCCP induz corrente de entrada nos neurônios GI do NTS, mas não induz em neurônios NR do NTS
Figura 14: O CCCP leva às alterações em parâmetros do potencial de ação de neurônios GI do NTS
Figura 15: O CCCP não altera todos os parâmetros do potencial de ação de neurônios GI do NTS
Figura 16: Efeitos da Ouabaína nas propriedades eletrofisiológicas de neurônios do NTS51
Figura 17: A Ouabaína induz uma pequena corrente de entrada nos neurônios do NTS53
Figura 18: A ouabaína não leva à alterações nos parâmetros do potencial de ação (PA) de neurônios do NTS
Figura 19: Efeitos da dorsomorfina nas propriedades eletrofisiológicas de neurônios GI do NTS
Figura 20: A dorsomorfina leva a alterações em alguns parâmetros do potencial de ação de neurônios GI do NTS
Figura 21: Efeitos do AICAR nas propriedades eletrofisiológicas de neurônios do NTS60
Figura 23: O BDNF a 100 ng/ml não despolariza os neurônios do NTS, e não induz corrente de entrada como na baixa glicose
Figura 24: BDNF não leva à alterações na maioria dos parâmetros do potencial de ação (PA) de neurônios do NTS

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Com	paração dos	efeitos da baixa	glicose e do CCCP.	
---------------	-------------	------------------	--------------------	--

### LISTA DE SIGLAS

aCSF	Fluido Cérebro Espinal Artificial			
ADP	Adenosina Difosfato			
AMP	Adenosina Monofosfato			
AMPK	Proteína Quinase AMP-dependente			
ANOVA	Análise			
ATP	Adenosina Trifosfato			
BDNF	Fator Neuro trófico Derivado do Cérebro			
Ca <sup>+2</sup>	Cátion de Cálcio			
Cl	Ânion cloreto			
СССР	Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone			
СТЕ	Cadeia Transportadora de Elétrons			
DMSO	dimetil sufóxido			
DNQX	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione			
EGTA	Ácido Etileno Glicol Tetraacético			
GABA	Ácido Gama Aminobutírico			
GI	Neurônios inibidos por glicose (Glucose-inhibited)			
GE	Neurônios excitados por glicose (Glucose-excited)			
IV	Relação corrente em função da voltagem			
$\mathbf{K}^+$	Cátions de potássio			
Kv	Canais de potássio dependentes de voltagem			
KATP	Canais de potássio ATP-sensíveis			
K <sub>2P</sub>	Canais de vazamento para potássio			
Na <sup>+</sup>	Cátion de Sódio			
NALCN	Canais de vazamento para sódio			
PA	Potencial de Ação			
SNC	Sistema Nervoso Central			
TEA	Tetraetilamônio			
TTX	Tetrodotoxina			
VI	Relação voltagem em função da corrente			

## SUMÁRIO

1- Introdução	16
1.1. Glicose: substrato energético essencial ao cérebro	16
1.2. O núcleo do trato solitário na regulação da homeostase da glicose: resposta con regulatória e a falha autonômica	ntra 18
1.3. Neurônios sensíveis à glicose no SNC: núcleo do trato solitário em foco	20
2- Objetivos	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3- Metodologia	26
3.1 - Animais	26
3.2 - Preparação das Fatias	26
3.3 - Preparação das Drogas	27
3.4 - Técnica de <i>Patch Clamp</i>	27
3.5 – Estatística e Análise de dados	30
4- Resultados	32
4.1. Sensibilidade à baixa glicose em neurônios do NTS	32
4.1.1. Alterações no potencial de membrana induzidas pela baixa glicose	32
4.1.2. Alterações na resistência de entrada induzidas pela baixa glicose	34
4.1.3. Corrente iônica induzida pela baixa glicose	35
4.1.4. Alterações induzidas pela baixa glicose no potencial de ação	37
4.2. Efeitos do desacoplamento mitocondrial em neurônios do NTS	40
4.2.1. Alterações no potencial de membrana induzidas pelo CCCP	40
4.2.2. Alterações na resistência de entrada induzidas pelo CCCP	42
4.2.3. O CCCP não reproduz esses efeitos em neurônios não responsivos	44
4.2.4. Corrente iônica induzida pelo CCCP	44
4.2.4. Alterações no potencial de ação induzidas pelo CCCP	47
4.3. Efeitos da inibição da bomba Na+/K+-ATPase em neurônios do NTS	49
4.3.1. Alterações no potencial de membrana e na resistência de entrada induzidas pela Ouabaína	50
4.3.2. Corrente iônica induzida pela Ouabaína	52
4.3.3. Alterações no potencial de ação induzidas pela Ouabaína	54
4.4. Efeitos da inibição da AMPK em neurônios do NTS	55
4.4.1. Alterações no potencial de membrana e na resistência de entrada induzidas pela Dorsomorfina	55
4.4.2. Alterações no potencial de ação induzidas pela Dorsomorfina	57

4.5. Efeitos da ativação da AMPK em neurônios do NTS	59
4.5.1. Alterações no potencial de membrana e na resistência de entrada induzidas pelo AICAR	59
4.5.2. Alterações no potencial de ação induzidas pelo AICAR	60
4.6. Efeitos do BDNF em neurônios do NTS	61
5- Discussão	64
5.1- Os efeitos da baixa glicose em neurônios GI do NTS	64
5.2- A diminuição do ATP intracelular reproduz a baixa glicose	68
5.3- A inibição da bomba Na+/K+-ATPase participa em parte dos efeitos da baixa glic	ose 70
5.4- AMPK: um componente da resposta dos neurônios do NTS à baixa glicose?	73
5.5- O BDNF não mimetiza a baixa glicose em neurônios do NTS	75
5.6- Contribuição para o mecanismo usado por neurônios GI do NTS	76
6- Conclusão	77
Referências	78

#### 1- Introdução

#### 1.1. Glicose: substrato energético essencial ao cérebro

A glicose é a principal fonte de energia para o Sistema Nervoso Central (SNC), indispensável para a formação de ATP (*Adenosine 5'-triphosphate*) por respiração aeróbica. O ATP é essencial para a síntese de neurotransmissores, vias metabólicas centrais, manutenção do gradiente eletroquímico relacionado à Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e demais ATPases, entre outras funções (Dienel, 2019). O controle do nível de glicose no sangue é extremamente relevante para o organismo, pois a desregulação da glicemia está associada ao desenvolvimento de diversos problemas neurológicos e psiquiátricos (Shrivastava et al., 2020), bem como a outras patologias como nefropatias, retinopatias (Huang et al., 2019) e doenças cardiovasculares (Dal Canto et al., 2019).

Os diabéticos são os principais pacientes que sofrem com a desregulação dos níveis de glicose no sangue, e a hipoglicemia é bastante comum nesses pacientes quando tratados a longo prazo com insulina ou sulfonilureias (Stanley et al., 2019). Além da relevância do tema para compreensão de patologias, a regulação da glicemia está ligada, desde a década de 1960, à compreensão dos mecanismos fisiológicos do comportamento alimentar (Anand et al., 1964; Ritter et al., 1981; Ritter & Strang, 1982; Aklan et al., 2020). Nesse contexto, pesquisadores vêm mostrando o papel fundamental da resposta contrarreguladora (CRR) para proteger nosso organismo contra condições hipoglicêmicas graves (Cryer, 1993; Sankar et al., 2020).

O organismo usa uma combinação de mecanismos do sistema nervoso autônomo (SNA) e do sistema endócrino (SE) para modular os níveis glicêmicos. O SE modula alguns órgãos através do eixo hipotálamo-hipófise, por exemplo: a secreção de adrenalina e cortisol pela glândula adrenal, a secreção de T3 e T4 pela glândula tireoide. E o SNA modula essas ações do SE, participando do controle de secreção dos hormônios e do comportamento alimentar (Cryer, 1993; López-Gambero et al., 2019).

Na figura 1 está esquematizado o mecanismo fisiológico clássico de regulação da glicose no sangue, que compreende o balanço entre as secreções de insulina e glucagon pelas células beta e alfa pancreáticas, respectivamente, e que conta com a participação do fígado como órgão fornecedor e armazenador de glicose (Nirmalan & Nirmalan, 2017). Na figura 2 está representado um complexo mecanismo que integra a resposta hormonal com a resposta do SNC. Esse mecanismo conta com papel fundamental do tronco encefálico, no qual o NTS

(Núcleo do Trato Solitário) funciona como um ponto de integração de diversas informações periféricas e centrais, além de comandar eferências nervosas, sendo a principal delas a regulação do tônus parassimpático para o pâncreas (Faber et al., 2020; Troadec et al., 2022).



**Figura 1: Mecanismo clássico insulina-glucagon do controle da glicemia.** Mecanismo clássico de regulação da glicemia em que uma diminuição da concentração de glicose sanguínea acarreta a secreção de glucagon, que por sua vez induz a glicogenólise no tecido hepático. Este por sua vez fornece glicose ao sangue restabelecendo os níveis glicêmicos. Em caso de aumento da concentração de glicose sanguínea, a secreção de insulina é estimulada e, como principal ação, há a internalização da glicose nas células. Nos hepatócitos, a insulina ainda estimula a glicogênese. Figura adaptada de Nirmalan & Nirmalan, 2017.

## **1.2.** O núcleo do trato solitário na regulação da homeostase da glicose: resposta contra regulatória e a falha autonômica

Evidentemente, o hipotálamo é a região mais estudada na regulação da homeostase energética envolvendo a glicose, principalmente quanto aos mecanismos celulares de sensibilidade. Já os estudos sobre os mecanismos de sensibilidade à glicose em neurônios NTS são poucos e, comparados ao hipotálamo, menos expressivos ainda, mesmo sendo um núcleo integrador das repostas e informações necessárias para regular os níveis de glicose.

O NTS é uma região estratégica na pesquisa da regulação do nível de glicose, pois os vasos sanguíneos nesta região são fenestrados (Gross et al., 1990; Merchenthaler, 1991) e os neurônios NTS recebem e enviam diversas projeções (figura 2.A), funcionando como uma importante área integrativa (Sarah Stanley et al., 2019; López-Gambero et al., 2019; Faber et al., 2020), e é especialmente importante no que diz respeito a respostas contra regulatória (CRR, do inglês *counterregulatory response*, Verberne et al., 2014).

O CRR corresponde a uma série de respostas endócrinas e comportamentais coordenadas pelo SNC, desencadeadas por uma queda na glicemia. Em uma condição de hipoglicemia, a CRR é ativada levando ao aumento da secreção de adrenalina, cortisol, GH (hormônio do crescimento) e glucagon, onde os mecanismos comportamentais da CRR envolvem o aumento da busca por comida, fome, e motilidade do trato gastrointestinal (Sprague & Arbeláez, 2011; Ritter et al., 2019).

Lamy e colegas (2014) realizaram um estudo do mecanismo de sensibilidade à baixa glicose de neurônios GLUT2<sup>+</sup> GABAérgicos do NTS, os quais modulam a secreção de glucagon via aumento do tônus parassimpático, demonstrando a importância desses neurônios para um dos principais componentes da CRR. Até mesmo a participação dos neurônios hipotalâmicos na CRR está sujeita à modulação por neurônios do NTS. Aklan e colaboradores (2020) mostraram que os neurônios catecolaminérgicos do NTS regulam a fome induzida por hipoglicemia (componente comportamental da CRR) via neurônios hipotalâmicos que compõem o sistema melanocortina.



Figura 2: A função central do NTS de integrar informações periféricas e as respostas na homeostase dos níveis de glicose. As alterações nos níveis glicêmicos são detectadas por sensores periféricos, e pelos próprios neurônios do SNC, como por exemplo os neurônios inibidos por glicose e excitados por glicose no NTS. Os neurônios do NTS formam um complexo circuito de modulação da glicemia com outras regiões do SNC. (A) O circuito envolvendo o tronco encefálico e o hipotálamo que modula o tônus parassimpático e simpático na função pancreática. (B) o circuito entre o SNC e o pâncreas, mostrando as aferências periféricas e eferências via NTS/DMNX para as células alfa e beta pancreáticas, regulando a secreção de glucagon e insulina. (C) no painel superior a interação entre áreas do SNC com o Complexo Dorsal Vagal, e no painel inferior há a representação do NTS rostral, subpostremal, caudal, e o trato solitário. (D, painel superior) além de sinais periféricos conduzidos por fibras nervosas, o NTS também acessa esses sinais via corrente sanguínea. (D, painel inferior) as eferências originadas no NTS, via nervo vago, para o sistema gastrointestinal, parte da resposta de ingestão/busca de/por alimento. Figura adaptada de Faber et al., 2020, e de Troadec et al., 2022. PGA (substânica cinzenta periaquedutal), PVN (Núcleo Paraventricular do Hipotálamo), VMN (Núcleo Ventromedial do Hipotálamo), LHA (Área Lateral Hipotalâmica), ARC (Núcleo Arqueado do Hipotálamo), A5 (Células Noradrenérgicas do Grupo 5), Ra (núcleo pálido da rafe), DMNX (Núcleo Motor Dorsal do Nervo Vago), AP (Área Postrema), IML (Coluna Intermédio Lateral), e DRG (Gânglio da Raiz Dorsal).

Uma questão interessante, mas ainda longe de ser totalmente resolvida, é sobre a relevância de cada área do SNC para o balanço energético. Nos domínios dessa questão, Di Rocco & Grill (1979) mostraram, há mais de 40 anos, que a resposta simpatoadrenal em situação de glicoprivação não necessita do prosencéfalo. Flynn & Grill (1983) demonstraram que ratos descerebrados podem – sob condições de hipoglicemia induzida por insulina – aumentar o consumo de sacarose. Como já vimos, tanto a resposta simpatoadrenal, quanto o aumento de ingestão de açúcares (como a sacarose, por exemplo) são componentes da CRR (Sprague & Arbeláez, 2011; Ritter et al., 2019). Logo, os dados de Di Rocco & Grill (1979) e Flynn & Grill (1983), sugerem que o tronco encefálico pode ser suficiente para desenvolver a CRR. Em uma análise final, são dados que indicam uma alta relevância de participação necessária e suficiente do tronco encefálico – região que envolve o NTS – no balanço energético, mais especificamente no balanço dos níveis de glicose sérica.

#### 1.3. Neurônios sensíveis à glicose no SNC: núcleo do trato solitário em foco

Entre os primeiros estudos sobre a sensibilidade à glicose em neurônios, merece destaque aquele realizado por Anand e colegas (1964). Na década de 1960, eles estudaram neurônios sensíveis à glicose no hipotálamo, usando registros *in vivo* extracelulares de neurônios hipotalâmicos de cães e gatos, e observaram alterações na atividade desses neurônios induzidas por oscilações na glicose sanguínea (Anand et al., 1964). Anteriormente, desde a primeira metade do século XX, o hipotálamo já era conhecido como centro de alimentação e saciedade no SNC (Brooks & Lambert, 1946; Hetherington & Ranson, 1942), o que levou a perguntas sobre a sensibilidade de neurônios às alterações nos níveis de glicose.

Yutaka Oomura e colegas (1974) estudaram os neurônios hipotalâmicos de ratos, e observaram que a glicose inibe a atividade de neurônios do hipotálamo lateral (LH), sendo pioneiros – juntamente com Anand e colegas (1964) – em notar a variação fenotípica de neurônios sensíveis à glicose: neurônios inibidos por glicose, neurônios excitados por glicose e neurônios não responsivos. Já uma das primeiras observações dessas alterações na atividade neuronal em neurônios do tronco encefálico foram feitas por Mizuno & Oomura (1984), especificamente no núcleo do trato solitário.

Dez anos à frente, Khadija Yettefti e colegas (1996) verificaram os dados desses trabalhos registrando potenciais de ação (AP) de neurônios NTS e, além de corroborar com os dados anteriores, perceberam que não há uma homogeneidade ou distribuição organizada desses neurônios no NTS. Atualmente, quem se propõe a estudar esses neurônios corrobora esses achados sobre a variabilidade da sensibilidade de fenótipo e de respostas à glicose (Balfour & Trapp, 2006; Balfour et al., 2007; Murat & Leão, 2019).

Percebe-se que o assunto é alvo de pesquisadores há muito tempo, e que duas regiões se destacaram: o tronco encefálico e o hipotálamo. Então, além das informações periféricas, a sensibilidade à glicose intrínseca desses neurônios é essencial para desempenhar funções como as que constituem a CRR (Ritter & Strang, 1982; Ritter et al., 1980; Ferreira et al., 2001; Fioramonti et al., 2017; Rogers et al., 2018; Ritter et al., 2019; Aklan et al., 2020), em função de regular o nível de glicose no sangue.

De forma geral, a atual nomenclatura - que se baseia em parâmetros eletrofisiológicos celular – dos neurônios sensíveis à glicose é a seguinte: neurônios GI (do inglês *glucose inhibited*, inibido por glicose), neurônios GE (do inglês *glucose excited*, excitado por glicose), e os neurônios não responsivos (NR).

O aumento nos níveis de glicose extracelular, induzem os neurônios GI a um estado de menor atividade e/ou hiperpolariza o potencial de membrana, enquanto a diminuição da glicose extracelular excita esses neurônios e/ou despolariza o potencial de membrana. Na lógica inversa, o aumento nos níveis de glicose extracelular, induzem os neurônios GE a um estado de maior atividade e/ou despolariza o potencial de membrana, enquanto a diminuição da glicose extracelular inibe os neurônios GE e/ou hiperpolariza o potencial de membrana (Fioramonti et al., 2017; Stanley et al., 2019; López-Gambero et al., 2019).

O primeiro trabalho voltado ao mecanismo eletrofisiológico e metabólico da sensibilidade à glicose no NTS foi feito pelo grupo do Professor Stefan Trapp, em 2006. O trabalho analisou os neurônios do complexo dorsal vagal (DVC) como um todo, e foi possível notar a presença de neurônios GE e GI, bem como não responsivos. Além disso, estudou a presença de dois importantes biomarcadores: os canais K<sub>ATP</sub> e a glicoquinase, essenciais para a resposta de neurônios sensíveis à glicose. No ano seguinte, Balfour & Trapp (2007) se voltaram a entender as correntes induzidas por condições de baixa glicose e hipóxia, com enfoque nos neurônios GI. Curioso notar que nesses estudos foi a minoria dos neurônios que respondem às oscilações na glicose (Balfour et al., 2006; Balfour & Trapp, 2007), enquanto Murat & Leão (2019) mostraram que a maioria - aproximadamente 70% - dos neurônios do NTS são responsivos, mais especificamente neurônios GI (Murat & Leão, 2019).

No NTS é possível encontrar uma variedade de fenótipos de neurônios. Dentre esses, os principais são glutamatérgicos (Wang et al., 2003), catecolaminérgicos (McDougal et al.,

2018) e GABAérgicos (Lamy et al., 2014; Boychuk et al., 2015). É provável que os neurônios glutamatérgicos se apresentem em maior quantidade no NTS (Ludwig et al., 2021). Alguns estudos se dedicaram a estudar um desses fenótipos. Lamy e colaboradores (2014) descreveram um mecanismo possível para neurônios GI GABAérgicos do NTS, mecanismo definido pelo GLUT2, AMPK e o canal de vazamento para cátion K+ (K<sub>2P</sub>). Quando em situação de baixa glicose, a razão AMP/ATP intracelular aumenta, o AMP leva à ativação da enzima AMPK, que por sua vez promove o fechamento dos canais K<sub>2P</sub>, levando os neurônios GI GABAérgicos a despolarizar (Lamy et al., 2014).

Além desse trabalho, outros observaram que os neurônios GABAérgicos do NTS são despolarizados pela baixa glicose, além de aumentarem a taxa de disparo de potenciais de ação, característica dos neurônios GI. No entanto, Boychuk e colegas (2015) também notaram que há neurônios GABAérgicos GE no NTS (40%), e que os neurônios GI (33%) aparentemente estão preferencialmente dispostos no NTS lateral e os GE são mais comuns no NTS medial. Eles observaram que os neurônios GABAérgicos GE as pressam glicoquinase, uma enzima chave na sensibilidade à glicose, e os neurônios GABAérgicos GE do NTS tiveram suas respostas a glicose mediada pelos canais K<sub>ATP</sub>, enquanto os neurônios GI GABAérgicos não tiveram o mecanismo definido nesse estudo (Boychuk et al., 2015).

No que diz respeito aos neurônios catecolaminérgicos (neurônios que expressam a enzima tirosina hidroxilase – TH<sup>+</sup>), a participação deles nos mecanismos de controle da glicemia já vem sendo estudado. Esses neurônios formam circuitos neuronais com regiões do tronco e do hipotálamo, tendo importante participação no CRR (Ritter et al., 2006; Ritter et al., 2019). Os neurônios TH<sup>+</sup>-NTS ainda não têm nenhuma caracterização eletrofisiológica da resposta às oscilações de glicose. Roberts e colegas (2017) notaram que a elevação de glicose extracelular aumenta a frequência do disparo de potenciais de ação, porém essa resposta foi predominantemente dependente de mecanismos pré-sinápticos de fibras do trato solitário, isso devido à maior liberação de glutamato induzida pela alta glicose.

Outro estudo, agora de Rogers e colaboradores (2018) - baseado em experimentos de imagem de íons Ca<sup>2+</sup> - mostrou que a resposta de neurônios TH<sup>+</sup>-NTS à baixa glicose ou à 2deoxiglicose, é dependente da integridade astrocitária. No NTS estão presentes dois subgrupos de neurônios catecolaminérgicos: C3 e A2, respectivamente, adrenérgicos e noradrenérgicos (Ritter et al., 2006; Ritter et al., 2019). Sue Ritter e colegas (1998) demonstraram que há uma sensibilidade seletiva à 2-deoxiglicose (2-DG, um estímulo similar a baixa glicose) nos neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico. Observando a expressão de c-fos, eles notaram que os neurônios C3 são ativados, mas os neurônios A2 não são ativados pela 2-DG. Recentemente, demonstrou-se que os neurônios TH<sup>+</sup>-NTS modulam neurônios hipotalâmicos envolvidos nos circuitos neuronais de regulação do comportamento alimentar, resposta essencial também para a CRR (Aklan et al., 2020). Porém, ainda não há a caracterização eletrofisiológica dessa resposta nesses neurônios, como observamos em neurônios GABAérgicos. Assim, essa variabilidade de fenótipos no NTS pode contribuir para uma maior variabilidade de mecanismos usados para detecção das oscilações da glicose extracelular, o que indica alta complexidade das respostas neuronais às flutuações da concentração de glicose extracelular.

Além dos mecanismos de sensibilidade à glicose *per se*, os neurônios sensíveis à glicose podem ser modulados por hormônios (como a leptina, Do et al., 2020), ou por peptídeos como o BDNF (Clark et al., 2011). O BDNF é pouco explorado na literatura, no que concerne ao contexto de resposta de neurônios do NTS às oscilações nos níveis de glicose. O BDNF é uma neurotrofina expressa em diversas áreas do SNC, incluindo o NTS (Conner et al., 1997). Além disso, esse peptídeo é um fator de sobrevivência para neurônios e funciona como um modulador da função de neurônios dos gânglios petroso e nodoso, participando das repostas de barorreflexo e quimiorreflexo (Brady et al., 1999).

Clark e colaboradores (2011) observaram que o BDNF modula negativamente as correntes sinápticas excitatórias (EPSCs) glutamatérgicas em neurônios de segunda ordem do NTS. Somado a isso, esse peptídeo diminuiu a frequência de disparo de potenciais de ação e a amplitude dos potenciais de ação desses neurônios.

Cuéllar e colegas (2017) estudaram como o BDNF modula a resposta hiperglicêmica induzida em modelos de hipóxia, e o que eles notaram de forma geral é que o BDNF modula positivamente a resposta hiperglicêmica mediada pelos neurônios do NTS (Cuéllar et al., 2017). Logo, esses dados nos sugerem que o BDNF *per se* pode ter um efeito direto na excitabilidade dos neurônios do NTS, de forma - por exemplo - a mimetizar os efeitos da baixa glicose, contribuindo para a sensibilidade às oscilações na glicemia. Portanto, resolvemos testar se o peptídeo em questão gera respostas semelhantes às da glicose a 0.5 mM.

Compreender a mecânica da fisiologia dessas respostas comportamentais e hormonais, requer o conhecimento sobre os circuitos neuronais e o mecanismo celular da sensibilidade às alterações da glicose. Como já comentado, o hipotálamo é mais estudado em todos os aspectos desse campo de estudo, principalmente quanto aos mecanismos usados pelos neurônios para detectar as mudanças na concentração de glicose extracelular (Stanley et al., 2019; López-

Gambero et al., 2019). Comentamos a relevância do NTS nas respostas de balanço energético, mais especificamente de regulação dos níveis de glicose, porém notamos poucos estudos voltados aos neurônios do NTS, sobretudo no que concerne aos mecanismos celulares de detecção das oscilações na concentração de glicose extracelular. Logo, levando em conta a relevância do tema e a diminuta exploração científica, decidimos explorar mais os mecanismos de detecção da baixa glicose por neurônios GI do NTS, uma vez que – além dos motivos já citados – o mecanismo usado por neurônios GI, no geral, é pouco compreendido.

#### 2- Objetivos

#### 2.1. Objetivo geral

O presente estudo objetivou explorar os mecanismos de detecção a baixa glicose em neurônios do núcleo do trato solitário (NTS).

#### 2.2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos, visamos avaliar:

a) quais os efeitos da perfusão de solução de baixa glicose (a 0.5 mM) nas propriedades eletrofisiológicas de neurônios do NTS;

b) se a inibição da produção de ATP mitocondrial mimetiza e/ou potencia os efeitos da baixa glicose;

c) se a inibição da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mimetiza o efeito da baixa glicose;

d) a participação da enzima AMPK no mecanismo de sensibilidade à baixa glicose, tanto inibindo, quanto induzindo a atividade da AMPK;

e) se o BDNF mimetiza os efeitos da baixa glicose.

#### 3- Metodologia

#### 3.1 - Animais

Os animais foram fornecidos pelo biotério central do campus da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto. Os animais usados foram ratos *Wistar Hannover* machos de 3 a 6 semanas, e mantidos no biotério de ratos do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os roedores foram alimentados com ração e água *ad libitum*, com um ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurofisiologia e Sinapse do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP. Os procedimentos para o manuseio e sacrifício dos ratos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMRP-USP (protocolo Nº 189/2020).

#### 3.2 - Preparação das Fatias

As fatias do tronco encefálico contendo o NTS de ratos foram obtidas como previamente descrito (Murat & Leão, 2019), com algumas modificações. Os animais foram anestesiados com isoflurano e rapidamente decapitados. Rapidamente, o cérebro foi removido e submergido em uma placa de Petri embebida com solução cerebrospinal artificial (aCSF) gelada (~0°C), modificada para a preparação das fatias, contendo (em mM): 87 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 75 sacarose, 25 D-glicose, 0,2 CaCl<sub>2</sub>, e 7 MgCl<sub>2</sub> (330 mOsm/Kg H2O, pH 7,4 mantido por mistura carbogênica de 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). O tronco encefálico foi isolado, colado a uma base inserida em um cilindro, posteriormente preenchido com uma solução de agarose 2.5% a 38°C. Após a solidificação da agarose, o cilindro foi conectado ao êmbolo de um vibrátomo do tipo Compresstome<sup>@</sup> (Precisionay Instruments), e as fatias de 200 micrômetros foram seccionadas. Então, as fatias coronais do tronco encefálico contendo o NTS subpostremal foram selecionadas e incubadas a 32-33°C por 45 minutos em aCSF com glicose a 5 mM, contendo (em mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 5 D-glicose, 2 CaCl<sub>2</sub>, e 1 MgCl<sub>2</sub> (298 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O, pH 7.35 mantido por mistura carbogênica de 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Após o período de incubação, as fatias foram armazenadas na mesma solução à temperatura ambiente até o início dos experimentos eletrofisiológicos.

A solução de 0,5 mM de glicose foi preparada adicionando uma quantidade equimolar de sacarose para manter a osmolalidade igual às soluções basais iniciais. Além disso, para o registro eletrofisiológico, foram adicionadas a todas as soluções DNQX (*6*,7-*dinitroquinoxaline-2,3-dione*, 10  $\mu$ M) e PTX (Picrotoxina, 100  $\mu$ M), e no caso das drogas solubilizadas em DMSO (dimetil sufóxido), uma quantidade equivalente desse solvente foi adicionada à solução basal (controle), mesmo a porcentagem de DMSO ficando abaixo de 0.1%.

#### 3.3 - Preparação das Drogas

As drogas utilizadas foram: CCCP (*Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone*, *Tocris* biotechne®), Ouabaína (Sigma-Aldrich®), Dorsomorfina (Sigma-Aldrich®), AICAR (*5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside*, *Tocris* biotechne®), BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*, *Cayman Chemical Company*), DNQX (*6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione*, *Cayman Chemical Company*), PTX (picrotoxina, *Tocris* biotechne®), e TTX (Tetrodotoxina citrato, Alomone Labs<sup>TM</sup>). Todas as drogas foram usadas a partir de uma solução mãe (de maior concentração). As soluções aquosas usadas foram: Ouabaína a 1 mM, dorsomorfina a 2 mM, AICAR a 40 mM, PTX a 4 mM, TTX a 1 mM, e BDNF a 100 mg/mL. E as soluções em DMSO (Sigma-Aldirch®) foram a de DNQX a 20 mM e a de CCCP a 5 mM. E as concentrações finais, ou seja, de uso experimental, foram: CCCP a 1 µM, Ouabaína a 0.1 µM, 1 µM, e a 10 µM, dorsomorfina a 4 µM, AICAR a 400 µM, PTX a 100 µM, TTX a 0.5 µM, e de DNQX a 10 µM. BDNF a 100 ng/mL.

#### 3.4 - Técnica de Patch Clamp

As fatias do tronco encefálico contendo o NTS subpostremal de ratos foram transferidas para uma câmara posicionada em um microscópio óptico (BX51WI, Olympus, Tokyo, Japão) e continuamente perfundidas com aCSF (5 mM de glicose) a uma taxa de ~2 mL/min por meio de um sistema dirigido por gravidade. Durante os experimentos, o aCSF foi mantido a uma temperatura de 33 °C por um sistema de aquecimento *inline* (TC-324B, Warner Instruments, Hamden, CT, EUA). Conforme demonstrado na figura 3.A, 3.D, o NTS subpostremal foi identificado pela sua posição abaixo da área postrema, e acima do núcleo dorsal do vago (área



de textura mais granulosa devido ao grande tamanho dos corpos celulares) e do canal central, e entre os dois tratos solitários.

**Figura 3:** Identificação dos neurônios nas fatias subpostremais do NTS. (A) fotomicrografia de uma fatia do tronco encefálico de rato contendo o NTS e a Área Postrema (AP), com a micropipeta usada nos experimentos de *whole-cell patch-clamp* em um neurônio do NTS. (B) Amplificação do campo circulado no painel A, destaca-se a imagem detalhada do neurônio a ser registrado. (C) alterações de voltagem causadas por injeção de correntes evocam potenciais de ação, acusando que a célula a ser registrada é um neurônio. (D) desenho esquemático de um corte sagital do encéfalo (painel superior), destacam-se três cortes coronais (1, 2, e 3) mostrados com mais detalhes no painel inferior: cortes coronais - tais como as fatias usadas para os experimentos - do complexo dorsal vagal (DVC) no tronco encefálico, pode-se notar três tipos de fatias com NTS: a caudal (3), a subpostremal (2), e a rostral (1) [adaptado de Troadec et al., 2022]. NTS: núcleo do trato solitário, DMV ou DMNX: núcleo motor dorsal do nervo vago, AP: área postrema. CC: canal central, ST ou TS: trato solitário.

Os neurônios foram visualizados por uma câmera CCD (Hamamatsu C2741, Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japão) sob óptica de contraste por interferência diferencial (DIC) com uma objetiva de 63x (figura 3.A, detalhe). O registro eletrofisiológico foi realizado em *whole-cell patch-clamp*, com eletrodos confeccionados a partir de capilares de borosilicato (BF150-86-10, Sutter Instruments, Novato, CA, EUA) por meio de um estirador horizontal (P-87, Sutter Instruments). Os eletrodos foram preenchidos com uma solução interna contendo (em mM): 128 K-gluconato, 8 KCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 4 Mg<sub>2</sub>ATP, 0,3 Na<sub>2</sub>GTP, e 10 Nafosfocreatina (295 mOsm/Kg H2O, pH 7,4), resultando em uma resistência da pipeta entre 3 e 5 MΩ.

Os registros foram realizados com um amplificador EPC-10 (HEKA Elektronic, Lambrecht, Alemanha) utilizando o software de aquisição PatchMaster (HEKA Elektronic), em modo *current-clamp* e *voltage-clamp*. Os dados foram adquiridos a 20 kHz e filtrados passa-baixa a 5 kHz (Bessel). Após entrar em configuração *whole-cell*, aguardamos um período de ~10 min para estabilização do potencial de membrana e, durante este período, correntes despolarizantes (1000 ms) foram injetadas para induzir o disparo de potencias de ação com o intuito de confirmar a identidade neuronal da célula (Figura 3.C).

Para medirmos o efeito da baixa glicose nos neurônios do NTS usamos uma solução interna composta de (em mM): 128 K-gluconato, 8 KCl, 10 HEPES, 0,5 EGTA, 4 Mg<sub>2</sub>ATP, 0,3 Na<sub>2</sub>GTP, e 10 Na-fosfocreatina (295 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O, pH 7,4). Em *voltage-clamp* (protocolo IV), mantivemos os neurônios a -70 mV (*holding potential*) e aplicamos 10 pulsos de voltagem de 1 segundo a partir de -105 mV, em passos de 10 mV a cada 5 segundos. Esse protocolo foi executado para 5 e 0.5 mM de glicose. Os parâmetros de capacitância (Cm) e resistência em série (Rs) foram obtidos regularmente. Não usamos neurônios com Rs maior do que 30 Mohm. A Rs foi compensada em até 80%.

Em *current-clamp* (protocolo VI), os neurônios foram mantidos em um potencial de *holding* de -70 mV (para isso foi injetada uma corrente de *holding*), e foram aplicados 15 pulsos de corrente em passos de 25 pA, a partir de -200 pA, com duração de 500 ms. Em seguida, em modo *current-clamp* (protocolo *Gap Free*), o potencial de membrana foi monitorado durante 5 minutos nas fatias contendo o NTS subpostremal incubadas em aCSF com 5 mM de glicose, e depois 10 min em glicose a 0.5 mM. Nos grupos com droga, depois do registro basal, foram registrados 10 min com droga e depois 10 min com droga em 0.5 mM (em alguns grupos não foi possível realizar esse último registro). O potencial de repouso da membrana foi obtido a

partir da moda dos potenciais de membrana ao longo do tempo. Adicionalmente, pulsos hiperpolarizantes de -100 pA (1000 ms) foram aplicados a cada 60 segundos a fim de monitorar a resistência de entrada da membrana. Somente um neurônio por fatia foi registrado, e, portanto, cada neurônio foi considerado como um único 'n'. Até duas fatias por animal foram usadas.

#### 3.5 – Estatística e Análise de dados

Os dados foram extraídos do PatchMaster para tratamento no software IGOR (Wavemetrics, Portland OR) usando rotinas desenvolvidas pelo Dr. André Dagostim (Dagostin et al., 2015). O potencial de membrana foi obtido a partir da moda dos potenciais ao longo do tempo em cada condição. A resistência de entrada foi calculada a partir do coeficiente angular da reta que relaciona voltagem em função da corrente aplicada. A constante de tempo da membrana foi calculada pelo ajuste de uma função exponencial simples para o decaimento do potencial de membrana por injeção de uma da primeira corrente hiperpolarizante do protocolo de VI. Em algumas situações a resistência de membrana e a constante de tempo foram obtidas pela amplitude das hiperpolarizações regulares dadas durante o registro.

Os parâmetros de potencial de ação (PA) foram calculados pelas rotinas customizadas no *software* IGOR (Dagostin et al., 2015). A latência para o disparo do PA, limiar de disparo do PA, pico do PA, e a *halfwidth*, foram adquiridos com base no primeiro potencial de ação disparado pela corrente de reobase durante o protocolo de VI (*current clamp*). A reobase corresponde à corrente do primeiro pulso da VI que houve o disparo do potencial de ação, e a *halfwidth* é o valor em milissegundos da largura do PA no ponto em que 50% da amplitude (diferença em milivolts entre o pico do PA e o limiar de disparo) é atingido. A latência corresponde ao tempo a partir do início do pulso da VI até o limiar de disparo do PA, e o limiar foi calculado a partir das derivadas do PA em função da voltagem de membrana. O limiar foi considerado como o ponto – em voltagem – correspondente à primeira derivada do PA a atingir 2 vezes o desvio padrão do calculado para a linha de base. E por fim, a frequência de disparo do potencial de ação foi adquirida apenas relacionando o número de PA por pulso de corrente na VI.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os dados estão mostrados como valores médios ± erro padrão da média. Os resultados foram comparados por teste-t Student bicaudal pareado, e

por análise de variância (ANOVA) de uma via ou medidas repetidas com teste Fisher's LSD. As diferenças estatísticas foram estabelecidas com p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), e p < 0,001 (\*\*\*).

#### 4- Resultados

#### 4.1. Sensibilidade à baixa glicose em neurônios do NTS

#### 4.1.1. Alterações no potencial de membrana induzidas pela baixa glicose

Desde a década de 1980 a presença de neurônios sensíveis aos níveis de glicose extracelular já era evidenciada (Mizuno & Oomura, 1984), e nos anos subsequentes a 2000, estudos direcionados ao mecanismo dessa sensibilidade mostraram que os neurônios do NTS exibem alterações no potencial de membrana em resposta a mudanças na concentração de glicose extracelular, bem como outros parâmetros discutidos posteriormente (Balfour et al., 2006, 2007; Lamy et al., 2014; Boychuk et al., 2015; Murat & Leão, 2019). Nesse sentido, decidimos começar o estudo do mecanismo de sensibilidade em neurônios GI do NTS reproduzindo as alterações eletrofisiológicas induzidas por 0,5 mM glicose previamente observadas por Murat & Leão (2019).

Configuramos as condições basais e de baixa glicose conforme Murat & Leão, 2019 ou seja - incubamos as fatias com NTS em glicose 5 mM (basal), e para simular a baixa glicose usamos a concentração de 0.5 mM de glicose (Murat & Leão, 2019), o que é fundamentado nas concentrações de glicose que podem ser atingidas no fluido cerebroespinhal em condições hipoglicêmicas (Seaquist et al., 2001).

Monitoramos o potencial de membrana na situação basal (5 mM de glicose) e em seguida na baixa glicose (0.5 mM de glicose), 74.1% dos neurônios responderam como neurônios GI (n = 20), 7.4% como GE (n = 5), e 18.5% (n = 2) com NR (n = 27, 16 animais, figura 4.C). Ou seja, a baixa glicose despolarizou a maioria dos neurônios em 17,3 $\pm$  4,6 mV, de uma média -70,4  $\pm$  3.6 mV para -53,1  $\pm$  5.1 mV (p < 0.01, figura 4.B). A responsividade dos neurônios GI iniciou-se dentro dos cinco primeiros minutos da baixa glicose.

No geral, esses dados corroboram algumas informações de estudos anteriores: a despolarização induzida pela baixa glicose e o fato de a maioria dos neurônios testados serem do tipo GI. Como esses experimentos foram realizados com bloqueadores sinápticos (DNQX  $10 \,\mu$ M, e PTX  $100 \,\mu$ M), conclui-se que boa parte desses efeitos não é dependente da circuitaria neuronal, mas provenientes de atividade intrínseca dos neurônios registrados, assim como

concluíram estudos prévios que usaram bloqueadores sinápticos e/ou TTX (Balfour et al., 2006, 2007; Murat & Leão, 2019).



Figura 4: Efeitos da baixa glicose no potencial de membrana de neurônios GI do NTS. (A) registro representativo do potencial de membrana ao longo do tempo. (B) resumo do efeito da baixa glicose no potencial de membrana, (C) distribuição percentual dos tipos de neurônios responsivos e não responsivos à glicose no NTS. GI = neurônios inibidos por glicose, GE = neurônios excitados por glicose, e NR = neurônios não responsivos. \*\*p < 0.01, teste t pareado de Student. N = 9.

#### 4.1.2. Alterações na resistência de entrada induzidas pela baixa glicose

O NTS tem uma diversidade de fenótipos neurais: neurônios catecolaminérgicos (Rogers et al., 2018), neurônios GABAérgicos (Lamy et al., 2014; Boychuk et al., 2015), neurônios glutamatérgicos (Wang et al., 2003), entre outros, e isso pode estar relacionado a uma diversidade de mecanismos que podem estar envolvidos na resposta à baixa glicose. Lamy e colegas (2014) observaram que a baixa glicose induz um aumento da resistência de entrada em neurônios GABAérgicos GLUT2<sup>+</sup> do NTS, isso porque o mecanismo proposto envolve a inativação de canais de vazamento para íons potássio (K<sub>2P</sub>), levando esses neurônios a despolarizarem (Lamy et al., 2014). Porém, Murat & Leão (2019) observaram uma diminuição na resistência da membrana concomitante à despolarização por baixa glicose.

De acordo com os dados anteriores do nosso laboratório (Murat & Leão, 2019), nós observamos uma diminuição da  $R_{input}$  de -81.3 ± 26.9 MΩ (de 264.2 ± 29.3 MΩ para 182.9 ± 25.6 MΩ, p < 0.05, n = 7, figura 5.A), corroborando com esse resultado, a constante de tempo da membrana (tau) também diminuiu em -3.6 ± 0.9 ms (de 11.97 ± 2.38 MΩ para 8.41 ± 1.76 MΩ, p < 0.05, n = 7, figura 5.B). A constante de tempo compreende matematicamente o produto da capacitância da membrana com a resistência de membrana, logo também reflete alterações na  $R_{input}$ .

Assim, reiterando os dados de nosso laboratório, a resposta à baixa glicose nos neurônios GI do NTS de ratos se dá via mecanismos que implicam na ativação de alguma condutância iônica despolarizante na membrana celular.



Figura 5: Efeitos da baixa glicose na resistência de entrada da membrana de neurônios GI do NTS. (A) resumo do efeito da baixa glicose na resistência de entrada (Rinput). (B) resumo do efeito da baixa glicose na constante de tempo da membrana. \*p < 0.05, teste t pareado de Student. N = 8.

#### 4.1.3. Corrente iônica induzida pela baixa glicose

Balfour & Trapp (2007) ao estudarem a resposta a baixa glicose observaram correntes induzidas pela baixa glicose. Eles evidenciaram uma variabilidade de potenciais de reversão  $(E_{rev})$  dessas correntes. Em torno de 25% desses  $E_{rev}$  eram próximos da reversão do íon potássio  $(E_{K+} = -80 \text{ mV})$ , o que condiz com a inativação dos canais  $K_{2P}$  que Lamy et al., 2014 observaram em neurônios GABAérgicos do NTS (Balfour & Trapp, 2007; Lamy et al., 2014), enquanto o restante se distribui na faixa de -58 mV a +10 mV, o que sugeriu a corrente gerada pela inativação da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase concomitantemente ao aumento de condutância não identificada (Balfour & Trapp, 2007). Essa variabilidade de potenciais de reversão também foi observada por nós, variando de -59 mV a -2 mV, com um neurônio apresentando um  $E_{rev}$  de 97 mV (para o cálculo do  $E_{rev}$  esse neurônio foi excluído, figura 6.C, n = 7).

Nós observamos uma corrente de entrada de  $-209.6 \pm 73.1$  pA a -75 mV (p < 0.05, n = 10, figura 6.B) induzida pela baixa glicose, com o E<sub>rev</sub> de  $-27.89 \pm 10.94$  mV (n = 6, figura 6.B) e figura 6.E), um efeito semelhante aos observados neurônios do NTS de camundongos por
Balfour & Trapp (2007), e de ratos por Murat & Leão (2019). Contudo com um  $E_{rev}$  mais despolarizado em relação ao que Murat & Leão (2019) observaram. Eles notaram que a baixa glicose leva a um aumento na condutância de membrana e à indução de correntes de entrada, de forma que Murat & Leão (2019) notaram uma corrente de entrada com o  $E_{rev}$  de -60 mV (Balfour & Trapp, 2007; Murat & Leão, 2019).

Entre os 10 neurônios GI do NTS que observamos as correntes sensíveis à baixa glicose, verificamos uma variabilidade de respostas já descrita na literatura (Balfour & Trapp, 2007), além dos variados potenciais de reversão (figura 6.C), traçando a regressão linear dessas correntes entre -105 e -55 mV, observamos dois grupos de correntes/neurônios: neurônios que apresentam correntes dependentes de voltagem (figura 6.B, figura 6.E, n = 7), e os que apresentam correntes sem dependência de voltagem (figura 6.D, figura 6.F, n = 3). Essas correntes podem ser derivadas da ativação de correntes pela baixa glicose (figura 6.G), as quais ainda desconhecidas, o que será discutido posteriormente, pois a hipótese de Balfour & Trapp (2007) é que dessas correntes observadas nas figuras figura 6.B e figura 6.D, podem ser correntes da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase sendo inibidas por baixa glicose (baixos níveis de ATP).

Por conseguinte, nossos dados ratificam os achados na literatura, no sentido de entender que a despolarização induzida pela baixa glicose, junto às alterações na R<sub>input</sub> (o que sugere a participação de canais iônicos), são conduzidos por uma corrente iônica de entrada induzida por baixa glicose, cujo potencial de reversão pode ser variado e - predominantemente - em uma faixa superior a -60 mV, portanto, mais positivo que o potencial de repouso da membrana dos neurônios GI do NTS.



**Figura 6:** A baixa glicose induz uma corrente de entrada nos neurônios GI do NTS. (A) traçado representativos das correntes em neurônios GI do NTS: controle (em preto), sob efeito da baixa glicose (em vermelho), e a corrente induzida pela baixa glicose (em azul, subtração da corrente vermelha pela preta). (B, n = 6) correntes dependentes de voltagem induzidas por baixa glicose. (C, n = 6) distribuição dos diversos potenciais de reversão de cada corrente dependente de voltagem. (D, n = 4) correntes não dependentes de voltagem induzidas por baixa glicose.

### 4.1.4. Alterações induzidas pela baixa glicose no potencial de ação

Os parâmetros de PA em resposta à baixa glicose não são bem estudados, geralmente as observações se resumem a observação da frequência de disparo do PA, e o aumento das frequências de disparo dos neurônios GI do NTS já é bem evidenciado na literatura (Balfour et al., 2006; Lamy et al., 2014; Boychuk et al., 2015). Murat e Leão (2019) não estudaram os efeitos da baixa glicose sobre o disparo de potenciais de ação. Nossos resultados mostram que

a baixa glicose não altera a frequência de disparo do PA em função da injeção de corrente (n = 8, figura 7.A), e não modifica a latência (n = 7, figura 7.B) e nem a reobase (n = 7, figura 7.C).



**Figura 7:** A baixa glicose extracelular não altera alguns parâmetros de PA em neurônios GI do NTS. A baixa glicose não altera a (A) frequência de potenciais de ação em função da injeção de corrente, (B) latência para o disparo do PA, e nem (C) a reobase do PA. N = 7.

Para entender mais a respeito da influência que a baixa glicose exerce no potencial de ação, resolvemos analisar outros parâmetros ainda não estudados nos neurônios do NTS sob a condição de baixa glicose. Já é bem estudado que as características da forma dos PAs são influenciadas por uma gama de canais iônicos, e o estudo das alterações dessa forma de onda podem indicar possíveis modulações em condutâncias iônicas específicas (Bean, 2007). Por isso, resolvemos analisar 5 parâmetros do PA: pico do potencial (em mV), Limiar de disparo do PA (em mV), Latência para o disparo (em ms), Reobase e a *Halfwidth*.

Supondo que a baixa glicose diminui a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, devido à diminuição da concentração de ATP intracelular, essa menor atividade da bomba poderia alterar o gradiente de íons Na<sup>+</sup> e K+, o que por sua vez afetaria o pico do potencial de ação. De fato, nós observamos que a baixa glicose induz uma diminuição de  $-12.57 \pm 4.73$  mV (de 45.57  $\pm 4.47$  mV para 33.00  $\pm 3.56$  mV, p < 0.05, n = 7, figura 8.D) no pico do potencial de ação. Ou seja, comparando os picos dos PAs disparados com a corrente de reobase na situação controle (glicose a 5 mM), e na situação de baixa glicose (0.5 mM), observamos uma diminuição de -12.57  $\pm 4.73$  mV no pico do PA disparado pela corrente de reobase.

Além disso, a baixa concentração de glicose levou ao aumento da *Halfwidth* em 0.11  $\pm$  0.04 ms (de 0.50  $\pm$  0.04 para 0.61  $\pm$  0.06 ms, p < 0.05, n = 7, figura 8.A), resultado que indica a modulação de canais iônicos responsáveis pela forma do potencial de ação, e houve também a diminuição do limiar de disparo dos PAs em -7.55  $\pm$  mV (de -37.60  $\pm$  1.23 mV para -45.14  $\pm$ 

2.39 mV ms, p < 0.01, n = 7, figura 8.C), o que condiz com o aumento da excitabilidade induzido pela baixa glicose.



**Figura 8:** A baixa glicose leva a modificações em parâmetros dos PAs de neurônios GI do NTS. Resumos das mudanças induzidas por baixa glicose (A) na *Halfwidth* dos PAs, (B) registro representativo das alterações na Halfwidth e no Pico do PA. (C) Resumo das mudanças induzida por baixa glicose na latência de disparo dos PAs (D) e na reobase dos PAs. \*p < 0.05, teste t pareado de Student. N = 7.

Portanto, a baixa glicose leva a alterações no potencial de ação que podem indicar as dependências desse mecanismo de sensibilidade em relação a componentes chaves na baixa glicose, como os níveis de ATP e a queda de atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Assim, umas das perguntas que fizemos foi se a inibição da produção de ATP mitocondrial poderia mimetizar

os efeitos da baixa glicose. A seguir verificaremos a dependência desses resultados no que concerne ao ATP mitocondrial.

## 4.2. Efeitos do desacoplamento mitocondrial em neurônios do NTS

Os neurônios dependem da geração de ATP pela fosforilação oxidativa para suas demandas energéticas. Para estudar os efeitos da diminuição da síntese ATP mitocondrial nos neurônios do NTS, usamos a droga CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone). O CCCP é um protonóforo, ou seja, cria poros na membrana interna mitocondrial aumentando assim a condutância da membrana a íons H+, desacoplando a cadeia transportadora de elétrons (CTE). Isso leva a uma diminuição no gradiente de H+, diminuindo a energia fornecida à ATP sintase na CTE, diminuindo a produção de ATP (Heytler, 1963; Kasianowicz et al., 1984).

## 4.2.1. Alterações no potencial de membrana induzidas pelo CCCP

A razão ATP/ADP é diminuída em situações de baixa glicose, por isso nos perguntamos se a diminuição da produção de ATP pode mimetizar a baixa glicose, pois importantes proteínas de membrana que participam dos fenômenos eletrofisiológicos, como a bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e canais K<sub>ATP</sub>, por exemplo, dependem diretamente dos níveis de ATP intracelular (Nichols, 2006; Dienel, 2019). Com base no exposto, observamos que os neurônios GI do NTS foram despolarizados pelo CCCP (1  $\mu$ M) em 10.1  $\pm$  2.4 mV (de -67.3  $\pm$  1.8 mV mV para -57.2  $\pm$  2.5 mV, p < 0.01, n = 11, figura 9.B), mimetizando os efeitos da baixa glicose.

No entanto, observamos que há uma rápida hiperpolarização de  $-3.3 \pm 0.9$  mV (de  $-67.3 \pm 1.8$  mV para  $-70.5 \pm 1.9$  mV, p < 0.01, n = 11, figura 9.B) antes da despolarização induzida por CCCP 1 µM. Em trabalhos anteriores do nosso grupo, os canais K<sub>ATP</sub> já foram relacionados com a resposta à baixa glicose de neurônios do NTS. Inclusive, esses canais hiperpolarizam os neurônios do NTS submetidos à baixa glicose por longo período (Murat & Leão, 2019). Desde a década de 1990, o K<sub>ATP</sub> é estudado no controle neural dos níveis de glicose via o NTS (Dallaporta et al., 1999; Dallaporta et al., 2000).

Na figura 9.A podemos notar que mesmo com a despolarização induzida por CCCP, a baixa glicose ainda despolarizou mais o potencial de membrana em 12.00  $\pm$  3.43 mV (de - 55.86  $\pm$  3.81 mV para -43.86  $\pm$  6.27 mV, p < 0.05, n = 7, figura 9.C), o que pode ser devido a um efeito somado da baixa glicose com o CCCP na diminuição dos níveis de ATP intracelular.



**Figura 9: Efeitos do CCCP no potencial de membrana de neurônios GI do NTS.** (A) registro representativo do potencial de membrana ao longo do tempo. (B) resumo do efeito do CCCP no potencial de membrana. (C) resumo do efeito do CCCP e do CCCP+BG no potencial de membrana. BG = baixa glicose, CCCPi = CCCP imediato. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, *ANOVA one-way*. N = 11.

É possível que essa hiperpolarização (Figura 9) tenha sido causada por alguma condutância regulada pelos níveis de ATP – direta ou indiretamente – a mesma que esses neurônios usam para detectar a baixa glicose, porém nós não notamos alterações na resistência de entrada durante a hiperpolarização (figura 11.A), apenas na despolarização. O efeito da baixa glicose em despolarizar ainda mais o potencial de membrana após o CCCP sugere a somação dos efeitos de diminuir a produção de ATP via desacoplamento da CTE, mais a diminuição de substrato para o funcionamento da CTE devido à baixa glicose. É provável que

essa somação de efeito do CCCP com a baixa glicose afete consideravelmente a atividade da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, essa hipótese condiz com o que vimos nos pulsos hiperpolarizantes no protocolo de *Gap Free*. Na figura 11 observamos a resistência de entrada obtida a partir dos pulsos de hiperpolarização, e notamos que o CCCP diminui a resistência de entrada em -53.0  $\pm$  18.4 M $\Omega$  (de 224.0  $\pm$  36.2 M $\Omega$  para 171.0  $\pm$  31.9 M $\Omega$ , p < 0.05, n = 10, figura 11.A), assim como vimos na figura 10 e, curiosamente, a hiperpolarização induzida pelo CCCP (figura 9) não foi acompanhada de alterações na resistência de entrada (figura 11.B), o que pode ser devido à dificuldade de detectar um efeito muito sutil na resistência. E quando observamos a resistência de entrada durante o CCCP mais a baixa glicose, notamos que a baixa glicose não induz diminuição na resistência de entrada (figura 11.A), sugerindo que a despolarização no grupo CCCP+BG (figura 9.C) possa ser em decorrência da diminuição da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase.

## 4.2.2. Alterações na resistência de entrada induzidas pelo CCCP

Como já discutido anteriormente, a baixa glicose induz diminuição da resistência de entrada, bem como do tau da membrana, de acordo com os dados anteriores do nosso grupo (Murat & Leão, 2019). Observamos que essa resposta também é reproduzida pelo desacoplamento mitocondrial via CCCP 1  $\mu$ M. Observamos que após a despolarização induzida pelo CCCP a resistência de entrada reduziu em -100 ± 42 MΩ (de 328 ± 46 MΩ para 218 ± 39 MΩ, p < 0.05, n = 9, figura 10.A), o tau da membrana reduziu em -5.1 ± 1.5 ms (de 12.0 ± 1.5 ms para 6.9 ± 1.2 ms, p < 0.05, n = 9, figura 10.B), esses dados corroboram com a ideia de ativação de alguma condutância pelo CCCP, logo, também fortalece a ideia de que a baixa glicose modula alguma condutância, e muito provavelmente esse é um processo ligado à queda da concentração do ATP intracelular.



**Figura 10: Efeitos do CCCP na resistência de entrada de neurônios GI do NTS.** (A) resumo do efeito do CCCP na resistência de entrada, (B) resumo do efeito do CCCP na constante de tempo da membrana (tau). \*p < 0.05, teste t pareado de Student. N = 9.



Figura 11: Efeitos do CCCP na resistência durante o Gap Free de entrada de neurônios GI do NTS. (A) resumo do efeito do CCCP na resistência de entrada, (B) resumo do efeito do CCCP mais a baixa glicose na resistência de entrada. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.05, BG = baixa glicose, CCCPi = CCCP imediato. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, ANOVA one-way. N = 10.



**Figura 12: Efeitos do CCCP nas propriedades eletrofisiológicas de neurônios NR do NTS.** (A, n = 5) resumo do efeito do CCCP no potencial de membrana. (B, n = 4) resumo do efeito do CCCP na resistência de entrada. (C, n = 4) resumo do efeito do CCCP na constante de tempo da membrana. CCCPi = CCCP imediato.

## 4.2.3. O CCCP não reproduz esses efeitos em neurônios não responsivos

Além dos neurônios GI, conseguimos averiguar as respostas ao CCCP em neurônios NR do NTS. Curiosamente, o CCCP não modificou nenhum desses parâmetros já discutidos, ou seja, o CCCP não alterou o potencial de membrana e nem a resistência de entrada - bem como o tau - dos neurônios NR do NTS (figuras 12.A, figura 12.B, e figura 12.C).

Além disso, nesses neurônios, o CCCP não levou a uma hiperpolarização imediata dos neurônios NR, como observado nos neurônios GI (figura 12.A).

Esses resultados indicam que os neurônios NR parecem mais resistentes à queda dos níveis de ATP como os neurônios GI, pelo menos no que tange a despolarização do potencial da membrana. Interessantemente, o CCCP levou a hiperpolarização em dois neurônios GE (dados não mostrados). Possivelmente esses neurônios seriam os GE, mas esses neurônios não são comuns no NTS, nossos dados mostram que apenas 10% desses neurônios são GE (n = 50, 25 animais), corroborando os dados da literatura (Murat & Leão, 2019), tornando-os difíceis para o estudo de mecanismos de sensibilidade à glicose no NTS.

## 4.2.4. Corrente iônica induzida pelo CCCP

Nossos dados sobre a corrente induzida pela baixa glicose em neurônios GI do NTS corroboram a literatura (Figura 6, Balfour & Trapp, 2007; Murat & Leão, 2019). Tentamos

entender a dependência da corrente sensível à baixa glicose em relação ao ATP intracelular. No entanto, como observado na figura 10.A, o CCCP induz uma hiperpolarização imediata, e há uma certa variabilidade da latência desses fenômenos. Portanto, dividimos as correntes em imediatas (durante a hiperpolarização observada) e tardias (durante a despolarização). O CCCP induz uma corrente de entrada tardia de -95.89  $\pm$  9.53 pA a -75 mV (de -22.55  $\pm$  5.87 pA para -118.4  $\pm$  8.52 pA, p < 0.05, n = 5, figura 13.B), com o E<sub>rev</sub> de -43.12  $\pm$  7.64 mV, dentro da faixa de potenciais de reversão discutidos anteriormente (figura 6.C), entre -60 mV e -20 mV, corrente que leva à despolarização observada pela ação do CCCP (figura 10.A).

O CCCP também induz uma corrente que hiperpolariza imediatamente os neurônios GI do NTS, uma corrente de entrada imediata de 83.10  $\pm$  31.59 pA a -45 mV (p < 0.05, n = 4, figura 13.C), com o E<sub>rev</sub> de -78.92  $\pm$  1.85 mV, um potencial de reversão mais hiperpolarizado que a média do potencial de repouso desses neurônios (-67.27  $\pm$  1.81 mV), o que explica a hiperpolarização induzida por CCCP (figura 10.A). Comparando a reversão das duas correntes, notamos que E<sub>rev</sub> das correntes tardias são mais variadas que as imediatas (figura 13.E), o desvio padrão da primeira é  $\pm$ 15.3 mV, enquanto o desvio padrão da E<sub>rev</sub> das imediatas é apenas  $\pm$  3.7 mV. Dentre essas correntes apareceu apenas uma corrente sem dependência de voltagem.



Figura 13: O CCCP induz corrente de entrada nos neurônios GI do NTS, mas não induz em neurônios NR do NTS. (A) registro representativo da corrente controle (preto), da corrente pós ação do CCCP (vermelho), e da corrente sensível ao CCCP (azul) em neurônios GI, e o pulso de voltagem para evocar essas correntes. (B, n = 5) resumo do efeito do CCCP na corrente de entrada tardia em neurônios GI. (C, n = 4) resumo do efeito do CCCP na corrente de entrada tardia em neurônios GI. (C, n = 4) resumo do efeito do CCCP na corrente de entrada em neurônios NR. (E) comparação dos potenciais de reversão das correntes imediatas e tardias em neurônios GI. \*p < 0.05, teste-t pareado de Student.

Em concordância com os dados de potencial de membrana em neurônios NR do NTS, observamos que o CCCP não reproduz nos neurônios NR a corrente como nos neurônios GI (figura 13.B). Além disso, o  $E_{rev}$  da corrente induzida por CCCP não é diferente do observado na baixa glicose (figura 13.A e figura 6.C), mas a variabilidade sim, o desvio padrão dos  $E_{rev}$  no CCCP é de ±19.27 mV, e na baixa glicose é ±25.48 mV, por isso que não notamos diferença entre os efeitos na tabela 1.

#### 4.2.4. Alterações no potencial de ação induzidas pelo CCCP

Resolvemos entender quais as alterações a baixa glicose podem levar no potencial de ação, e estudamos como os possíveis decréscimos no ATP intracelular podem reproduzir esses efeitos. Na tabela 1, podemos notar que não diferença entre as mudanças geradas pela glicose e pelo CCCP, sugerindo que o CCCP reproduz os efeitos da baixa glicose, entre eles os relacionados ao potencial de ação (tabela 1), o limiar do potencial de ação diminuiu -10.82  $\pm$  3.18 mV (de -35.70  $\pm$  1.87 mV para -46.52  $\pm$  3.82 mV, p < 0.05, n = 5, figura 14.A), o pico do potencial de ação diminuiu em -16.60  $\pm$  3.62 mV (de 47.58  $\pm$  4.04 mV para 30.98  $\pm$  6.65 mV, p < 0.05, n = 5, figura 14.B), e a *Halfwidth* aumentou em 0.18  $\pm$  0.06 ms (de 0.45  $\pm$  0.05 ms para 0.63  $\pm$  0.10 ms, p < 0.05, n = 5, figura 14.C). Além disso, o CCCP não alterou a reobase e latência do potencial de ação (figuras 15.A e 15.B), bem como na baixa glicose. No entanto, o CCCP - curiosamente - não aumentou a frequência de disparo dos PA em função das correntes aplicadas (figura 15.C).

No geral, observamos que o CCCP reproduz os efeitos da glicose a 0.5 mM, e isso é um indício - considerando que o CCCP leve a uma diminuição dos níveis intracelular de ATP - de que o queda na concentração de ATP devido ao baixo nível de substrato de glicose para síntese de ATP, é fundamental na detecção do nível de glicose extracelular, e um possível parâmetro para os neurônios GI do NTS.

Parâmetros	Baixa glicose (média ± EPM)	CCCP (média ± EPM)
Potencial de membrana (mV)	-53.1 ± 5.1	$-57.2 \pm 3.1$
$E_{rev}$ (mV)	$-27.0 \pm 12.7$	$-35.8\pm9.6$
$R_{input}$ (MQ)	$182.9\pm25.6$	$178.2 \pm 27.3$
Corrente induzida a -75 mV (pA)	$-207.8 \pm 84.3$	$-95.9\pm9.5$
Tau (ms)	$8.4 \pm 1.8$	$6.3\pm1.2$
Pico do PA (mV)	$34.2\pm5.0$	$30.9\pm6.6$
Halfwidth do PA (ms)	$0.64\pm0.08$	$0.63\pm0.10$
Limiar do PA (mV)	$-47.4 \pm 2.6$	$-46.5 \pm 3.8$

Tabela 1: Comparação dos efeitos da baixa glicose e do CCCP.



**Figura 14: O CCCP leva às alterações em parâmetros do potencial de ação de neurônios GI do NTS.** (A) Resumos dos efeitos do CCCP no limiar do PA, (B) no pico do PA, (C) *Halfwidth* do PA. Em (D) o registro representativo de um PA controle (preto) e um PA alterado pelo CCCP (vermelho). \*p < 0.05, teste t pareado de Student. N = 5.



**Figura 15: O CCCP não altera todos os parâmetros do potencial de ação de neurônios GI do NTS.** (A) resumo dos efeitos do CCCP na Reobase do PA, (B) na latência do PA, e na (C) frequência de disparos dos PAs. N = 5.

## 4.3. Efeitos da inibição da bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase em neurônios do NTS

Como já comentado, os canais  $K_{ATP}$ , e a Bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase são efetores eletrofisiológicos com dependência direta dos níveis de ATP, mais especificamente da razão ATP/ADP (Nichols, 2006; Dienel, 2019). Balfour & Trapp (2007) investigaram a corrente induzida pela inibição da bomba, achando certa semelhança na corrente induzida pela inibição metabólica e a inibição da bomba (Balfour & Trapp, 2007). Além disso, Silver & Erecinska (1998) observaram que neurônios GI hipotalâmicos possivelmente hiperpolarizaram em elevados níveis de glicose, devido a uma maior atividade da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (Silver & Erecinska, 1998).

Uma das características que diferencia a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase dos outros tipos P de ATPases, é a modulação que esteroides cardiotônicos exercem sobre a enzima. Um exemplo é a inibição induzida pela ouabaína (Pierre & Xie, 2006). Com base nisso, resolvemos estudar a participação da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase na sensibilidade à baixa glicose, observando se a inibição da bomba poderia mimetizar os efeitos da glicose a 0.5 mM.

# 4.3.1. Alterações no potencial de membrana e na resistência de entrada induzidas pela Ouabaína

A principal função da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase é manter o gradiente iônico de Na<sup>+</sup> e K+ (Clausen et al., 2017), e a inibição da atividade dessa bomba leva a despolarização da membrana celular (Brisson et al., 2014) devido à diminuição dos gradientes iônicos desses íons. A participação dessa proteína ainda não é bem definida na literatura sobre a sensibilidade aos níveis de glicose, pois é fato que todas as células animais expressam essa bomba (Pierre & Xie, 2006; Clausen et al., 2017), no entanto apenas alguns tipos celulares são sensíveis às oscilações nos níveis de glicose. Discutiremos isso posteriormente.

A ouabaína a 1  $\mu$ M e a 10  $\mu$ M levou a despolarização dos neurônios do NTS. A 10  $\mu$ M a Ouabaína levou a um maior efeito, despolarizando o potencial de membrana em 13.63 ± 3.14 mV (de -66.50 ± 1.18 mV para -52.88 ± 2.64 mV, p < 0.01, n = 8, figura 16.A), respectivamente. No entanto, a resistência de entrada - bem como a constante de tempo da membrana (tau) - não foram alterados pela ouabaína (figura 16.B e 16.C, respectivamente), o que contribui com a ideia de que o mecanismo usado pelos neurônios para detectar os níveis de glicose, envolve a modulação de condutâncias na membrana dos neurônios do NTS.



Figura 16: Efeitos da Ouabaína nas propriedades eletrofisiológicas de neurônios do NTS. (A, n = 8) resumo do efeito da Ouabaína no potencial de membrana. (B, n = 6) resumo do efeito da Ouabaína na resistência de entrada. (C, n = 6) resumo do efeito da Ouabaína na constante de tempo da membrana. (D) registro representativo do potencial de membrana ao longo do tempo com o aumento progressivo da concentração de Ouabaína (0.1, 1, e 10  $\mu$ M). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, *ANOVA one-way*.

#### 4.3.2. Corrente iônica induzida pela Ouabaína

A participação da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase no mecanismo de sensibilidade de neurônios sensíveis à glicose já foi estudado no hipotálamo (Silver & Erecinska, 1998), e nos neurônios do DVC, incluindo o NTS (Balfour & Trapp, 2007). Balfour & Trapp (2007) observaram que a corrente induzida pela inibição da bomba tem certa semelhança com desacoplamento mitocondrial por azida ou cianeto, no entanto não houve uma reversão determinada para a corrente gerada pela inibição da bomba, diferente da corrente induzida por azida ou cianeto (Balfour & Trapp, 2007).

A 10  $\mu$ M a Ouabaína induziu uma pequena corrente de entrada de -35.83 ± 17.37 pA (n = 7, figura 17.B) a -75 mV, com o E<sub>rev</sub> de -46.72 ± 18.59 mV (n = 4, mais um neurônio com E<sub>rev</sub> em 182 mV, portanto, excluído do cálculo do E<sub>rev</sub>), com um desvio padrão de ±37.18 mV, sugerindo a variabilidade já observada anteriormente, e nesse grupo também observado dois neurônios com correntes não dependente de voltagem dentro do intervalo de potenciais de reversão das correntes induzidas pela baixa glicose, é ligeiramente diferente da corrente induzida pelo CCCP.

A corrente induzida por ouabaína está de acordo com a despolarização induzida por ela, e em um quadro geral é possível que a inibição da atividade da bomba tenha alguma participação na corrente induzida pela baixa glicose, no entanto, vimos que a resistência de entrada dos neurônios do NTS não é alterada pela inibição da bomba, como se espera. Mais à frente veremos as alterações nos potenciais de ação, e qual a relação desses dados com os dados do CCCP.



Figura 17: A Ouabaína induz uma pequena corrente de entrada nos neurônios do NTS. (A) registros representativos da corrente controle (em preto), da corrente resulta da ação da Ouabaína a 10  $\mu$ M (em vermelho), e a corrente induzida pela Ouabaína a 10  $\mu$ M (em azul), e o pulso teste para evocar essas correntes. (B, n = 7) resumo do efeito de diferentes concentrações da Ouabaína (0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, e 10  $\mu$ M) na corrente da membrana. (C, n = 5) resumo do efeito de 10  $\mu$ M de Ouabaína na corrente de membrana. (D) os dois tipos de correntes sensíveis a ouabaína a 10  $\mu$ M: 5 com dependência de voltagem, com inclinação (*slope*) positiva (em azul), e 2 sem dependência de voltagem, com inclinação (*slope*) negativa (em verde). (E) a distribuição dos diversos potenciais de reversão das duas correntes.

#### 4.3.3. Alterações no potencial de ação induzidas pela Ouabaína

Nos perguntamos se as alterações nos parâmetros de PA geradas pela baixa glicose poderiam ser consequência da inibição da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Nenhum dos parâmetros de potencial de ação foi alterado pela Ouabaína (figura 18), ou seja, os efeitos da inibição da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> não reproduziram os efeitos da baixa glicose, sugerindo que as alterações dos parâmetros de PA pela baixa glicose não são atribuídas à Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.

Relacionando com os dados do CCCP (figura 14), em que os parâmetros de PA seguem o observado na baixa glicose, podemos notar que há uma dependência da diminuição do ATP intracelular, mas essa função não se dá por meio da diminuição da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. E levando em conta, a discussão sobre a ativação de alguma condutância, é possível que essas alterações nos PA estejam em função de certas condutâncias (canais iônicos) alteradas pelo estado de baixos níveis de glicose/ATP intracelular. Concluímos que a despolarização pela ouabaína provavelmente se deva a inibição de sua atividade eletrogênica.



**Figura 18:** A ouabaína não leva à alterações nos parâmetros do potencial de ação (PA) de neurônios do NTS. (A) *Halfwidth* do PA, (B) limiar do PA, (C) latência do PA, (D) reobase do PA, (E) pico do PA, e em (F) frequência de disparo dos PAs. N = 6.

### 4.4. Efeitos da inibição da AMPK em neurônios do NTS

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é uma enzima com três subunidades com diversos sítios de modulação, e uma das formas de regulação da atividade dessa enzima, é via modulação alostérica com AMP - na subunidade gama - que leva à ativação da AMPK. Essa enzima é central, e interage com diversas vias metabólicas, sendo muito importante na homeostase energética (Garcia & Shaw, 2017; Herzig & Shaw, 2018).

A AMPK modula diversos canais iônicos (Andersen & Rasmussen, 2012) o que a torna de interesse para estudar os fenômenos eletrofisiológicos. A literatura já aponta a participação da AMPK expressa no NTS na CRR, sendo assim relevante para o balanço energético envolvendo a glicose (Hayes et al., 2009; Mandal & Briski, 2019). Além disso, a atividade da AMPK no NTS parece ser essencial para o papel da AMPK expressa em áreas hipotalâmicas, regiões que integram todo o mecanismo da CRR (Mandal & Briski, 2019).

Em razão disso, resolvemos estudar se a AMPK poderia estar envolvida nas respostas à baixa glicose já explanadas. Para isso usamos um antagonista (Dorsomorfina 4  $\mu$ M), e um agonista da AMP (AICAR 400  $\mu$ M; Kim et al., 2016).

4.4.1. Alterações no potencial de membrana e na resistência de entrada induzidas pela Dorsomorfina

O esperado com a inibição da AMPK por desomorfina, era que não levasse a alterações relevantes no potencial de membrana. Concomitante a isso, a inibição dessa enzima - considerando que ela participe desse mecanismo - aboliria em parte a despolarização induzida por baixa glicose. Mas o que observamos é que a dorsomorfina induz uma contínua e acentuada despolarização do potencial de membrana dos neurônios do NTS (figura 19.A), o que prejudicou a análise desses resultados de forma geral.

A dorsomorfina 4  $\mu$ M despolarizou o potencial de membrana em -10.25 ± 1.89 mV (de -74.25 ± 2.84 mV para -64.00 ± 3.08 mV, p < 0.05, n = 4, figura 19.A) esse efeito pareceu ser contínuo ao longo do tempo, dificultando a interpretação dos dados. A dorsomorfina mais a baixa glicose despolarizou o potencial de membrana em mais -14.75 ± 4.42 mV (de -64.00 ± 3.08 mV para -49.25 ± 3.57 mV, p < 0.05, n = 4, figura 19.A). Porém, curiosamente, além da dorsomorfina não alterar a resistência de entrada (figura 19.B) - bem como a constante de tempo da membrana (figura 19.C) - a droga aparentemente impediu que a baixa glicose

diminuísse a resistência de entrada (figura 19.B), e a constante de tempo da membrana (figura 19.C).



Figura 19: Efeitos da dorsomorfina nas propriedades eletrofisiológicas de neurônios GI do NTS. (A) resumo do efeito da dorsomorfina no potencial de membrana. (B) resumo do efeito da dorsomorfina na resistência de entrada. (C) resumo do efeito da dorsomorfina na constante de tempo da membrana de neurônios responsivos. (D) registro representativo do potencial de membrana ao longo do tempo. N = 4, \*p < 0.05, *ANOVA one-way*. BG = baixa glicose, dorsoM = dorsomorfina.

É possível supor que as alterações de resistência de entrada induzidas pela baixa glicose tenham certa dependência da AMPK, o que faria sentido com a aparente inibição que a dorsomorfina gerou no aparecimento desses efeitos, mas é necessário cautela na interpretação dessa informação. Lamy e colegas (2014) observaram que a baixa glicose induzia o aumento da resistência de entrada e a despolarização de neurônios GABAérgicos do NTS, devido ao fechamento de canais  $K_{2P}$  via AMPK, e ao inibir a AMPK com dorsomorfina (150  $\mu$ M) eles observaram que a resistência de entrada não era mais alterada, e os neurônios GABAérgicos hiperpolarizar na presença de baixa glicose (Lamy et al., 2014).

## 4.4.2. Alterações no potencial de ação induzidas pela Dorsomorfina

A dorsomorfina apenas levou ao aumento da frequência de disparo de potenciais de ação em função de corrente aplicada (figura 20.F) quando somada à baixa glicose. Em relação aos outros parâmetros de PA, a dorsomorfina não levou a nenhuma alteração (figura 20), no entanto algumas modificações na resposta à baixa glicose foram notadas: baixa glicose diminui o limiar de disparo dos PAs e o pico do PA em relação à situação basal (figura 20.A e figura 20.C, respectivamente), e diminuiu a reobase em relação ao grupo só com dorsomorfina (figura 20.B). No geral, esses resultados mostram que a dorsomorfina não impede os efeitos da baixa glicose sobre o disparo de PAs.



Figura 20: A dorsomorfina leva a alterações em alguns parâmetros do potencial de ação de neurônios GI do NTS. Resumos dos efeitos da dorsomorfina no (A) limiar do PA, (B) na Reobase do PA, (C) no Pico do PA, (D) na *Halfwidth* do PA, (E) na Latência do PA, (F) e na frequência de disparo dos PAs em função da corrente aplicada, diferença mostrada entre controle e dorsoM+BG é a comparação das correntes evocadas por 150 pA. N = 4. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, *ANOVA one-way*. BG = baixa glicose, dorsoM = dorsomorfina.

Em 2007, Bain e colaboradores estudaram inibidores teoricamente seletivos para determinadas proteínas quinases, e notaram que a dorsomorfina é uma droga de baixa especificidade para a enzima AMPK. Mesmo com IC<sub>50</sub> entre 0.1 e 0.2  $\mu$ M, essa droga inibe diversas outras quinases nessa faixa de concentração, portanto não é recomendada para o estudo de funções da AMPK (Bain et al., 2007), tornando de difícil interpretação os dados anteriormente apresentados. É importante notar que nós usamos dorsomorfina a 4  $\mu$ M, diferente de Lamy e colegas (2014) que usaram 150  $\mu$ M, uma concentração muito elevada, o que pode ter gerado efeitos não específicos.

#### 4.5. Efeitos da ativação da AMPK em neurônios do NTS

Para estudar como a ativação da AMPK pode mimetizar os efeitos da baixa glicose em neurônios do NTS, usamos o composto AICAR a 400  $\mu$ M, um ativador direto da AMPK via subunidade gama, mesmo mecanismo do AMP (Kim et al., 2016). Anteriormente, Lamy e colegas (2014) observaram que o AICAR reproduz os efeitos da baixa glicose em neurônios GABAérgicos GLUT2+ do NTS, confirmando - por imunohistoquímica - que aproximadamente 68% dos neurônios GABAérgicos expressam p-AMPK $\alpha$ .

# 4.5.1. Alterações no potencial de membrana e na resistência de entrada induzidas pelo AICAR

Uma vez que o AICAR simula um aumento de AMP intracelular, espera-se que o AICAR despolarize os neurônios, pois há uma possibilidade de a AMPK participar no mecanismo de detecção de baixa glicose em neurônios GI, o que já foi observado em neurônios GABAérgicos GLUT2+ no NTS, como já comentado anteriormente (Lamy et al., 2014). No entanto, no geral o AICAR não levou à despolarização dos neurônios do NTS (figura 21.A), mas na sequência a glicose a 0.5 mM induziu a despolarização de 9.50  $\pm$  3.06 mV (de -69.67  $\pm$  2.67 mV para -60.17  $\pm$  3.02 mV, p < 0.05, n = 6, figura 21.A).

Assim como a dorsomorfina, o AICAR não reproduziu o esperado no potencial de membrana (figura 21.A), mas levou a uma alteração esperada na resistência de entrada desses (figura 21.B), o AICAR levou a um pequeno decréscimo na resistência de entrada, diminuindo a resistência em  $-30.25 \pm 10.40 \text{ M}\Omega$  (de 274.6  $\pm 34.5 \text{ M}\Omega$  para 244.4  $\pm 37.8 \text{ M}\Omega$ , p < 0.05, n = 6, figura 21.B), mas a constante de tempo da membrana não foi alterada pelo AICAR, mas a baixa glicose induziu a diminuição do tau em relação ao controle (figura 21.C).

O AICAR induz a despolarização dos neurônios GABAérgicos do NTS, e aumenta a resistência de entrada, pois a ativação da AMPK leva a inibição dos canais  $K_{2P}$  (Lamy et al., 2014). Nossos dados mostram que a despolarização de neurônios do NTS (figura 21.A), induzida pela baixa glicose, é acompanhada pela diminuição da resistência de entrada, e o AICAR reproduz esse efeito da baixa na resistência (figura 21.B), o que pode ter uma relação no mecanismo como um todo.



Figura 21: Efeitos do AICAR nas propriedades eletrofisiológicas de neurônios do NTS. (A) resumo do efeito do AICAR no potencial de membrana, (B) resumo do efeito do AICAR na resistência de entrada. (C) resumo do efeito do AICAR na constante de tempo da membrana. (D) registro representativo. BG = baixa glicose. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, *ANOVA one-way*. BG = baixa glicose, n = 6.

Há ressalvas na interpretação do AICAR também, pois além de ser um intermediário menos potente que o AMP (ZMP), o AICAR - por ser um modulador alostérico que mimetiza o AMP - pode regular outras enzimas AMP-dependentes (Kim et al., 2016). É válido lembrar que a AMPK também é regulada por fosfatases e quinases, esse tipo de modulação leva a alterações da atividade da AMPK mais potentes que a modulação alostérica (Yan et al., 2018).

### 4.5.2. Alterações no potencial de ação induzidas pelo AICAR

O AICAR não produziu nenhum dos efeitos que a baixa glicose induziu nos parâmetros de potencial de ação (figura 22). Além disso, quando esses parâmetros foram analisados na

presença de baixa glicose mais o AICAR, as alterações causadas pela baixa glicose nos PAs foram curiosamente inibidas pelo AICAR (figura 22).



**Figura 22: O AICAR não leva à alterações nos parâmetros do potencial de ação de neurônios GI do NTS.** (A) Reobase, (B) Limiar, (C) Pico, (D) Latência, (E) *Halfwidth*, e (F) frequência de disparos de PA em função da corrente aplicada. BG = baixa glicose. N = 6.

## 4.6. Efeitos do BDNF em neurônios do NTS

Nossos resultados mostraram que o BDNF - na concentração de 100 ng/ml - não reproduziu os efeitos da baixa glicose. Não houve alteração do potencial de membrana (figura 23.A, figura 23.D), nem a resistência de entrada (figura 23.B), nem a constante de tempo da membrana (figura 23.C). O BDNF também não induziu corrente de entrada relevante para a resposta (figura 23.E), logo, de forma geral o esse peptídeo não reproduziu nenhuma dessas respostas comparado aos resultados da baixa glicose.



**Figura 23: O BDNF a 100 ng/ml não despolariza os neurônios do NTS, e não induz corrente de entrada como na baixa glicose.** (A) resumo do efeito do BDNF no potencial de membrana. (B) resumo do efeito do BDNF na resistência de entrada. (C) resumo do efeito do BDNF na constante de tempo da membrana. (D) registro representativo do potencial de membrana ao longo do tempo. (E) o resumo do efeito do BDNF na corrente de membrana dos neurônios do NTS. N = 6.

No que diz respeito aos parâmetros de potencial de ação, o BDNF levou a alterações em apenas dois parâmetros (figura 24). Houve uma diminuição do limiar de disparo dos PAs -  $2.33 \pm 0.61$  mV (de -40.33 ± 1.40 mV para -42.67 ± 1.56 mV, p < 0.05, n = 6, figura 24.B), e uma diminuição na latência do PA em -31.33 ± 7.22 ms (de -68.33 ± 9.08 ms para 37.00 ± 15.33 ms, p < 0.01, n = 6, figura 24.C).

Diferentemente da observação de Clark e colaboradores (2011), em que o BDNF diminui a frequência de disparo de PAs, nós averiguamos que esse composto não influencia diretamente a frequência de disparo dos neurônios do NTS (figura 24.F). Mas é curioso notar a diminuição do limiar (figura 24.B) e da latência (figura 24.C) do potencial de ação pelo BDNF, pois esses resultados podem indicar uma modulação fina da excitabilidade neuronal, mesmo não sendo algo tão aparente.



**Figura 24: BDNF não leva às alterações na maioria dos parâmetros do potencial de ação (PA) de neurônios do NTS.** (A) *Halfwidth* do PA, (B) limiar do PA, (C) latência do PA, (D) Rheobase do PA, (E) pico do PA, e em (F) frequência de disparo dos PAs e função da corrente aplicada. \*\*p < 0.01, teste t pareado de Student. N = 6.

No geral, o BDNF não mimetiza os efeitos da baixa glicose, logo, é possível que a participação dele na atividade autonômica do NTS seja como um modulador fino da excitabilidade neuronal, mas para essa hipótese ter consistência são necessários mais estudos voltados a essa questão. Talvez esse peptídeo necessite de um tempo mais prolongado de ação nos neurônios do NTS, ou a concentração dele precise ser mais elevada para efeitos mais evidentes aparecerem, apesar que a concentração testada já seja bastante elevada.

### 5- Discussão

Desde a década de 1980, a presença de neurônios sensíveis aos níveis de glicose extracelular já era evidenciada (Mizuno & Oomura, 1984), e nos anos subsequentes a 2000 estudos direcionados ao mecanismo dessa sensibilidade mostraram que os neurônios do NTS têm seus potenciais de membrana e disparos de potenciais de ação alterados por mudanças na concentração de glicose extracelular (Balfour et al., 2006; Lamy et al., 2014; Boychuk et al., 2015; Murat & Leão, 2019).

O mecanismo usado por neurônios GE é o clássico mecanismo eletrofisiológico que as células  $\beta$ -pancreáticas usam para secretar insulina, ou seja, usam transportadores GLUT (sendo o GLUT2 um biomarcador para sensibilidade à glicose). A glicose é fosforilada pela glicoquinase a glicose-6-fosfatp, então entra nas vias catabólicas levando a produção de ATP, aumentando a razão ATP/ADP, e por sua vez bloqueando os canais  $K_{ATP}$  – canal iônico fundamental para a resposta de neurônios GE e das células  $\beta$ -pancreáticas – induzindo a despolarização dessas células (Stanley et al., 2019; López-Gambero et al., 2019).

## 5.1- Os efeitos da baixa glicose em neurônios GI do NTS

Nossos resultados reproduziram dados anteriores publicado pelo nosso grupo de pesquisa (Murat & Leão, 2019). A baixa glicose despolariza o potencial de membrana da maioria dos neurônios do NTS, denominados de neurônio inibidos por glicose (do inglês, *inhibit glucose* - GI). Ou seja, quando submetidos ao aumento da concentração de glicose no meio, esses são inibidos, e quando submetidos a diminuição dos níveis de glicose, esses neurônios GI são excitados. A despolarização do potencial de membrana desses neurônios (figura 4.B) é ocasionada por uma corrente de entrada induzida por baixa glicose (figura 6). Além disso, a baixa glicose leva a uma diminuição da resistência de entrada (figura 4.C), confirmando as características desses neurônios do NTS observadas na literatura (Balfour & Trapp, 2007; Murta & Leão, 2019).

Observamos que diversas alterações nos parâmetros de PA são ocasionadas pela baixa glicose (figura 8 e figura 9), importantes resultados para caracterizar a resposta à baixa glicose, posteriormente importante para comparar às respostas da inibição da síntese de ATP mitocondrial e da inibição da atividade da bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase com a resposta na baixa glicose. A baixa glicose aumenta a frequência de disparo de PA em função de corrente injetada

65

(figura 7), bem como aumentou a largura do potencial, o limiar de disparo e o pico do PA (figura 8 e figura 9) e todas essas mudanças - com exceção da frequência de disparo - parecem ser dependentes da diminuição da produção de ATP ocasionada pela baixa glicose, porém isso não se dá via inativação da bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, e muito provável que também não seja intermediada pela AMPK.

Uma diminuição na concentração de glicose extracelular pode levar a diminuição dos níveis de ATP intracelular (Morciano et al., 2020), e com menos ATP disponível para a manutenção do gradiente de íons, sobretudo pela bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, a alteração do gradiente de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> pode levar a diminuição do pico do PA, já que o valor de potencial do pico é próximo ao potencial de reversão do Na<sup>+</sup>. Nós observamos que baixa glicose leva à diminuição do pico do potencial de ação (figura 8), porém observamos que essa diminuição do pico do PA não é reproduzida pela inibição da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (figura 18.E), mas é reproduzido pelo desacoplamento da CTE (figura 14.B). Logo, a diminuição do pico do PA está relacionada com a diminuição da produção de ATP mitocondrial, mas aparentemente essa diminuição no ATP intracelular não está ligado com a diminuição da atividade da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e diminuição dos gradientes de sódio próximos a membrana, ou seja, alguma outra via relacionada ao ATP está gerando essa alteração. Alterações em condutâncias de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> levam a diversas alterações no PA (Bean, 2007). Um exemplo disso é a abertura de canais K<sub>ATP</sub> em musculatura esquelética de camundongos. O aumento de condutância de K<sup>+</sup> por esses canais leva a uma diminuição da amplitude de potencial de ação (Gong et al., 2003).

A baixa glicose leva à diminuição do limiar de disparo do PA (figura 9.B) e ao aumento da *Halfwidth* do PA (figura 9.A). Esse último parâmetro é a meia largura - em escala temporal - da metade da amplitude do potencial, ou seja, é um parâmetro de largura entre a fase de despolarização e a fase de repolarização do PA (Bean, 2007). Kasten e colaboradores (2007) estudaram como diversos canais para K<sup>+</sup> regulam parâmetros de potencial de ação em neurônios talamocorticais. Eles observaram que a inibição de condutância de K<sup>+</sup> por TEA (tetraetilamônio, um inibidor seletivo de K<sub>v</sub>) aumenta a *Halfwidth* do PA. Isso também foi observado com a inibição de canais K<sub>ATP</sub>. Além disso, eles observaram que o limiar do potencial de ação diminui com a inativação específica de canais K<sub>v</sub>7, bem como observaram que a inibição de condutância de K<sup>+</sup> sensíveis a Ba<sup>+2</sup> (Kir 2.1, GIRK, Kir2.2, e Kir2.3) diminui o limiar de disparo, enquanto a ativação dos K<sub>ATP</sub> aumenta o limiar (Kasten et al., 2007).

Porém, considerando que a baixa glicose leve à ativação dos K<sub>ATP</sub>, por aumentar a razão ADP/ATP, não faria sentido atribuir o que observamos na figura 9.A - aumento da largura do

potencial de ação - a ativação dos canais  $K_{ATP}$  nos neurônios GI do NTS. A ativação dos canais de vazamento para Na<sup>+</sup> (NALCN) poderiam gerar a queda do limiar e ao aumento do disparo de potencial de ação. Esses canais são amplamente expressos no NTS (Resch et al., 2017; Do et al., 2020), e estão relacionados com a modulação da excitabilidade celular no contexto da sensibilidade à glicose em neurônios da *substantia nigra* (Lutas et al., 2016).

O canal de vazamento para Na<sup>+</sup> (NALCN) é uma possibilidade de mecanismo dessa resposta, pois as características da corrente desse canal estão presentes na corrente induzida por baixa glicose: o NALCN apresenta uma corrente de vazamento de íons Na<sup>+</sup>, bem como a corrente que nós registramos (figura 6.B), e com o  $E_{rev}$  próximo de zero (Lu et al., 2007; Impheng et al., 2021). A abertura desses canais explicaria a diminuição da resistência de entrada observada, e a combinação da abertura dos NALCN e K<sub>ATP</sub> poderiam explicar a variabilidade de potenciais de reversão entre -60 e 0 mV encontrada nos nossos dados (figura 6.E) e na literatura (Balfour & Trapp, 2007). No entanto, não chegamos a testar essa hipótese ainda. O NALCN desempenha importante papel em neurônios relacionados à homeostase energética, por exemplo: a leptina despolariza neurônios do NTS via a ativação dos NALCN (Do et al., 2020). É justamente os NALCN que medeiam a resposta de neurônios da substância negra às oscilações nos níveis de glicose extracelular (Lutas et al., 2016). Em neurônios fusiformes do núcleo coclear dorsal, essa corrente despolariza o potencial de membrana, contribuindo para a geração e disparos de potencial de ação espontâneos (Ceballos et al., 2016).

Podem ser diversos os mecanismos envolvidos na resposta à baixa glicose. E nesse sentido, é vero notar que o NTS controla múltiplas funções autonômicas, pois recebe muitas informações de praticamente todas as vísceras do nosso corpo. Ultimamente, pesquisadores têm se dedicado a desvendar toda essa complexa circuitaria (Zhao et al., 2022). Em concordância com esses dados, o NTS possui diferentes fenótipos celulares – incluindo neurônios – dentre esses os principais são glutamatérgicos, catecolaminérgicos, e GABAérgicos, os quais são essenciais no balanço energético, incluindo a regulação do apetite. Dentre esses fenótipos, os neurônios glutamatérgicos são os mais comuns (Ludwig et al., 2021).

O único estudo que chegou a um mecanismo mais claro para neurônios GI do NTS foi o de Lamy et al., 2014. O mecanismo descrito é específico para neurônios GABAérgicos que expressam GLUT2. As oscilações nos níveis de glicose são detectadas pelos neurônios GABAérgicos GI do NTS via GLUT2 e glicoquinase (GK). Quando esses neurônios são submetifos à baixa glicose, há o aumento da razão AMP/ATP. Com isso, a atividade da enzima AMPK aumenta, e – posteriormente – a AMPK inativa canais de potássio de vazamento K<sub>2P</sub>, o que excita os neurônios GABAérgicos GI do NTS (Lamy et al., 2014). Mas, esse mecanismo não condiz com os nossos dados, provavelmente é um mecanismo específico para os neurônios GABAérgicos. Por exemplo, a reversão da corrente induzida por baixa glicose (figura 6) não aponta uma condutância de K<sup>+</sup>. Além disso, nós notamos uma diminuição – e não um aumento como Lamy et al., 2014 notaram – na resistência de entrada (figura 5) em concordância com Murat & Leão (2019). Levando em consideração que Ludwig e colegas (2021) observaram uma maior presença de neurônios glutamatérgicos no NTS, essas discordâncias dos nossos dados com os de Lamy et al., 2014, podem ser devido aos diferentes fenótipos de neurônios no NTS ou às diferenças entre espécies usadas: uma vez que Lamy et al., 2014 usaram camundongos, e nós usamos ratos.

Balfour & Trapp (2007) observaram uma corrente induzida por baixa glicose, e com uma variedade de potenciais de reversão da faixa de -58 mV a +10 mV. Além disso, eles notaram que a inativação da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase leva a uma corrente de entrada (discutiremos isso no subtópico 5.3), e associaram a variabilidade de respostas à combinação da inativação da bomba pela baixa glicose com outras condutâncias iônicas (Balfour & Trapp, 2007). Murat & Leão (2019) também notaram que a baixa glicose despolariza o potencial de membrana via uma corrente de entrada com potencial de reversão próximo a -60 mV.

Nossos dados mostram uma corrente de entrada com potencial de reversão mais despolarizado do que observados por Murat e Leão (2019), algo mais próximo de -30 mV (figura 6). Além disso, analisando individualmente as correntes, observamos uma grande variabilidade nos potenciais de reversão (figura 6.C), o que pode ter gerado essa discordância de  $E_{rev}$ . Curiosamente, dos 10 neurônios registrados, seis apresentaram uma corrente dependente de voltagem (figura 6.E), e quatro sem dependência de voltagem (figura 6.F). As correntes sem dependência de voltagem podem corresponder a inativação da corrente eletrogênica da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, o que de qualquer forma corresponderia apenas a 40% dos neurônios registrados no grupo da baixa glicose, discutiremos isso mais adiante. É possível que uma combinação complexa de correntes iônicas alteradas pela baixa glicose cause essa grande variação, mas no geral a bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> não participa da corrente/despolarização induzida pela baixa glicose em neurônios GI do NTS.

### 5.2- A diminuição do ATP intracelular reproduz a baixa glicose

Em situações em que a disponibilidade de glicose diminui, é inevitável que o ATP intracelular diminua também, o que não fica claro é o tempo necessário para essa diminuição e se isso é semelhante em todas as células. Experimentos recentes mostraram que a 2-DG leva a diminuições bruscas nos níveis de ATP intracelular, tanto citosólico quanto mitocondrial (Morciano et al., 2020). E para estudar os efeitos na diminuição do ATP intracelular, é comum o uso de inibidores ou desacopladores da CTE (cadeia transportadora de elétrons), como a oligomicina, um inibidor da ATP sintase (Morciano et al., 2020) e do CCCP, o qual diminui o gradiente de H<sup>+</sup> da mitocôndria desacoplando o transporte de elétrons pela fosforilação oxidativa da produção de ATP pela FoF1-ATPase mitocondrial (Tan et al., 2017). Testamos inicialmente a oligomicina, que por motivos desconhecidos, não produziu nenhum efeito. Testamos então o desacoplador CCCP e vimos que ele foi efetivo em simular os efeitos da baixa glicose extracelular.

Os níveis de ATP intracelular estão relacionados com uma variedade de mecanismos, o mecanismo clássico de secreção de insulina pelas células beta pancreáticas usa os canais K<sub>ATP</sub> para detectar os níveis de ATP, e esse mesmo mecanismo é usado por neurônios GE (Stanley et al., 2019; López-Gambero et al., 2019). No entanto, a relevância dos níveis de ATP não é tão clara para neurônios GI. Murat & Leão (2019) mostraram que esses canais são importantes para a modulação do potencial de repouso da membrana dos neurônios do NTS (Murat & Leão, 2019), sendo mais bloqueados quando as fatias eram incubadas com 10 mM de glicose. Um mecanismo já sugerido para o NTS é que a diminuição da glicose leva à diminuição dos níveis de ATP, o que por sua vez diminui a atividade da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Balfour & Trapp, 2007), discutido posteriormente.

Um estudo recente mostrou (Morciano et al., 2020) que a oligomicina induz diminuição parcial nos níveis de ATP mitocondrial, diferente do ATP citosólico que aparenta ser insensível à oligomicina, diferente da 2-DG que levou a diminuição bruscas no ATP citosólico e mitocondrial. Logo, a simulação de uma condição de baixa glicose leva a decréscimos bruscos nos níveis de ATP intracelular. Tan e colaboradores (2017) estudaram a ação do CCCP na linhagem de câncer de colo de útero HeLa, eles notaram que o CCCP diminui os níveis citosólicos de ATP, sugerindo que o desacoplamento da CTE pelo CCCP realmente induz a uma menor produção de ATP intracelular (Tan et al., 2017).

Lamy e colegas (2014) observaram que a oligomicina despolariza o potencial de membrana de neurônios GLUT2<sup>+</sup> GABAérgicos do NTS, e aumenta a resistência de entrada, mimetizando a baixa glicose (Lamy et al., 2014). Nós observamos que o CCCP leva à despolarização do potencial de membrana (figura 10.A) e à diminuição da resistência de entrada (figura 11.A), também reproduzindo os efeitos da baixa glicose nos neurônios GI do NTS, porém, com um mecanismo diferente do observado com neurônios GABAérgicos. Não observamos efeitos da oligomicina a 12  $\mu$ M, a mesma concentração usada por Lamy et al., 2014, e não testamos outras concentrações ou outro lote da droga para confirmar a falta de efeito.

Nas correntes induzidas por CCCP, vimos que apenas uma de seis (16.7%) não tem dependência de voltagem (relação corrente-voltagem), como observado na baixa glicose, e notamos que houveram dois tipos de corrente ao longo do tempo: correntes com potencial de reversão próximo de -80 mV (n = 4, figura 13.C e figura 13.E) e correntes com potencial de reversão entre -60 mV e -20 mV (n = 5, figura 13.B e figura 13.E), semelhante aos potenciais de reversão das correntes de entradas induzidas pela baixa glicose (figura 6.C), o que corrobora a hiperpolarização do potencial de membrana, e a posterior despolarização causadas pelo CCCP. Como já comentado, é possível que essa hiperpolarização, assim como as correntes com  $E_{rev}$  próximo ao  $E_{K+}$ , seja atribuída a abertura dos canais  $K_{ATP}$ , que na baixa glicose sustentada acabam sendo ativados, revalorizando os neurônios do NTS (Balfour et al., 2006; Balfour & Trapp, 2007; Murat & Leão, 2019).

Contudo, caso sejam mesmo os canais K<sub>ATP</sub> sendo ativados, ou outra condutância de K<sup>+</sup>, por que na baixa glicose a hiperpolarização não acontece antes da despolarização? Pensando que o CCCP é uma droga que atravessa direto pela membrana, sem usar transportadores, enquanto a glicose é transportada pelos GLUT, é possível que esse resultado do CCCP acuse algum tipo de acoplamento, ou melhor, sítios com mitocôndrias, GLUT e canal de K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>), pois a baixa glicose afetará sítios diferentes ao longo do tempo, enquanto o CCCP afeta diversos de uma única vez, já que atravessa a membrana de forma inespecífica. Outra possibilidade, é o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*) induzido pelo CCCP. A hiperpolarização imediata pode ter sido causada pela abertura de canais K<sub>ATP</sub> induzida por ROS, ambos fenômenos: aumento de ROS por ação de desacopladores mitocondriais e abertura de canais K<sub>ATP</sub> induzida por ROS, já foram relatados na literatura (Nakazaki et al., 1995; Brennan et al., 2006).

### 5.3- A inibição da bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e os efeitos da baixa glicose

A Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase é formada por duas subunidades no geral: alfa e beta, sendo possível uma terceira denominada FXYD, que é modulatória, assim como a subunidade beta, enquanto a subunidade alfa confere propriedades relacionada à cinética de transporte de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, e às propriedades catalíticas da bomba (Pierre & Xie, 2006; Clausen et al., 2017).

Balfour & Trapp (2007) compararam a corrente induzida pela inibição da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase com a corrente induzida no modelo de hipóxia e de baixa glicose. Eles observaram certa semelhança, porém a inibição da bomba gerou correntes com potencial de reversão indeterminado. No entanto, a hipótese é que o mecanismo de sensibilidade à baixa glicose pode envolver a combinação de condutâncias e um certo grau de inibição da bomba (Balfour & Trapp, 2007). Nossos dados mostraram que a ouabaína induz uma corrente de entrada (figura 17), da mesma forma que a baixa glicose, mas com menor amplitude. Além disso, essas correntes induzidas por ouabaína apresentaram um potencial de reversão próximo a -50 mV e com uma faixa de variação anômala (de -100 mV a 200 mV, figura 17).

Quando nós analisamos a resistência de entrada, averiguamos que a inativação da bomba não altera esse parâmetro (figura 16.B), enquanto a baixa glicose sim. Portanto, a bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase *per se* não parece integrar – a princípio – o mecanismo usado pelos neurônios GI do NTS para a detecção dos níveis de glicose. É possível que a inibição parcial da bomba por ouabaína 10  $\mu$ M altere localmente os gradientes de potássio e sódio gerando uma corrente de vazamento com potencial mais despolarizado, como observamos, o que despolariza a membrana a longo prazo.

É possível que o mecanismo estudado envolva a inibição da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase combinada com ativação de canais iônicos, no entanto, além dos dados já discutidos não corroborarem essa ideia, essa hipótese de mecanismo geraria uma nova questão: se a bomba é expressa em todos os neurônios: não responsivos (NR), GE e GI – inclusive de outras regiões do SNC – por que esses neurônios não têm a mesma resposta à baixa glicose? Uma abordagem para isso é considerar que a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase tem diversos subtipos de subunidade: 4 subtipos de subunidades alfas, 3 subtipos de subunidade auxiliares betas, além de uma terceira subunidade denominada FXYD. Esses subtipos têm distribuições diferentes no SNC, o que poderia estar relacionado com a especificidade da resposta às oscilações nos níveis de glicose em neurônios GI, GE e NR, mas isso ainda não foi explorado (Pierre & Xie, 2006; Clausen et al., 2017).

As subunidades alfas são muito importantes para as propriedades de afinidade da bomba aos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, e dependendo do tecido essas subunidades alfas são diferentes, o que confere funções específicas (Pierre & Xie, 2006; Clausen et al., 2017). Por exemplo, Brisson e colaboradores (2014) compararam os efeitos da privação de oxigênio/glicose (OGD, do inglês *oxygen/glucose deprivation*) em neurônios do tronco encefálico e de áreas superiores do SNC. Eles observaram que todos os neurônios submetidos à OGD despolarizam de forma similar. Contudo, neurônios de áreas superiores do SNC não conseguem restaurar a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, diferentemente dos neurônios do tronco encefálico - incluindo o NTS (Brisson et al., 2014), o que é relacionado a diferentes níveis de expressão de subunidades alfa-2 e alfa-3, menos suscetíveis a condições isquêmicas comparadas à subunidade alfa-1 (Dobretsov & Stimers, 2005; Blanco, 2005; Brisson et al., 2014), sendo a alfa-1 expressa de maneira generalizada em diversos tipos celulares (Clausen et al., 2017).

Portanto, são necessários estudos mais detalhados da expressão dessas subunidades da bomba nos neurônios GI, GE e NR. Com imunomarcação seria possível caracterizar a expressão das subunidades alfa-2 e/ou alfa-3 em neurônios GI, GE e NR, e – possivelmente – relacionar isso às respostas que cada neurônio tem quando submetidos à diminuição da glicose extracelular. Reforçamos, portanto, que mesmo a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase não sendo relevante – a princípio – para o mecanismo da sensibilidade à glicose, pode ser que haja uma importância secundária.

Outro ponto a ser discutido é a eletrofisiologia da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, a qual começou a ser estudada na década de 1980, mais especificamente a relação corrente-voltagem da bomba (Gadsby et al.,1985; Nakao & Gadsby, 1989). Assim como esses estudos, trabalhos posteriores observaram a dependência de voltagem da bomba, além da dependência às concentrações de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, bem como outros íons da família dos metais alcalinos. Esses estudos mostraram que a corrente da bomba aumenta conforme aproxima de 0 mV, e alcança um platô em potenciais superiores a 0 mV (Gadsby et al.,1985; Nakao & Gadsby, 1989; Sakai et al., 1996; Nakamura et al., 1999). No entanto, o trabalho de Gadsby et al., 1985, mostra que essa dependência de voltagem é percebida em largas faixas de variação de voltagem, no caso, de -140 mV a +60 mV. Assim, é importante notar que em faixas menores, como a que usamos neste trabalho (-115 a -35 mV), essa dependência não seria tão notória. Por esse motivo, consideramos que as correntes que registramos nos neurônios do NTS, e que não tinham aparente dependência de voltagem, eram relacionadas às correntes da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.
Além disso, as correntes são crescentes e sempre positivas dentro do intervalo de -115 a -35 mV (inclusive dentro de intervalos de voltagem até maiores, Gadsby et al.,1985; Nakao & Gadsby, 1989; Sakai et al., 1996; Nakamura et al., 1999). Logo, ao subtrairmos a corrente controle da corrente gerada após a inibição com baixa glicose (figura 6), ou com ouabaína (figura 17), apareceria uma corrente próxima de uma forma plana ou com uma inclinação negativa. E, na verdade, é algo próximo do que conseguimos observar em nossos dados (figura 6 e 17).

Nós observamos dois tipos de correntes geradas pela baixa glicose: uma com dependência de voltagem e outra sem dependência de voltagem (figura 6), a maioria dos neurônios GI (60%) tem corrente dependente de voltagem, ou seja, a corrente induzida por baixa glicose não demonstra ser da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase de forma geral. Nos experimentos com CCCP, notamos que essa suposta corrente da bomba apareceu em apenas 1/6 neurônio. No grupo da baixa glicose, apareceram 4/10 neurônios com uma corrente semelhante à corrente da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.

No grupo da ouabaína, essa corrente da bomba apareceu – claramente – em apenas 2/7 neurônios. É válido ressaltar que, os trabalhos que se propõem a estudar a eletrofisiologia da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, usam estímulos – como o aumento da concentração extracelular de K<sup>+</sup> – para então inibir a corrente, e depois isolá-la (Gadsby et al.,1985; Nakao & Gadsby, 1989; Sakai et al., 1996; Nakamura et al., 1999). Nós inibimos a bomba em uma situação basal, ou seja, sem estímulos. Por isso, o que nós observamos nas correntes do grupo com ouabaína acusa uma bomba em baixos níveis de atividade basal nos neurônios. Isso corrobora a ideia de que, a bomba realmente não parece ser um componente fundamental no mecanismo usado pelos neurônios GI do NTS.

Analisando os efeitos da ouabaína nos parâmetros de potencial de ação, vimos que nenhum dos parâmetros foi alterado, não reproduzindo, portanto, os efeitos da baixa glicose. A inibição da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase em cardiomiócitos de cobaia, altera o potencial de ação dessas células, alargando-os (Glitsch, 2001), efeito semelhante ao da baixa glicose (figura 9.A). Mas nossos resultados mostraram que a inibição da bomba não mimetiza esse efeito, sugerindo – por exemplo – que os gradientes locais de sódio e potássio não devam ser alterados, pelo menos na região do cone axonal.

#### 5.4- AMPK: um componente da resposta dos neurônios do NTS à baixa glicose?

A enzima AMPK é um intermediário central em diversos processos metabólicos. Essa enzima liga a razão AMP/ATP com os efetores da resposta a essas condições, isso porque a AMPK é sensível à razão AMP/ATP - influenciada pelos níveis de glicose - e a própria AMPK pode desencadear uma resposta metabólica (Garcia & Shaw, 2017; Herzig & Shaw, 2018) e/ou uma resposta eletrofisiológica, pois modula diversos canais iônicos/condutâncias da membrana celular (Andersen & Rasmussen, 2012). A AMPK é expressa em regiões fundamentais para o balanço energético: hipotálamo e em neurônios do DVC (Carling, 2005; Garcia & Shaw, 2017; Briski et al., 2014). A participação do NTS na CRR - fundamental na homeostase energética - envolve mecanismos dependentes de AMPK, respostas como a secreção de glucagon, a indução da fome, e inclusive modulação da atividade hipotalâmica (Hayes et al., 2009; Briski et al., 2014; Mandal & Briski, 2019).

Nossos resultados sugerem que a AMPK não participa na despolarização induzida por baixa glicose dos neurônios do NTS. Porém, devido à precisão das ferramentas farmacológicas usadas, os resultados têm que ser vistos com alguma cautela. A dorsomorfina induziu uma despolarização contínua do potencial de membrana (figura 19.D), no entanto, o uso dessa droga para o estudo da função da AMPK tem que ser tomado com cuidado, pois inativa - além da AMPK - diversas outras quinases, com algumas dessas sendo mais sensíveis a dorsomorfina, como por exemplo: ERK8, MELK, MARK3, MINK1, HIPK2, etc. e a IC<sub>50</sub> para a AMPK, em testes de cultura celular, foi calculada entre 0.1 e 0.2  $\mu$ M (Bain et al., 2007; Vogt et al., 2011), uma concentração consideravelmente baixa quando comparada a usada na literatura. Lamy e colegas (2014) estudaram a AMPK usando 150  $\mu$ M de dorsomorfina, uma concentração muito elevada da droga, enquanto nós usamos 4  $\mu$ M da droga, o que pode explicar a divergência de observações.

Os dados de Lamy e colaboradores (2014) mostraram que a dorsomorfina hiperpolariza neurônios GABAérgicos despolarizados pela baixa glicose, sugerindo que a inativação da AMPK reverteu a despolarização. Mais especificamente, eles concluíram que a inativação da AMPK cessa o tônus inibitória que a AMPK mantém nos canais K<sub>2P</sub>. Esse mecanismo parece refletir as alterações na resistência de entrada observadas no estudo: a baixa glicose aumenta a resistência de entrada, e a dorsomorfina reverte esse aumento, diminuindo a resistência de entrada na presença de baixa glicose (Lamy et., 2014). Mas, essa repolarização induzida por dorsomorfina é questionável nos neurônios do NTS. Dados de Murat & Leão (2019),

demonstram que os neurônios GI do NTS expressam canais K<sub>ATP</sub>, e esses canais são responsáveis por repolarizar os neurônios submetidos à baixa glicose prolongada. Ou seja, é possível que no desenho experimental de Lamy et al., 2014, a repolarização observada com dorsomorfina em condições de baixa glicose, na verdade, seja a repolarização induzida pela abertura de canais K<sub>ATP</sub> devido ao aumento da razão ADP/ATP (Murat & Leão, 2019).

Nossos dados mostraram que a dorsomorfina não altera a resistência de entrada, porém parece impedir com que a baixa glicose diminua a resistência de entrada (figura 19.B), ou seja, a baixa glicose induz a abertura de canais iônicos que levam a diminuição da resistência, e a dorsomorfina inibe algum componente que faz parte dessa modulação de condutâncias. Mesmo assim a baixa glicose despolarizou a membrana após a dorsomorfina, mas não é claro se isso também seria um efeito da dorsomorfina que ainda não tinha estabilizado, confundindo também a interpretação dos dados de resistência de entrada. Por outro lado, a dorsomorfina não antagonizou a maioria dos efeitos da baixa glicose sobre o potencial de ação.

Para uma melhor compreensão da participação da enzima AMPK na mediação dos efeitos da baixa glicose, testamos o agonista AICAR. O AICAR leva a despolarização do potencial de membrana de neurônios GI do núcleo ventromedial do hipotálamo (Murphy et al., 2009) e de neurônios GI GABAérgicos do NTS, uma vez que mimetiza o aumento da razão AMP/ATP, e o AICAR também induz o aumento da resistência de entrada, devido ao fechamento dos canais K<sub>2P</sub> (Lamy et al., 2014). Diferentemente, nossos dados com AICAR não mostram nenhuma despolarização induzida pelo mimético de AMP (Figura 22.A). No entanto, o AICAR produziu uma diminuição da resistência de entrada induzida pela baixa glicose, e interessantemente a baixa glicose na presença de AICAR não diminui significativamente a resistência de entrada (Figura 22.B), indicando, possivelmente, a ativação de algum intermediário sensível AMPK e que module condutâncias na membrana celular mascarando o efeito da baixa glicose sobre a resistência da membrana. É possível que a AMPK bloqueie uma condutância de potássio que não altere muito o potencial de membrana, mas mascare o efeito da baixa glicose, por exemplo. No geral, o fato do AICAR não mimetizar a despolarização induzida por baixa glicose, sugere fortemente que a AMPK não seria o principal mediador dos efeitos da baixa glicose, mas poderia participar parcialmente de seus efeitos.

O fato do AICAR ser um análogo do AMP implica em interações com outras quinases dependentes de AMP, como é o caso da PKA (Kim et al., 2016). Béguin e colaboradores (1999) mostraram que a PKA leva ao aumento da atividade de canais  $K_{ATP}$  via fosforilação da subunidade Kir6.2 (Béguin et al., 1999). Os canais  $K_{ATP}$  são essenciais para a regulação do

potencial de membrana dos neurônios do NTS, e os neurônios GI do NTS são responsivos a tolbutamida (inibidor dos canais  $K_{ATP}$ ), diferentemente dos neurônios não-responsivos (Murat & Leão, 2019). Logo, se o AICAR estiver ativando PKA nos neurônios do NTS, e portanto, aumentando a probabilidade dos canais  $K_{ATP}$  estarem abertos, explica-se o porquê do AICAR não despolarizar o potencial de membrana dos neurônios do NTS e do AICAR induzir diminuição da resistência de entrada.

Em suma, o AICAR não reproduziu a despolarização induzida pela baixa glicose, e nem mimetizou os efeitos da baixa glicose nos parâmetros de potencial de ação. Por conseguinte, esses dados nos levam a concluir que a AMPK – muito provavelmente – não é essencial para o mecanismo de detecção da baixa glicose por neurônios GI do NTS.

### 5.5- O BDNF não mimetiza a baixa glicose em neurônios do NTS

O BDNF é uma neurotrofina amplamente expressa no SNC, e uma das regiões que apresentam o RNAm do BDNF é o NTS (Conner et al., 1997). Essa neurotrofina é um fator de sobrevivência e modulador da função de neurônios dos gânglios petroso e nodoso, gânglios mediadores do barorreflexo e quimiorreflexo (Brady et al., 1999). O envolvimento desse peptídeo na modulação desses reflexos do sistema cardiovascular está relacionado a sua característica de modulação sináptica no NTS. Clark e colaboradores (2011) observaram que a injeção de BDNF no NTS medial leva a um aumento na pressão arterial média, frequência cardíaca e da atividade simpática, e esse efeito está associado a modulação de sinapses glutamatérgicas no NTS: o BDNF leva à diminuição do pico de correntes excitatórias póssinápticas (EPSCs), enquanto a droga K252a (inibidor do receptor de BDNF, TrkB), aumenta a frequência desses EPSCs. Na presença de um inibidor de receptores ionotrópicos para glutamato, esses efeitos são abolidos (Clark et al., 2011).

No contexto da regulação da glicemia, Cuéllar e colegas (2017) mostraram que o BDNF aumenta a resposta hiperglicêmica mediada pelos neurônios do NTS em modelos de hipoxia. Esses dados da literatura chamaram a atenção para uma possível modulação que o peptídeo possa exercer sobre os neurônios do NTS envolvidos no controle dos níveis de glicose.

Nós observamos que o BDNF não despolariza e nem altera a resistência de entrada dos neurônios do NTS (figura 25.A e 25.B, respectivamente), ratificando o que Clark e colaboradores (2011) acharam em relação ao potencial de membrana desses neurônios, porém contrariando o fato do BDNF diminuir a resistência de entrada (Clark et al., 2011). Além disso,

Clark e colaboradores (2011) não notaram diferenças na amplitude e na *halfwidth* do PA (o primeiro potencial de ação) induzidas pelo BDNF, de forma a concordar com nossos dados (figura 26.D e 26.E). Mas eles não notaram nenhuma alteração induzida pelo peptídeo no limiar de disparo do PA (Clark et al., 2011), diferentemente dos nossos dados, que mostram a diminuição do limiar de disparo de PA dos neurônios do NTS (figura 26.B). Além disso, no estudo de Clark e colegas (2011), o BDNF diminui a frequência de disparo de PAs em função da injeção de corrente (Clark et al., 2011). Contrariamente, nossos dados não apontam nenhuma alteração na frequência de disparo desses neurônios (figura 26.F).

Além da diminuição do limiar de disparo do PAs (figura 26.B), o BDNF levou a uma diminuição da latência para o disparo do potencial ação (figura 26.C). Juntos, esses dados acusam algum aumento sutil da excitabilidade neuronal dos neurônios do NTS induzido pelo BDNF. No entanto, isso não é acompanhado de despolarização ou alteração da resistência de entrada dos neurônios do NTS (figura 25.A e 25.B, respectivamente).

## 5.6- Contribuição para o mecanismo usado por neurônios GI do NTS

Nós não chegamos a definir um mecanismo específico de como os neurônios GI detectam a diminuição da concentração de glicose extracelular. Porém, como principal observação, notamos que os neurônios GI – diferentemente dos não responsivos – apresentam uma sensibilidade aos níveis de ATP intracelular (levando em consideração que o CCCP diminui os níveis de ATP intracelular por desacoplar a CTE) e que a diminuição de ATP intracelular não desencadeia a resposta observada na baixa glicose via Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, uma vez que isso não traria uma explicação de diferentes respostas entre neurônios GI, GE e NR, além de observarmos que a inibição da bomba tem respostas muito distintas da observada na baixa glicose.

Os resultados da AMPK não foram completamente conclusivos, sendo necessário melhores ferramentas científicas para esse estudo, como um animal knock-out para a AMPK (Viollet et al., 2009). Mesmo assim, pode-se afirmar que provavelmente os neurônios GI do NTS do rato não usem a AMPK como um efetor.

# 6- Conclusão

Conforme os dados obtidos no presente estudo, concluímos que:

1. A maioria dos neurônios do NTS são do tipo GI, ou seja, despolarizam quando submetidos à baixa concentração de glicose extracelular;

2. A baixa glicose também leva a alterações nos parâmetros de potencial de ação;

3. O CCCP, um desacoplador da CTE, tem efeitos semelhantes à baixa concentração de glicose em neurônios GI do NTS, mas não leva a mudanças em neurônios não responsivos (NR);

4. A inibição da bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase não mimetiza os efeitos da baixa concentração de glicose;

5. A ativação da enzima AMPK não mimetiza o que observamos com a baixa concentração de glicose;

6. O BDNF não reproduz os efeitos da baixa concentração de glicose, mas altera parâmetros de PA no sentido de aumentar a excitabilidade neuronal;

7. Não foi possível traçar um mecanismo possível para a detecção da diminuição da concentração de glicose por neurônios GI do NTS. No entanto, nota-se uma provável dependência de ATP específica dos neurônios GI no NTS, e que esse mecanismo não se dá com a participação relevante da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, como se imaginava na literatura.

### Referências

Aklan, I., Atasoy, N. S., Yavuz, Y., Ates, T., Coban, I., Koksalar, F., ... & Atasoy, D. (2020). NTS catecholamine neurons mediate hypoglycemic hunger via medial hypothalamic feeding pathways. Cell metabolism, 31(2), 313-326.

Anand, B. K., Chhina, G. S., Sharma, K. N., Dua, S., & Singh, B. (1964). Activity of single neurons in the hypothalamic feeding centers: effect of glucose. American Journal of Physiology-Legacy Content, 207(5), 1146-1154.

Andersen, M. N., & Rasmussen, H. B. (2012). AMPK: A regulator of ion channels. Communicative & integrative biology, 5(5), 480-484.

Appleyard, S. M., Bailey, T. W., Doyle, M. W., Jin, Y. H., Smart, J. L., Low, M. J., & Andresen, M. C. (2005). Proopiomelanocortin neurons in nucleus tractus solitarius are activated by visceral afferents: regulation by cholecystokinin and opioids. Journal of Neuroscience, 25(14), 3578-3585.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., Mclauchlan, H., ... & Cohen, P. (2007).
The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochemical Journal*, 408(3), 297-315.

Balfour, R. H., & Trapp, S. (2007). Ionic currents underlying the response of rat dorsal vagal neurones to hypoglycaemia and chemical anoxia. The Journal of physiology, 579(3), 691-702.

Balfour, R. H., Hansen, A. M. K., & Trapp, S. (2006). Neuronal responses to transient hypoglycaemia in the dorsal vagal complex of the rat brainstem. *The Journal of physiology*, *570*(3), 469-484.

Bean, B. P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), 451-465.

Béguin, P., Nagashima, K., Nishimura, M., Gonoi, T., & Seino, S. (1999). PKA-mediated phosphorylation of the human KATP channel: separate roles of Kir6. 2 and SUR1 subunit phosphorylation. *The EMBO journal*, *18*(17), 4722-4732.

Blanco, G. (2005, September). Na, K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissuespecific ion regulation. In *Seminars in nephrology* (Vol. 25, No. 5, pp. 292-303). WB Saunders.

Bohland, M., Matveyenko, A. V., Saberi, M., Khan, A. M., Watts, A. G., & Donovan, C. M. (2014). Activation of hindbrain neurons is mediated by portal-mesenteric vein glucosensors during slow-onset hypoglycemia. Diabetes, 63(8), 2866-2875.

Bourque, C. W. (2008). Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. Nature Reviews Neuroscience, 9(7), 519-531.

Boychuk, C. R., Smith, K. C., Peterson, L. E., Boychuk, J. A., Butler, C. R., Derera, I. D., ... & Smith, B. N. (2019). A hindbrain inhibitory microcircuit mediates vagally-coordinated glucose regulation. Scientific reports, 9(1), 1-12.

Brady, R., Zaidi, S. I. A., Mayer, C., & Katz, D. M. (1999). BDNF is a target-derived survival factor for arterial baroreceptor and chemoafferent primary sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, *19*(6), 2131-2142.

Brennan, J. P., Southworth, R., Medina, R. A., Davidson, S. M., Duchen, M. R., & Shattock, M. J. (2006). Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of KATP channel activation. *Cardiovascular research*, *72*(2), 313-321.

Briski, K. P., Cherian, A. K., Genabai, N. K., & Vavaiya, K. V. (2009). In situ coexpression of glucose and monocarboxylate transporter mRNAs in metabolic-sensitive caudal dorsal vagal complex catecholaminergic neurons: transcriptional reactivity to insulin-induced hypoglycemia and caudal hindbrain glucose or lactate repletion during insulin-induced hypoglycemia. Neuroscience, 164(3), 1152-1160.

Briski, K. P., Ibrahim, B. A., & Tamrakar, P. (2014). Energy metabolism and hindbrain AMPK: regulation by estradiol. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, *17*(3), 129-136.

Brisson, C. D., Hsieh, Y. T., Kim, D., Jin, A. Y., & Andrew, R. D. (2014). Brainstem neurons survive the identical ischemic stress that kills higher neurons: insight to the persistent vegetative state. *PloS one*, *9*(5), e96585.

Brooks, C. M., & Lambert, E. F. (1946). A study of the effect of limitation of food intake and the method of feeding on the rate of weight gain during hypothalamic obesity in the albino rat. American Journal of Physiology-Legacy Content, 147(4), 695-707.

Ceballos, C. C., Li, S., Roque, A. C., Tzounopoulos, T., & Leão, R. M. (2016). In equalizes membrane input resistance in a heterogeneous population of fusiform neurons in the dorsal cochlear nucleus. *Frontiers in cellular neuroscience*, *10*, 249.

Clark, C. G., Hasser, E. M., Kunze, D. L., Katz, D. M., & Kline, D. D. (2011). Endogenous brain-derived neurotrophic factor in the nucleus tractus solitarius tonically regulates synaptic and autonomic function. *Journal of Neuroscience*, *31*(34), 12318-12329.

Clausen, M. V., Hilbers, F., & Poulsen, H. (2017). The structure and function of the Na, K-ATPase isoforms in health and disease. *Frontiers in physiology*, *8*, 371.

Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M., & Varon, S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *Journal of neuroscience*, *17*(7), 2295-2313.

Cryer, P. E. (1993). Glucose counterregulation: prevention and correction of hypoglycemia in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 264(2), E149-E155.

Dagostin, A. A., Lovell, P. V., Hilscher, M. M., Mello, C. V., & Leão, R. M. (2015). Control of phasic firing by a background leak current in avian forebrain auditory neurons. Frontiers in cellular neuroscience, 9, 471.

Dal Canto, E., Ceriello, A., Rydén, L., Ferrini, M., Hansen, T. B., Schnell, O., ... & Beulens, J.W. (2019). Diabetes as a cardiovascular risk factor: an overview of global trends of macro and micro vascular complications. European journal of preventive cardiology, 26(2\_suppl), 25-32.

Dallaporta, M., Himmi, T., Perrin, J., & Orsini, J. C. (1999). Solitary tract nucleus sensitivity to moderate changes in glucose level. Neuroreport, 10(12), 2657-2660.

Dallaporta, M., Perrin, J., & Orsini, J. C. (2000). Involvement of adenosine triphosphatesensitive K+ channels in glucose-sensing in the rat solitary tract nucleus. Neuroscience letters, 278(1-2), 77-80.

Vogt, J., Traynor, R., & Sapkota, G. P. (2011). The specificities of small molecule inhibitors of the TGFss and BMP pathways. *Cellular signalling*, *23*(11), 1831-1842.

De Bernardis Murat, C., & Leão, R. M. (2019). A voltage-dependent depolarization induced by low external glucose in neurons of the nucleus of the tractus solitarius: interaction with KATP channels. The Journal of Physiology, 597(9), 2515-2532.

Dienel, G. A. (2019). Brain glucose metabolism: integration of energetics with function. Physiological reviews, 99(1), 949-1045.

Di Rocco, R. J., & Grill, H. J. (1979). The forebrain is not essential for sympathoadrenal hyperglycemic response to glucoprivation. Science, 204(4397), 1112-1114.

Do, J., Chang, Z., Sekerková, G., McCrimmon, D. R., & Martina, M. (2020). A leptin-mediated neural mechanism linking breathing to metabolism. *Cell reports*, *33*(6), 108358.

Dobretsov, M., & Stimers, J. R. (2005). Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, *10*(3), 2373-2396.

Faber, C. L., Deem, J. D., Campos, C. A., Taborsky, G. J., & Morton, G. J. (2020). CNS control of the endocrine pancreas. Diabetologia, 63(10), 2086-2094.

Ferreira Jr, M., Browning, K. N., Sahibzada, N., Verbalis, J. G., Gillis, R. A., & Travagli, R. A. (2001). Glucose effects on gastric motility and tone evoked from the rat dorsal vagal complex. The Journal of physiology, 536(1), 141-152.

Fioramonti, X., Chrétien, C., Leloup, C., & Pénicaud, L. (2017). Recent advances in the cellular and molecular mechanisms of hypothalamic neuronal glucose detection. Frontiers in physiology, 8, 875.

Flynn, F. W., & Grill, H. J. (1983). Insulin elicits ingestion in decerebrate rats. Science, 221(4606), 188-190.

Gadsby, D. C., Kimura, J., & Noma, A. (1985). Voltage dependence of Na/K pump current in isolated heart cells. *Nature*, *315*(6014), 63-65.

Garcia, D., & Shaw, R. J. (2017). AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. *Molecular cell*, 66(6), 789-800.

Glitsch, H. G. (2001). Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. *Physiological reviews*, *81*(4), 1791-1826.

Gong, B., Legault, D., Miki, T., Seino, S., & Renaud, J. M. (2003). KATP channels depress force by reducing action potential amplitude in mouse EDL and soleus muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 285(6), C1464-C1474.

Gross, P. M., Wall, K. M., Pang, J. J., Shaver, S. W., & Wainman, D. S. (1990). Microvascular specializations promoting rapid interstitial solute dispersion in nucleus tractus solitarius. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 259(6), R1131-R1138.

Hayes, M. R., Skibicka, K. P., Bence, K. K., & Grill, H. J. (2009). Dorsal hindbrain 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase as an intracellular mediator of energy balance. *Endocrinology*, *150*(5), 2175-2182. Herzig, S., & Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. Nature reviews Molecular cell biology, 19(2), 121-135.

Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (1942). The spontaneous activity and food intake of rats with hypothalamic lesions. American Journal of Physiology-Legacy Content, 136(4), 609-617.

Heytler, P. G. (1963). Uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanide phenylhydrazones. I. Some characteristics of m-CI-CCP action on mitochondria and chloroplasts. *Biochemistry*, 2(2), 357-361.

Holman, G. D. (2018). Chemical biology probes of mammalian GLUT structure and function. Biochemical Journal, 475(22), 3511-3534.

Huang, Q. Y., Lai, X. N., Qian, X. L., Lv, L. C., Li, J., Duan, J., ... & Xiong, L. X. (2019). Cdc42: a novel regulator of insulin secretion and diabetes-associated diseases. International Journal of Molecular Sciences, 20(1), 179.

Impheng, H., Lemmers, C., Bouasse, M., Legros, C., Pakaprot, N., Guérineau, N. C., ... & Monteil, A. (2021). The sodium leak channel NALCN regulates cell excitability of pituitary endocrine cells. *The FASEB Journal*, *35*(5), e21400.

Irwin, D. M., & Tan, H. (2014). Evolution of glucose utilization: glucokinase and glucokinase regulator protein. Molecular phylogenetics and evolution, 70, 195-203.

Kasianowicz, J., Benz, R., & McLaughlin, S. (1984). The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanidem-Chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes. *The Journal of membrane biology*, 82(2), 179-190.

Kasten, M. R., Rudy, B., & Anderson, M. P. (2007). Differential regulation of action potential firing in adult murine thalamocortical neurons by Kv3. 2, Kv1, and SK potassium and N-type calcium channels. *The Journal of physiology*, *584*(2), 565-582.

Kim, J., Yang, G., Kim, Y., Kim, J., & Ha, J. (2016). AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Experimental & molecular medicine*, *48*(4), e224-e224.

Lamy, C. M., Sanno, H., Labouèbe, G., Picard, A., Magnan, C., Chatton, J. Y., & Thorens, B. (2014). Hypoglycemia-activated GLUT2 neurons of the nucleus tractus solitarius stimulate vagal activity and glucagon secretion. Cell metabolism, 19(3), 527-538.

Leão, L. L., Tangen, G., Barca, M. L., Engedal, K., Santos, S. H. S., Machado, F. S. M., ... & Monteiro-Junior, R. S. (2020). Does hyperglycemia downregulate glucose transporters in the brain?. Medical Hypotheses, 139, 109614.

López-Gambero, A. J., Martínez, F., Salazar, K., Cifuentes, M., & Nualart, F. (2019). Brain glucose-sensing mechanism and energy homeostasis. Molecular neurobiology, 56(2), 769-796.

Lu, B., Su, Y., Das, S., Liu, J., Xia, J., & Ren, D. (2007). The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm. *Cell*, *129*(2), 371-383.

Ludwig, M. Q., Cheng, W., Gordian, D., Lee, J., Paulsen, S. J., Hansen, S. N., ... & Pers, T. H. (2021). A genetic map of the mouse dorsal vagal complex and its role in obesity. *Nature Metabolism*, *3*(4), 530-545.

Lutas, A., Lahmann, C., Soumillon, M., & Yellen, G. (2016). The leak channel NALCN controls tonic firing and glycolytic sensitivity of substantia nigra pars reticulata neurons. *Elife*, *5*.

Mandal, S. K., & Briski, K. P. (2019). Hindbrain dorsal vagal complex AMPK controls hypothalamic gluco-regulatory transmitter and counter-regulatory hormone responses to hypoglycemia. Brain research bulletin, 144, 171-179.

Merchenthaler, I. (1991). Neurons with access to the general circulation in the central nervous system of the rat: a retrograde tracing study with fluoro-gold. Neuroscience, 44(3), 655-662.

Mizuno, Y., & Oomura, Y. (1984). Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: in vitro study. Brain research, 307(1-2), 109-116.

Morciano, G., Imamura, H., Patergnani, S., Pedriali, G., Giorgi, C., & Pinton, P. (2020). Measurement of ATP concentrations in mitochondria of living cells using luminescence and fluorescence approaches. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 155, pp. 199-219). Academic Press.

Murphy, B. A., Fakira, K. A., Song, Z., Beuve, A., & Routh, V. H. (2009). AMP-activated Protein Kinase (AMPK) and Nitric Oxide (NO) regulate the 1 glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic (VMH) glucose-inhibited (GI) neurons. 2 3.

Nakamura, Y., Ohya, Y., Abe, I., & Fujishima, M. (1999). Sodium-potassium pump current in smooth muscle cells from mesenteric resistance arteries of the guinea-pig. *The Journal of physiology*, *519*(Pt 1), 203.

Nakao, M., & Gadsby, D. C. (1989). [Na] and [K] dependence of the Na/K pump current-voltage relationship in guinea pig ventricular myocytes. *The Journal of general physiology*, *94*(3), 539-565.

Nakazaki, M., Kakei, M., Koriyama, N., & Tanaka, H. (1995). Involvement of ATP-Sensitive K+ Channels in Free Radical–Mediated Inhibition of Insulin Secretion in Rat Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Diabetes*, 44(8), 878-883.

Nichols, C. G. (2006). KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature*, *440*(7083), 470-476.

Nirmalan, N., & Nirmalan, M. (2017). Hormonal control of metabolism: regulation of plasma glucose. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, *18*(10), 502-507.

Oomura, Y., Ooyama, H., Sugimori, M., Nakamura, T., & Yamada, Y. (1974). Glucose inhibition of the glucose-sensitive neurone in the rat lateral hypothalamus. Nature, 247(5439), 284-286.

Pierre, S. V., & Xie, Z. (2006). The Na, K-ATPase receptor complex. *Cell biochemistry and biophysics*, *46*(3), 303-315.

Profaci, C. P., Munji, R. N., Pulido, R. S., & Daneman, R. (2020). The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. Journal of Experimental Medicine, 217(4).

Resch, J. M., Fenselau, H., Madara, J. C., Wu, C., Campbell, J. N., Lyubetskaya, A., ... & Lowell, B. B. (2017). Aldosterone-sensing neurons in the NTS exhibit state-dependent pacemaker activity and drive sodium appetite via synergy with angiotensin II signaling. *Neuron*, *96*(1), 190-206.

Ritter, R. C., & Slusser, P. E. T. E. R. (1980). 5-Thio-D-glucose causes increased feeding and hyperglycemia in the rat. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 238(2), E141-E144.

Ritter, R. C., Slusser, P. G., & Stone, S. (1981). Glucoreceptors controlling feeding and blood glucose: location in the hindbrain. Science, 213(4506), 451-452.

Ritter, S., & Strang, M. (1982). Fourth ventricular alloxan injection causes feeding but not hyperglycemia in rats. Brain research, 249(1), 198-201.

Ritter, S., Dinh, T. T., & Li, A. J. (2006). Hindbrain catecholamine neurons control multiple glucoregulatory responses. *Physiology & behavior*, *89*(4), 490-500.

Ritter, S., Llewellyn-Smith, I., & Dinh, T. T. (1998). Subgroups of hindbrain catecholamine neurons are selectively activated by 2-deoxy-D-glucose induced metabolic challenge. *Brain research*, 805(1-2), 41-54.

Ritter, S., Li, A. J., & Wang, Q. (2019). Hindbrain glucoregulatory mechanisms: critical role of catecholamine neurons in the ventrolateral medulla. *Physiology & behavior*, 208, 112568.

Rodriguez-Diaz, R., & Caicedo, A. (2014). Neural control of the endocrine pancreas. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 28(5), 745-756.

Rogers, R. C., McDougal, D. H., Ritter, S., Qualls-Creekmore, E., & Hermann, G. E. (2018). Response of catecholaminergic neurons in the mouse hindbrain to glucoprivic stimuli is astrocyte dependent. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 315(1), R153-R164.

Roberts, B. L., Zhu, M., Zhao, H., Dillon, C., & Appleyard, S. M. (2017). High glucose increases action potential firing of catecholamine neurons in the nucleus of the solitary tract by increasing spontaneous glutamate inputs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 313(3), R229-R239.

Sakai, R., Hagiwara, N., Matsuda, N., Kassanuki, H., & Hosoda, S. (1996). Sodium--potassium pump current in rabbit sino-atrial node cells. *The Journal of Physiology*, *490*(1), 51-62.

Sankar, A., Khodai, T., McNeilly, A. D., McCrimmon, R. J., & Luckman, S. M. (2020). Experimental models of impaired hypoglycaemia-associated counter-regulation. Trends in Endocrinology & Metabolism, 31(9), 691-703.

Shrivastava, A. N., Triller, A., & Melki, R. (2020). Cell biology and dynamics of Neuronal Na+/K+-ATPase in health and diseases. Neuropharmacology, 169, 107461.

Silver, I. A., & Erecinska, M. (1998). Glucose-induced intracellular ion changes in sugarsensitive hypothalamic neurons. *Journal of neurophysiology*, *79*(4), 1733-1745.

Song, Z., Levin, B. E., McArdle, J. J., Bakhos, N., & Routh, V. H. (2001). Convergence of preand postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. diabetes, 50(12), 2673-2681.

Sprague, J. E., & Arbeláez, A. M. (2011). Glucose counterregulatory responses to hypoglycemia. *Pediatric endocrinology reviews: PER*, 9(1), 463.

Troadec, J. D., Gaigé, S., Barbot, M., Lebrun, B., Barbouche, R., & Abysique, A. (2022). Glial Modulation of Energy Balance: The Dorsal Vagal Complex Is No Exception. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(2), 960.

Stanley, S., Moheet, A., & Seaquist, E. R. (2019). Central mechanisms of glucose sensing and counterregulation in defense of hypoglycemia. Endocrine reviews, 40(3), 768-788.

Verberne, T., Sabetghadam, A., & Korim, W. (2014). Neural pathways that control the glucose counterregulatory response. *Frontiers in neuroscience*, *8*, 38.

Viollet, B., Athea, Y., Mounier, R., Guigas, B., Zarrinpashneh, E., Horman, S., ... & Bertrand, L. (2009). AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Frontiers in bioscience* (*Landmark edition*), *14*, 19.

Wu, X., Wang, C., Wang, J., Zhu, M., Yao, Y., & Liu, J. (2021). Hypoxia preconditioning protects neuronal cells against traumatic brain injury through stimulation of glucose transport mediated by HIF-1α/GLUTs signaling pathway in rat. Neurosurgical review, 44(1), 411-422.

Yettefti, K., Orsini, J. C., & Perrin, J. (1997). Characteristics of glycemia-sensitive neurons in the nucleus tractus solitarii: possible involvement in nutritional regulation. Physiology & behavior, 61(1), 93-100.

Zhao, Q., Yu, C. D., Wang, R., Xu, Q. J., Dai Pra, R., Zhang, L., & Chang, R. B. (2022). A multidimensional coding architecture of the vagal interoceptive system. *Nature*, *603*(7903), 878-884.