

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

FERNANDA MACHADO CHAVES

**Efeitos de citocinas e fatores de crescimento sobre neurônios
hipotalâmicos: estudo do fator de necrose tumoral- α ,
interleucina-6, interleucina IL-1 β , hormônio do crescimento e
fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Fisiologia Humana do Instituto
de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

FERNANDA MACHADO CHAVES

**Efeitos de citocinas e fatores de crescimento sobre neurônios
hipotalâmicos: estudo do fator de necrose tumoral- α ,
interleucina-6, interleucina IL-1 β , hormônio do crescimento e
fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Fisiologia Humana do Instituto
de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Donato Júnior

Co-orientadora: Renata Frazão

Versão integral.

São Paulo
2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Machado Chaves, Fernanda
Efeitos de citocinas e fatores de crescimento
sobre neurônios hipotalâmicos: estudo do fator de
necrose tumoral-?, interleucina-6, interleucina IL-
1?, hormônio do crescimento e fator de crescimento
semelhante à insulina tipo 1 / Fernanda Machado
Chaves; orientador José Donato Junior;
coorientador Renata Frazão. -- São Paulo, 2021.
109 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Citocinas. 2. Fator de Necrose Tumoral-?. 3.
Interleucina 1?. 4. Hormônio do Crescimento. 5.
Fator de Crescimento Semelhante à Insulina. I.
Donato Junior, José , orientador. II. Frazão,
Renata, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernanda Machado Chaves

Título da Dissertação/Tese: Efeitos de citocinas e fatores de crescimento sobre neurônios hipotalâmicos: estudo do fator de necrose tumoral- α , interleucina-6, interleucina IL-1 β , hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

Orientador: Prof. Dr. José Donato Júnior
Co-orientadora: Renata Frazão

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Grande Universitária "Armando de Gales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III 05508-000
CEUA-ICB/USP Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Ação do hormônio do crescimento no sistema nervoso: relevância para as funções neurais e na doença*", registrado sob o protocolo nº **73/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **07/07/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) José Donato Júnior**

- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*

- Membros da Equipe: *Priscila Dryelle Sousa Teixeira, Isadora Clivatti Furigo (Pós-Doutorando), João Alfredo Bolivar Pedrosa (Pós-Doutorando), Frederick Wasinski (Pós-Doutorando), Gisele Cristina Colto, Ana Maria P Campo (Técnico de Laboratório), Renata Frazão (Pesquisador Colaborador), Leandro Bueno Lima (Pós-Doutorando), Tabata Bohlen, Lucas Brecht Palos dos Santos (Iniciação Científica), Igor Tomaz (Iniciação Científica), Gabriel Orefice de Souza (Iniciação Científica), Fernanda Machado (Pós-Graduanda)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretária da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*The role of growth hormone in the brain: relevance for neural functions and in disease*", protocol nº **73/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **7/7/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) José Donato Júnior**

- Team members: *Priscila Dryelle Sousa Teixeira, Isadora Clivatti Furigo (Postdoctoral Researcher), João Alfredo Bolivar Pedrosa (Postdoctoral Researcher), Frederick Wasinski (Postdoctoral Researcher), Gisele Cristina Colto, Ana Maria P Campo (Laboratory Technician), Renata Frazão (Collaborator Researcher), Leandro Bueno Lima (Postdoctoral Researcher), Tabata Bohlen, Lucas Brecht Palos dos Santos (Undergraduate Student), Igor Tomaz (Undergraduate Student), Gabriel Orefice de Souza (Undergraduate Student), Fernanda Machado (Graduate Student).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	C57BL/6 selvagem	Macho/Male	até 8 meses/months	170
Mus musculus	GHR-flox/Nestin-Cre	Macho/Male	até 20 meses/months	280
Mus musculus	db/db	Macho/Male	até 8 meses/months	30
Mus musculus	ob/ob	Macho/Male	até 8 meses/months	40
Mus musculus	lit/lit	Macho/Male	até 8 meses/months	30

Dedico este trabalho em especial, a minha família. Sem eles eu não estaria aqui, pois acreditaram em meus sonhos, me acompanharam e viveram comigo todos os momentos até agora. Além disso, dedico aos meus novos e velhos amigos, que me ajudaram e que torceram por mim.

Primeiramente eu tenho muito a agradecer aos meus pais por me darem a vida, a possibilidade de um futuro, e permitir a graça de tê-los como minha inspiração por tudo que passaram, lutaram e conquistaram ao longo de suas vidas, para dar com dignidade um padrão de vida excelente para mim e meus irmãos.

Agradeço a todos os meus novos e velhos amigos que de alguma forma me fizeram feliz, e aqueles que mesmo que distante sempre estiveram presentes.

Agradeço em especial, ao meu Orientador José Donato Junior e Co-Orientadora Renata Frazão por todos os ensinamentos, oportunidades e confiança.

Agradeço a todos os colaboradores deste projeto. E aos colegas de laboratório.

E agradeço a todos que me apoiaram e me ajudaram de uma forma ou de outra e que porventura não agradei, deixo o meu muito obrigado, por fazerem parte de tudo isso e por estarem comigo transformando um sonho em realidade.

A todas as pessoas que me ajudaram de maneira direta ou indireta, muito obrigado.

Agradeço especialmente a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento concedido (processo 2017/21854-9) para que eu fosse capaz de realizar esse trabalho. Muito obrigado.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica).

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

-Albert Einstein.

RESUMO

CHAVES, F.M. Efeitos de citocinas e fatores de crescimento sobre neurônios hipotalâmicos: estudo do fator de necrose tumoral- α , interleucina-6, interleucina IL-1 β , hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1. 2021. – 109p. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O hipotálamo desempenha importante papel na homeostasia corporal. Citocinas inflamatórias podem proporcionar alterações na homeostase energética, influenciando a ingestão alimentar. Realizamos registros eletrofisiológicos para investigar os efeitos agudos do fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 β (IL-1 β), na excitabilidade da membrana de neurônios que expressam a proteína agouti-relacionada (AgRP) ou neurônios produtores de proopiomelanocortina (POMC) do núcleo arqueado do hipotálamo (ARH). Descobrimos que o TNF- α e a IL-1 β induz inibição aguda na atividade elétrica de 35-42% das células que expressam AgRP no ARH. A IL-6 não induziu alterações agudas na atividade dos neurônios estudados. A co-infusão de IL-6 não afetou a resposta geral induzida por IL-1 β na atividade dos neurônios AgRP. Nossos resultados indicam que os neurônios produtores de AgRP são influenciados pelo TNF- α e da IL-1 β afetando possivelmente a ingestão alimentar em situações caracterizadas por altos níveis dessas citocinas, tais como as observadas durante condições inflamatórias agudas. Na segunda parte da tese, avaliamos a importância da ação do hormônio do crescimento (GH) e do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) sobre neurônios que expressam somatostatina (SST). A expressão do receptor de GH no cérebro é importante para permitir que neurônios neuroendócrinos detectem os níveis de GH e regulem a secreção hipofisária de GH por retroalimentação negativa. O eixo somatotrófico é constituído principalmente por neurônios que expressam o hormônio liberador de GH (GHRH) e a SST. O GHRH e a SST regulam de forma positiva e negativa, respectivamente, a síntese e liberação de GH hipofisário. Para entender as vias pelas quais o GH promove tais ações avaliamos em camundongos os efeitos induzidos pela ablação seletiva do receptor de IGF-1 e de GH e de IGF-1, exclusivamente em neurônios que expressam SST. Surpreendentemente, nossos resultados mostraram que a deleção seletiva tanto do receptor de IGF-1 quanto dos receptores de GH e de IGF-1 não promoveram alterações de crescimento, no metabolismo energético e na secreção de IGF-1 entre os grupos, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Portanto, neurônios SST podem não ser o local onde a retroalimentação negativa acontece. Estes resultados contribuem para o entendimento a respeito da importância fisiológica da ação de citocinas e fatores de crescimento sobre a atividade de neurônios hipotalâmicos e no controle neuroendócrino do metabolismo.

Palavras-chave: Citocina. Fator de Necrose Tumoral, Interleucina 1. Hormônio do Crescimento. Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

ABSTRACT

CHAVES, F.M. Effects of cytokines and growth factors on hypothalamic neurons: a study on tumor necrosis factor- α , interleukin-6, interleukin IL-1 β , growth hormone and type 1 insulin-like growth factor. 2021. – 109p. Thesis (Doctor in Science) Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

The hypothalamus plays an important role in body homeostasis. Inflammatory cytokines can provide changes in energy homeostasis, influencing food intake. We performed electrophysiological records to investigate the acute effects of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β) on the excitability of the agouti-related protein (AgRP) or proopiomelanocortin (POMC) expressing neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH). We showed that TNF- α and IL-1 β promote an acute inhibition in the electrical activity of 35-42% of AgRP expressing neurons in ARH. IL-6 showed no acute changes in the activity of AgRP or POMC expressing neurons. Co-infusion of IL-6 did not affect the overall IL-1 β -induced response in the activity of AgRP neurons. Our results suggest that AgRP expressing neurons are influenced by TNF- α and IL-1 β , possibly, affecting food intake in conditions where these cytokines are elevated, such as the ones observed in acute inflammation. In the second part of the thesis, we evaluated the importance of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in neurons that express somatostatin (SST). GH receptor expression in the brain allows neuroendocrine neurons to detect GH circulating levels and to regulate GH pituitary secretion by negative feedback. The somatotrophic axis consists mainly of neurons that express GH-releasing hormone (GHRH) and SST. GHRH and SST regulate positively and negatively, respectively, the synthesis and release of pituitary GH. To understand how GH promotes such actions, we evaluated, in mice, the induced effects caused by selective ablation of IGF-1 receptors, and both, GH and IGF-1 receptors, only in SST expressing neurons. Surprisingly, our results showed that selective deletion of both IGF-1 receptor, and GH and IGF-1 receptors did not promote growth changes, in energy metabolism, and in IGF-1 secretion between groups, both in males and females. Therefore, SST neurons may not be responsible for GH negative feedback. These results contribute to the understanding of the physiological importance of cytokine actions and growth factors on the activity of hypothalamic neurons, and the neuroendocrine control of metabolism.

Palavras-chave: Cytokine. Tumor Necrosis Factor, Interleukin 1. Growth Hormone. Insulin-like growth factor

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Processo de preparação do encéfalo para registro eletrofisiológico.....	15
Figura 2. Processo de inserção do encéfalo na câmara de gravação e fotomicrografia mostrando a ponta da pipeta (seta) em uma célula gravada no ARH.....	15
Figura 3. Fotomicrografias de cortes coronais do encéfalo de camundongos AgRP-Cre/tdTomato e POMC-Cre/GFP.....	17
Figura 4. Perfis celulares encontrados	18
Figura 5. Efeitos do TNF- α sobre neurônios AgRP.....	19
Figura 6. Efeitos da citocina IL-6 sobre neurônios AgRP.....	20
Figura 7. Efeitos da citocina IL-1 β sobre neurônios AgRP.....	21
Figura 8. Efeitos do TNF- α sobre neurônios POMC	22
Figura 9. Efeitos da citocina IL-6 sobre neurônios POMC.....	23
Figura 10. Avaliação de peso e composição corporal de animais machos.....	40
Figura 11. Avaliação de peso e composição corporal de animais fêmeas.....	41
Figura 12. Análise de homeostase glicêmica de animais Machos.....	42
Figura 13. Análise de homeostase glicêmica de animais Fêmeas.....	42
Figura 14. Análise do balanço energético de animais Machos.....	43
Figura 15. Análise do balanço energético de animais Fêmeas.....	44
Figura 16. Comprimento naso-anal e peso dos órgãos Machos.....	45
Figura 17. Comprimento naso-anal e peso dos órgãos Fêmeas.....	45
Figura 18. Secreção sérica de IGF-1 de animais Machos.....	46
Figura 19. Secreção sérica de IGF-1 de animais Fêmeas.....	46
Figura 20. Avaliação de peso e composição corporal de animais Machos.....	48
Figura 21. Avaliação de peso e composição corporal de animais Fêmeas.....	49

Figura 22. Análise de homeostase glicêmica de animais Machos.....	50
Figura 23. Análise de homeostase glicêmica de animais Fêmeas.....	50
Figura 24. Análise do balanço energético de animais Machos.....	51
Figura 25. Análise do balanço energético de animais Fêmeas.....	52
Figura 26. Comprimento naso-anal e peso dos órgãos Machos.....	53
Figura 27. Comprimento naso-anal e peso dos órgãos Fêmeas.....	54
Figura 28. Secreção sérica de IGF-1 de animais Machos.....	54
Figura 29. Secreção sérica de IGF-1 de animais Fêmeas.....	55
Figura 30. Avaliação de peso e composição corporal de animais machos.....	86
Figura 31. Avaliação de peso e composição corporal de animais fêmeas.....	87
Figura 32. Análise de homeostase glicêmica de animais Machos.....	88
Figura 33. Análise de homeostase glicêmica de animais Fêmeas.....	88
Figura 34. Análise do balanço energético de animais Machos.....	89
Figura 35. Análise do balanço energético de animais Fêmeas.....	90
Figura 36. Comprimento naso-anal e peso dos órgãos Machos.....	91
Figura 37. Comprimento naso-anal e peso dos órgãos Fêmeas.....	91
Figura 38. Secreção sérica de IGF-1 de animais Machos.....	92
Figura 39. Secreção sérica de IGF-1 de animais Fêmeas.....	92

LISTA DE TABELAS

14 **Tabela 1.** Doses de TNF- α , IL-6 e IL-1 β que foram administradas neste projeto

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRP	Proteína Agouti-relacionada
ARH	Núcleo Arqueado do Hipotálamo
AKT	Proteína Quinase B
CART	Neuropeptídeo transcrito regulador de cocaína e anfetamina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMH	Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo
GH	Hormônio do Crescimento
GHR	Receptor do Hormônio do Crescimento
GHRH	Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
ICV	Intra Cérebro Ventricular
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IGF-1R	Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IGFBPs	Preteínas ligantes do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL-2	Interleucina-2
IL-1 β	Interleucina-1beta
IL-6	Interleucina-6
IR	Resistência de membrana
JAK2	Janus Cinase
LHA	Área Hipotalâmica Lateral
LPS	Lipopolissacarídeo
MCR	Receptor de melanocortina
MC3R	Receptor 3 da melanocortina
MC4R	Receptor 4 da melanocortina
mTOR	Alvo de Mamíferos da Rapamicina
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMv	Núcleo Pré-Mamilar Ventral
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-Quinase

POMC	Proopiomelancortina
PV	Núcleo Periventricular
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RMP	Potencial de Repouso de Membrana
SNC	Sistema Nervoso Central
SST	Somatostatina
STAT5	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 5
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TH	Tirosina Hidroxilase
VMH	Núcleo Ventromedial do Hipotálamo
α -MSH	Hormônio estimulante de alfa-melanócitos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
CAPÍTULO 1: ESTUDO DOS EFEITOS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS SOBRE PROPRIEDADES BIOFÍSICAS DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO ARQUEADO DO HIPOTÁLAMO	5
REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Justificativa	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Animais	12
3.2 Registros eletrofisiológicos	13
3.3 Critérios para aceitação dos registros.....	15
3.4 Forma de análise dos resultados.....	16
4 RESULTADOS	17
4.1 Validação do modelo.....	17
4.2 Caracterização das propriedades biofísicas de repouso dos neurônios AgRP.....	18
4.3 Avaliação dos efeitos do TNF- α sobre neurônios AgRP	18
4.4 Avaliação dos efeitos da IL-6 sobre neurônios AgRP.....	19
4.5 Avaliação dos efeitos da IL-1 β sobre neurônios AgRP	20
4.6 Caracterização das propriedades biofísicas de repouso dos neurônios POMC.....	21
4.7 Avaliação dos efeitos do TNF- α sobre neurônios POMC.....	22
4.8 Avaliação dos efeitos da IL-6 sobre neurônios POMC.....	23
5 DISCUSSÃO.....	24
6 CONCLUSÃO	27
CAPÍTULO 2: EFEITO DA DELEÇÃO DO RECEPTOR DE IGF1 E/OU RECEPTOR DE GH EM NEURÔNIOS QUE EXPRESSAM SOMATOSTATINA SOBRE O CRESCIMENTO CORPORAL, EIXO SOMATOTRÓFICO E METABOLISMO DE CAMUNDONGOS.....	28
REVISÃO DA LITERATURA.....	28
7 OBJETIVOS	33
7.1 Objetivo geral.....	33
7.2 Objetivos específicos.....	33
7.3 Justificativa	33
8 MATERIAL E MÉTODOS	35
8.1 Animais	35

8.2	Avaliação do crescimento somático	35
8.3	Avaliação do Balanço energético	36
8.4	Teste de tolerância a glicose (GTT)	36
8.5	Teste de sensibilidade à insulina (ITT)	36
8.6	Teste da resposta contra regulatória à hipoglicemia após injeção de 2-deoxiglicose (2DG) 37	
8.7	Eutanásia	37
8.8	Avaliação do eixo somatotrófico.....	37
8.9	Análise dos resultados.....	38
9	RESULTADOS	39
9.1	Deleção do IGF-1R nas células SST	39
9.1.1	Composição corporal e consumo alimentar	39
9.1.2	Homeostase glicêmica.....	41
9.1.3	Balanço Energético	42
9.1.4	Comprimento naso-anal e peso dos órgãos	44
9.1.5	Avaliação do eixo somatotrófico.....	46
9.2	Dupla deleção do GHR e IGF-1R nas células SST	47
9.2.1	Composição corporal e consumo alimentar	47
9.2.2	Homeostase glicêmica.....	49
9.2.3	Balanço Energético	50
9.2.4	Comprimento naso-anal e peso dos órgãos	52
9.2.5	Avaliação do eixo somatotrófico.....	54
10	DISCUSSÃO.....	56
11	CONCLUSÃO	59
12	CONCLUSÃO GERAL	60
13	REFERÊNCIAS	61
14	ANEXO 1: Artigo publicado.....	73
15	ANEXO 2: Resultados extras.....	85
15.1	Deleção do GHR nas células SST	85
15.1.1	Composição corporal e consumo alimentar	85
15.1.2	Homeostase glicêmica.....	87
15.1.3	Balanço Energético	88
15.1.4	Comprimento naso-anal e peso dos órgãos	90
15.1.5	Avaliação do eixo somatotrófico.....	92

1 INTRODUÇÃO

O hipotálamo está localizado no diencéfalo, posicionado na base cerebral perto da barreira hematoencefálica, estando preparado para monitorar, processar e transmitir informações viscerais e de modulação da homeostasia. Além disso, o hipotálamo é responsável pela ligação do sistema nervoso e endócrino (KIM; CHOE, 2019). Dessa forma, o hipotálamo regula a secreção dos hormônios da adeno-hipófise, bem como produz os hormônios liberados na neuro-hipófise, em resposta a estímulos neurais e hormonais (STANFIELD, 2014). Experimentos que causavam lesões nos núcleos hipotalâmicos mostraram que alterações nessa área do cérebro resultavam não apenas em alterações endócrinas, mas também em mudanças no comportamento alimentar e no gasto de energia, podendo alterar o equilíbrio energético (ANAND; BROBECK, 1951; MILLER, 1978; PIMENTEL; GANESHAN; CARVALHEIRA, 2014). Portanto, o hipotálamo desempenha importante papel na homeostasia corporal (ARAUJO; MORAES; CINTRA; VELLOSO, 2016; DENIS; ARRUDA; ROMANATTO; MILANSKI *et al.*, 2010).

O hipotálamo controla importantes funções corporais, como pressão arterial, frequência cardíaca, ritmos circadianos, regulação do sono, reprodução e comportamento sexual, glicose periférica e homeostase lipídica (KIM; CHOE, 2019; SAMODIEN; JOHNSON; PHEIFFER; MABASA *et al.*, 2019; SAPER; SCAMMELL; LU, 2005; VALDEARCOS; XU; KOLIWAD, 2015). Além disso, é o principal responsável por regular a homeostase energética (ARAUJO; MORAES; CINTRA; VELLOSO, 2016; PIMENTEL; GANESHAN; CARVALHEIRA, 2014). O balanço energético é formado por diferentes mecanismos, englobando sinalização molecular e celular, sinais neurais, hormonais e metabólicos (BELGARDT; HUSCH; ROTHER; ERNST *et al.*, 2008; KÖNNER; HESS; TOVAR; MESAROS *et al.*, 2011; PLUM; SCHUBERT; BRÜNING, 2005; SÁNCHEZ-LASHERAS; KÖNNER; BRÜNING, 2010). Ademais, a ingestão de alimentos e o gasto energético são controlados por neurônios especializados do hipotálamo (ANAND; BROBECK, 1951; ARAUJO; MORAES; CINTRA; VELLOSO, 2016; WOODS; SCHWARTZ; BASKIN; SEELEY, 2000).

Citocinas inflamatórias podem proporcionar alterações no balanço energético, influenciando positivamente ou negativamente a ingestão alimentar. Em situações no qual ocorre inflamação aguda e de alto grau, tais como as provocadas por infecções e lesões, normalmente observa-se anorexia (THALER; CHOI; SCHWARTZ; WISSE, 2010). Por outro lado, a inflamação de baixo grau provocada pela obesidade favorece o aumento da ingestão alimentar (JOHNSON; OLEFSKY, 2013; SOUZA, GABRIELA FP; SOLON, CARINA; NASCIMENTO, LUCAS F; DE-LIMA-JUNIOR, JOSE C *et al.*, 2016).

O hormônio do crescimento (GH) também apresenta efeitos metabólicos importantes. A secreção de GH aumenta a lipólise e ácidos graxos livres na circulação sanguínea (DURAN-ORTIZ; NOBOA; KOPCHICK, 2018). O GH promove efeitos hiperglicêmicos que se manifestam pela estimulação da gliconeogênese hepática (DEHKHODA; LEE; MEDINA; BROOKS, 2018; DURAN-ORTIZ; NOBOA; KOPCHICK, 2018) ou pelo aumento da resistência à insulina no músculo esquelético (BARBOUR; SHAO; QIAO; LEITNER *et al.*, 2004). Portanto, altos níveis de GH podem causar resistência à insulina e diabetes mellitus (LUGER; PRAGER; GAUBE; GRAF *et al.*, 1990; WASINSKI; FRAZÃO; DONATO JR, 2019). Apesar dos efeitos biológicos mais conhecidos do GH serem mediados pelo fígado, tecido adiposo branco, músculo esquelético e osso (DEHKHODA; LEE; MEDINA; BROOKS, 2018; WASINSKI; FRAZÃO; DONATO JR, 2019), o Sistema Nervoso Central (SNC) também expressa receptor de GH (GHR) (BURTON; KABIGTING; CLIFTON; STEINER, 1992). O GHR é altamente expresso no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH) (BURTON; KABIGTING; CLIFTON; STEINER, 1992; KASTRUP; LE GREVÈS; NYBERG; BLOMQUIST, 2005). A expressão de GHR no cérebro é importante para permitir que os neurônios neuroendócrinos detectem os níveis de GH e regulem a secreção hipofisária de GH por retroalimentação negativa (STEYN; TOLLE; CHEN; EPELBAUM, 2011; WASINSKI; FRAZÃO; DONATO JR, 2019). É importante ressaltar que vários efeitos do GH são mediados por outro hormônio, o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) (DEHKHODA; LEE; MEDINA; BROOKS, 2018). A ativação do GHR induz a expressão de IGF-1 em vários tecidos. Portanto, o eixo somatotrópico pode ser resumido pelo controle hipotalâmico da secreção hipofisária do GH, a ativação do GHR em vários tecidos e a secreção hepática do IGF-1 que, juntamente com o GH, regula várias funções de crescimento e metabólicas (WASINSKI; FRAZÃO; DONATO JR, 2019).

Com o intuito de melhorar o entendimento a respeito da importância fisiológica da ação de citocinas e fatores de crescimento sobre a atividade de neurônios hipotalâmicos e no controle neuroendócrino do metabolismo, a presente tese foi organizada em dois capítulos independentes. Em cada capítulo, foram investigados os efeitos de diferentes fatores hormonais em populações neuronais específicas.

CAPÍTULO 1: ESTUDO DOS EFEITOS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS SOBRE PROPRIEDADES BIOFÍSICAS DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO ARQUEADO DO HIPOTÁLAMO

REVISÃO DA LITERATURA

O ARH é formado por conjuntos de neurônios que apresentam efeitos importantes, porém antagônicos sobre a regulação do balanço energético (ANAND; BROBECK, 1951; ARAUJO; MORAES; CINTRA; VELLOSO, 2016; CHOWEN; FRAGO; FERNÁNDEZ-ALFONSO, 2019; JAIS; BRÜNING, 2017; PIMENTEL; GANESHAN; CARVALHEIRA, 2014). Um primeiro grupo celular é identificado pela expressão de neuropeptídeos orexígenos, incluindo a proteína agouti-relacionada (AgRP) e o neuropeptídeo Y (NPY), ambos potentes indutores do aumento do apetite. Outro grupo pode ser identificado pela expressão do neuropeptídeo transcrito regulador de cocaína e anfetamina (CART) e o proopiomelancortina (POMC). O POMC é expresso como um peptídeo precursor, que é processado pós-tradução em vários peptídeos, incluindo ligantes do receptor de melanocortina (MCR) (BIEBERMANN; CASTAÑEDA; VAN LANDEGHEM; VON DEIMLING *et al.*, 2006; CHOWEN; FRAGO; FERNÁNDEZ-ALFONSO, 2019; FAN; BOSTON; KESTERSON; HRUBY *et al.*, 1997; JAIS; BRÜNING, 2017; LEE; CHALLIS; THOMPSON; YEO *et al.*, 2006). Esses hormônios estimuladores de melanócitos são liberados nas terminações sinápticas dos neurônios da POMC e atuam nos receptores 3 e 4 da melanocortina (MC3R/MC4R) expressos em neurônios de segunda ordem que se localizam, entre outras regiões-alvo, no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) para suprimir a ingestão alimentar, ou seja, apresentando efeitos anorexígenos (ANAND; BROBECK, 1951; ARAUJO; MORAES; CINTRA; VELLOSO, 2016; CHOWEN; FRAGO; FERNÁNDEZ-ALFONSO, 2019; PIMENTEL; GANESHAN; CARVALHEIRA, 2014; VOGT; BRÜNING, 2013). O AgRP e o hormônio estimulador de melanócitos α (α -MSH), um neuropeptídeo produzido a partir da clivagem do pré-pró-hormônio POMC, deflagram suas ações sobre o comportamento alimentar por meio de efeitos antagônicos no MC4R. Assim, o α -MSH é um agonista deste receptor, enquanto o AgRP age como um antagonista, impedindo os efeitos anorexígenos do α -MSH. Neurônios que

expressam o MC4R fazem parte do circuito da homeostase de energia e podem regular a resposta aos sinais de saciedade e consequentemente, o comportamento alimentar por meio de projeções recíprocas com centros autonômicos do rombencéfalo, como o núcleo do trato solitário (NTS) (HILL, 2012; JAIS; BRÜNING, 2017; SEONG; KANG; SUN; KIM, 2019; SUTTON; MYERS JR; OLSON, 2016). Dessa forma, os neurônios AgRP/NPY e POMC/CART do ARH fazem parte do sistema central responsável pela regulação do balanço energético e ingestão alimentar (ARAUJO; MORAES; CINTRA; VELLOSO, 2016; CHOWEN; FRAGO; FERNÁNDEZ-ALFONSO, 2019; PIMENTEL; GANESHAN; CARVALHEIRA, 2014).

Além disso, as populações neuronais AgRP/NPY ou POMC expressam receptores, nos quais ligam-se hormônios, e estes respondem a estímulos metabólicos para controlar o gasto de energia e a ingestão alimentar (BELGARDT; BRÜNING, 2010; CHOWEN; FRAGO; FERNÁNDEZ-ALFONSO, 2019; VOGT; BRÜNING, 2013). A leptina (sintetizada pelo tecido adiposo) e a insulina (sintetizada pelo pâncreas) são dois exemplos de hormônios responsáveis por sinais adipostáticos para o cérebro (ARAUJO; MORAES; CINTRA; VELLOSO, 2016; DONATO, 2012). A insulina possui atividades metabólicas, neuromodulatórias e neuroendócrinas. Ademais, atua no SNC estimulando a atividade dos neurônios produtores de POMC e suprimindo a atividade de neurônios produtores de AgRP/NPY, promovendo efeito anorexigênico (ARAUJO; MORAES; CINTRA; VELLOSO, 2016; JAIS; BRÜNING, 2017; PIMENTEL; GANESHAN; CARVALHEIRA, 2014; PLIQUETT; FÜHRER; FALK; ZYSSET *et al.*, 2006). A resistência à insulina diminui sinais de saciedade no SNC e pode induzir indiretamente obesidade (JAIS; BRÜNING, 2017; PLIQUETT; FÜHRER; FALK; ZYSSET *et al.*, 2006; SEONG; KANG; SUN; KIM, 2019). Paralelamente, a leptina também estimula a atividade de neurônios produtores de POMC e suprime a atividade de neurônios produtores de AgRP/NPY (CHOWEN; FRAGO; FERNÁNDEZ-ALFONSO, 2019; COPPARI; ICHINOSE; LEE; PULLEN *et al.*, 2005; JAIS; BRÜNING, 2017; SEONG; KANG; SUN; KIM, 2019; WOODS; SCHWARTZ; BASKIN; SEELEY, 2000). Dessa forma, a leptina sinaliza para o hipotálamo sobre as reservas de energia corporal, para que ele possa regular o balanço energético de forma adequada (COPPARI; ICHINOSE; LEE; PULLEN *et al.*, 2005; FREDERICH; HAMANN; ANDERSON; LÖLLMANN *et al.*, 1995; JAIS; BRÜNING, 2017; SEONG; KANG; SUN; KIM, 2019).

Uma característica importante sobre os neurônios do ARH é que eles estão muito próximos da eminência mediana, por isso essa região possui uma barreira hematoencefálica menos seletiva do que outras áreas do cérebro (SCHAEFFER; LANGLET; LAFONT; MOLINO *et al.*, 2013). Conseqüentemente, os neurônios do ARH são expostos a fatores circulantes, como hormônios, citocinas, nutrientes e toxinas (HOLZWARTH-MCBRIDE; HURST; KNIGGE, 1976; SCHAEFFER; LANGLET; LAFONT; MOLINO *et al.*, 2013). E apesar dessa característica permitir que os neurônios do ARH sejam uma interface entre o que acontece na periferia para gerar respostas centrais, esses neurônios se tornam mais vulneráveis a injúrias ou grandes variações nos níveis de fatores circulantes (HAMPL; BICIKOVA; SOSVOROVA, 2015; HOLZWARTH-MCBRIDE; HURST; KNIGGE, 1976; OLOFSSON; UNGER; CHEUNG; XU, 2013). Uma vez que o hipotálamo integra os sinais dos sistemas periféricos, traduzindo em alterações neuronais, neuroendócrinas e metabólicas, ele também é sensível a alterações no estado inflamatório (BURFEIND; MICHAELIS; MARKS, 2016; CLEMENZI; WELLHAUSER; ALJGHAMI; BELSHAM, 2019; JAIS; BRÜNING, 2017; VALDEARCOS; XU; KOLIWAD, 2015). Assim, os neurônios AgRP e POMC são afetados por citocinas envolvidas nas respostas inflamatórias e curiosamente, mudanças na inflamação hipotalâmica são capazes de produzir efeitos opostos na homeostase energética (OLOFSSON; UNGER; CHEUNG; XU, 2013; SOUZA, GABRIELA FP; SOLON, CARINA; NASCIMENTO, LUCAS F; *et al.*, 2016).

Classicamente, sistemas fisiológicos reagem à inflamação a fim de promover defesa e sobrevivência à patógenos e injúrias, levando à febre, fadiga e anorexia em resposta aguda à doença (BURFEIND; MICHAELIS; MARKS, 2016). Ademais, é bem descrito que a obesidade é caracterizada por um quadro de inflamação sistêmica de baixo grau. Este tipo de estado inflamatório pode ser denominado “metainflamação”, o qual seria uma inflamação induzida metabolicamente, para distingui-la da inflamação mais aguda e de alto grau associada a infecções e lesões que frequentemente resulta em supressão do apetite e perda de peso (HERRICK; FAVELA; SIMERLY; ABUMRAD *et al.*, 2018). Portanto, a inflamação induz efeitos bifásicos na ingestão alimentar (ONO, 2019).

Enquanto a obesidade afeta vários órgãos, como tecido adiposo, intestino, fígado e hipotálamo, está associada à inflamação sistêmica e ao metabolismo energético alterado, é considerada um fator que perturba a capacidade dos neurônios hipotalâmicos

de controlar a homeostase energética, predispondo indivíduos a desequilíbrios metabólicos e consequentemente, a ingestão de dieta rica em gordura induz aumentos agudos na expressão hipotalâmica de citocinas pró-inflamatórias (JOHNSON; OLEFSKY, 2013; OLOFSSON; UNGER; CHEUNG; XU, 2013; SOUZA, G. F.; SOLON, C.; NASCIMENTO, L. F.; DE-LIMA-JUNIOR, J. C. *et al.*, 2016; THALER, JOSHUA P; YI, CHUN-XIA; SCHUR, ELLEN A; GUYENET, STEPHAN J *et al.*, 2012; VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015). A inflamação aguda e de alto grau associada a infecções e lesões produz uma resposta à doença no SNC, frequentemente associada a febre, anorexia e sonolência (THALER; CHOI; SCHWARTZ; WISSE, 2010). Romanatto *et al.* (2007), demonstrou que a inflamação de alto grau causada por infecção ou uma injeção intracerebroventricular (ICV) de dose elevada do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) suprime a ingestão alimentar (ROMANATTO; CESQUINI; AMARAL; ROMAN *et al.*, 2007). Assim, fica claro que, dependendo de sua magnitude, duração e características, os sinais inflamatórios hipotalâmicos podem favorecer um balanço energético positivo ou negativo (THALER; CHOI; SCHWARTZ; WISSE, 2010).

A ativação do sistema imune em resposta a uma lesão tecidual ou infecção desencadeia a liberação de citocinas. Essas citocinas, por sua vez, podem produzir respostas metabólicas (SCARLETT; JOBST; ENRIORI; BOWE *et al.*, 2007). Citocinas podem ser caracterizadas como moléculas proteicas, glicosiladas ou não, que promovem sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células, e sua expressão é aumentada em condições de estresse, como doenças inflamatórias (HOPKINS; ROTHWELL, 1995; RIVEST, 2001; ROTHWELL; HOPKINS, 1995). As citocinas pró- e anti-inflamatórias possuem amplas atividades e são expressas por diversas células. Assim, citocinas e seus receptores são distribuídos amplamente no SNC (HOPKINS; ROTHWELL, 1995; ROTHWELL; HOPKINS, 1995). As citocinas Interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6) e o TNF- α foram propostas como sinais que ativam respostas controladas centralmente, como mudanças neuroendócrinas para lesões e infecções sistêmicas (HOPKINS; ROTHWELL, 1995; RODNEY; OSIER; GILL, 2018; SCHROETER; JANDER, 2005; SKELLY; HENNESSY; DANSEREAU; CUNNINGHAM, 2013). O próprio sistema nervoso pode promover a síntese de citocinas durante a resposta inflamatória (HOPKINS; ROTHWELL, 1995; SKELLY; HENNESSY; DANSEREAU; CUNNINGHAM, 2013). Ademais, as citocinas são

capazes de induzir a produção e liberação de outras substâncias, a fim de promover a sobrevivência e reparo do tecido nervoso (HOPKINS; ROTHWELL, 1995).

Embora as consequências da inflamação hipotalâmica tenham sido amplamente investigadas, um aspecto pouco estudado envolve os efeitos de citocinas pró-inflamatórias na atividade elétrica dos neurônios AgRP / NPY e POMC. Scarlett et al (2007) demonstraram que a IL-1 β aumenta a sinalização central de POMC hipotalâmico, estimulando-o a liberar α -MSH, que centralmente apresenta efeitos anorexígenos (SCARLETT; JOBST; ENRIORI; BOWE *et al.*, 2007). De acordo com a literatura, a citocina IL-1 β é um dos mais potentes ativadores do Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), mas outras citocinas, como interleucina-2 (IL-2), IL-6 e TNF- α , podem afetar as respostas neuroendócrinas e agir sinergicamente com IL-1 β (RIVIER; RIVEST, 1993; ROTHWELL; HOPKINS, 1995).

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica reconhecida primariamente por apresentar atividade antitumoral (CARSWELL; OLD; KASSEL; GREEN *et al.*, 1975). Foi identificado que o TNF- α é um fator pró-inflamatório que exerce papel central no desencadeamento da cascata de outras citocinas (MILLER; ROGERS; MUIRDEN, 1993). O TNF- α é produzido por muitos tipos de células, como, neutrófilos, monócitos, macrófagos ativados, linfócitos T e B, células natural killer, astrócitos, mastócitos, células endoteliais, células do músculo liso, células sinoviais, células endimárias do cérebro e micróglia (CHUNG; BENVENISTE, 1990; GOLDFELD; STROMINGER; DOYLE, 1991; MILLER; ROGERS; MUIRDEN, 1993; NADEAU; RIVEST, 1999; WILKINSON; EDWARDS, 1991). Além disso, o receptor 2 do TNF- α é abundantemente expresso em neurônios do ARH, especialmente os neurônios POMC (PURKAYASTHA; ZHANG; CAI, 2011). Já a IL-6 é uma citocina pleiotrópica que pode ter ações pró- e anti-inflamatórias, dependendo do tecido-alvo e da concentração (ALLEN; FEBBRAIO, 2010). Durante a inflamação, como resposta de fase aguda, grandes quantidades de IL-6 são produzidas por células imunes, induzindo o crescimento e a proliferação das células dos sistemas hematopoiético e imunológico (BAUER; KERR; PATTERSON, 2007). Na ausência de inflamação, o tecido adiposo em indivíduos sedentários e o músculo esquelético em praticantes de atividade física sintetizam a IL-6 circulante, ou seja, a citocina IL-6 também é sintetizada por órgãos não imunes e que fazem parte da regulação da composição corporal e do metabolismo (MOHAMED-ALI; FLOWER; SETHI; HOTAMISLIGIL *et al.*, 2001; PEDERSEN; STEENSBERG; SCHJERLING, 2001). Além disso, a IL-6 também é expressa no SNC,

em células como astrócitos, micróglia e em neurônios do hipotálamo (ASCHNER, 1998; SCHÖBITZ; DE KLOET; SUTANTO; HOLSBOER, 1993; SHIZUYA; KOMORI; FUJIWARA; MIYAHARA *et al.*, 1998). Logo, em condições inflamatórias e não inflamatórias a IL-6 é sintetizada tanto periféricamente quanto centralmente, embora suas funções não estejam completamente elucidadas em ambos os locais. Rother et al (2003), demonstraram que quando a IL-6 é produzida pelo tecido adiposo e tem sua expressão aumentada, é capaz de induzir resistência à insulina (ROTTER; NAGAEV; SMITH, 2003). Entretanto, a IL-6 também pode ser essencial para o controle do metabolismo durante a saúde (FEBBRAIO; ROSE-JOHN; PEDERSEN, 2010).

No entanto, ainda não se sabe se outras citocinas pró-inflamatórias importantes, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , são capazes de induzir efeitos agudos da atividade elétrica dos neurônios AgRP/NPY e de POMC. Portanto, entender como essas citocinas interagem e regulam os circuitos que regulam o balanço energético, particularmente por meio de suas ações em neurônios do ARH, é fundamental para a compreensão geral desses distúrbios do balanço energético. Esses achados podem contribuir para a compreensão de como as citocinas pró-inflamatórias afetam os circuitos neurais que regulam a ingestão e o metabolismo de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos agudos induzidos pelo TNF- α , IL-6 e IL-1 β no potencial de repouso de membrana (RMP) e na resistência de membrana (IR) dos neurônios AgRP/NPY e POMC no ARH.

2.2 Justificativa

Apesar de estar bem estabelecida a ampla importância da resposta inflamatória no hipotálamo para o controle do balanço energético e na predisposição à obesidade, ainda permanece pouco estudada a ação desses fatores sobre a atividade neuronal. Visando justamente preencher essa lacuna do conhecimento, o objetivo deste projeto foi avaliar o efeito das citocinas pró-inflamatórias – TNF- α , IL-6 e IL-1 β sobre o RMP e a IR de neurônios POMC e AgRP do ARH. Portanto, nosso estudo poderá determinar com maiores detalhes quais efeitos agudos citocinas pró-inflamatórias apresentam sobre a atividade elétrica de neurônios POMC e AgRP do ARH. A partir desses resultados, este projeto poderá ajudar na compreensão de como citocinas podem afetar o balanço energético contribuindo, portanto, no entendimento dos mecanismos dos circuitos neurais que regulam a ingestão e o metabolismo de alimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos geneticamente modificados que empregam a tecnologia do sistema Cre-LoxP. Essa tecnologia consiste no cruzamento de animais que carregam a sequência para codificar a enzima Cre-recombinase com animais que carregam o gene que expressa a proteína “repórter” tdTomato ou a proteína verde fluorescente (GFP) induzível por Cre. A enzima Cre retira o *stop cassette*, que impede a expressão dessas proteínas. Dessa forma, somente as células de interesse, que expressam a enzima Cre, serão capazes de expressar as proteínas tdTomato ou GFP. Os quatro modelos utilizados nesse estudo foram POMC-Cre (005965 - STOCK Tg(Pomc1-cre)16Lowl/J), AgRP-Cre (012899 - STOCK Agrptm1(cre)Lowl/J), GFP (004178 - B6.129 (Cg) -Tg (CAG-Bgeo/GFP) 21Lbe/J) e o tdTomato-reporter (007909 - B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J). Camundongos POMC-Cre foram cruzados com camundongos GFP-reporter e camundongos AgRP-Cre foram cruzados com camundongos tdTomato-reporter, a fim de produzir todos os animais que foram utilizados no presente trabalho.

Para identificar as mutações gênicas, quando os animais completaram 28 dias de vida, foram separados de suas progenitoras (desmamados) e um pequeno pedaço (0,5 cm) da cauda foi coletado para a análise genética, sendo que marcações em suas orelhas identificavam os animais dentro de sua caixa. Desse pedaço da cauda foi extraído o ácido desoxirribonucleico (DNA), com o qual foram feitos ciclos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando primers específicos para identificar as mutações POMC-Cre, AgRP-Cre, tdTomato ou GFP. O produto do PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose onde o peso molecular das bandas geradas confirmou se o animal expressava ou não a mutação. Os animais foram mantidos no biotério em condições ambientais padrão, com ciclo claro/escuro de 12h/12h, a temperatura de 22-25°C, com acesso a água e ração de roedor padrão.

3.2 Registros eletrofisiológicos

Para examinar os efeitos agudos das citocinas TNF- α (Sigma-Aldrich), IL-6 (Sigma-Aldrich) e IL-1 β (Abcam, Cambridge, UK) sobre a excitabilidade da membrana dos neurônios POMC ou AgRP e a coadministração de IL-6 nas respostas induzidas por IL-1 β em neurônios AgRP, foram realizados registros eletrofisiológicos no modo *whole-cell* em camundongos POMC-Cre/GFP ou AgRP-Cre/tdTomato machos (7 a 12 semanas de vida). Os animais foram anestesiados com isoflurano 100%, em seguida foram decapitados e o cérebro inteiro foi removido. Após a remoção, os cérebros foram imediatamente submersos em solução gelada, saturada com carbogênio (95% de O₂ e 5% CO₂) em fluido cefalorraquidiano artificial (aCSF) (aCSF; 124 mM NaCl, 2.8mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃ e 5 mM glicose). As seções coronais de um bloco hipotalâmico (250 μ m) foram cortadas em vibrátomo da marca Leica modelo VT1000S e depois incubadas em solução aCSF oxigenada (30 °C) durante pelo menos 1h antes de serem transferidas para a câmara de gravação. Os cortes encefálicos foram transferidos para a câmara de gravação e foram continuamente banhados em solução aCSF oxigenada (30 °C) em um fluxo de aproximadamente 2 mL/min. Os neurônios foram identificados pela presença das proteínas GFP ou tdTomato com o uso de microscopia de fluorescência. A fonte de luz foi trocada para imagens de contraste de interferência diferencial infravermelho para obter o selamento e rompimento da membrana celular (Leica DM6000 FS equipado com um estágio fixo e uma câmera digital de fluorescência monocromática Leica DFC360 FX de alta velocidade). A pipeta contendo o eletrodo de registro foi preenchida com a seguinte solução: K-gluconato 120mM, NaCl 1mM, KCl 10mM, Hepes 10mM, EGTA 5mM, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM, KOH 3mM e (Mg)-ATP 4mM, pH 7,3. Na sequência esta foi acoplada a um pré-amplificador (conhecido como headstage) e a resistência da pipeta apresentava entre 5-7 M Ω . Os registros eletrofisiológicos foram gravados utilizando amplificador multiclamp 700B (Molecular Devices), com filtros entre 2-4 kHz. Os experimentos foram realizados como *whole-cell*, no modo *current-clamp* (corrente = 0), no qual o RMP foi averiguado, bem como, a frequência de potenciais de ação gerados caso a célula que estivesse sendo registrada estivesse ativa. Após 10 minutos de registro para determinarmos as características basais de cada célula, foi testada a ação de uma droga específica, utilizando-se a dose descrita na Tabela 1,

conforme informações encontradas na literatura. As drogas foram adicionadas ao banho por cerca de 5 minutos. O neurônio foi considerado despolarizado ou hiperpolarizado se fosse observada mudança no RMP maior que 5 mV em amplitude, de forma estável e dentro de poucos minutos após aplicação da droga. A resistência da pipeta foi calculada com base em uma resposta a pulsos de correntes hiperpolarizantes (500 ms de 0 a -30 pA) que foram aplicadas antes, durante e após a aplicação da droga ao banho. Os dados foram analisados através do software pCLAMP (Molecular Devices). O potencial de junção líquida foi corrigido durante as análises. O estudo de cada citocina mencionada na Tabela 1 foi realizado separadamente para avaliação de possíveis efeitos tanto em neurônios POMC, como em neurônios AgRP. Cada corte encefálico foi utilizado apenas para uma única aplicação.

Tabela 1: Doses de TNF- α , IL-6 e IL-1 β que foram administradas neste projeto.

Droga	Doses propostas	Referências
Citocinas		
TNF-α	20ng/mL	(KATAFUCHI; MOTOMURA; BABA; OTA <i>et al.</i> , 1997)
IL-6	10ng/mL	(TRUJILLO; SULLIVAN; HARTEN; SCHNEIDER <i>et al.</i> , 2004)
IL-1β	17.5 ng/mL	(SCARLETT; JOBST; ENRIORI; BOWE <i>et al.</i> , 2007)

Para demonstrar os procedimentos para a realização dos registros de *whole-cell path clamp*, preparamos o encéfalo de um animal teste (Figura 1). O encéfalo foi retirado e fixado na base (Figura 1A) para ser cortado no vibrátomo (Figura 1B e 1C). Posteriormente, os cortes foram colocados em banho em solução aCSF oxigenada (30°C) (Figura 1D). Os cortes encefálicos foram transferidos para a câmara de gravação, sendo continuamente banhados em solução aCSF oxigenada (30°C) em um fluxo de aproximadamente 2 mL/min (Figura 2A) e apresentamos a fotomicrografia mostrando a ponta da pipeta (seta) em uma célula gravada no ARH (Figura 2B).

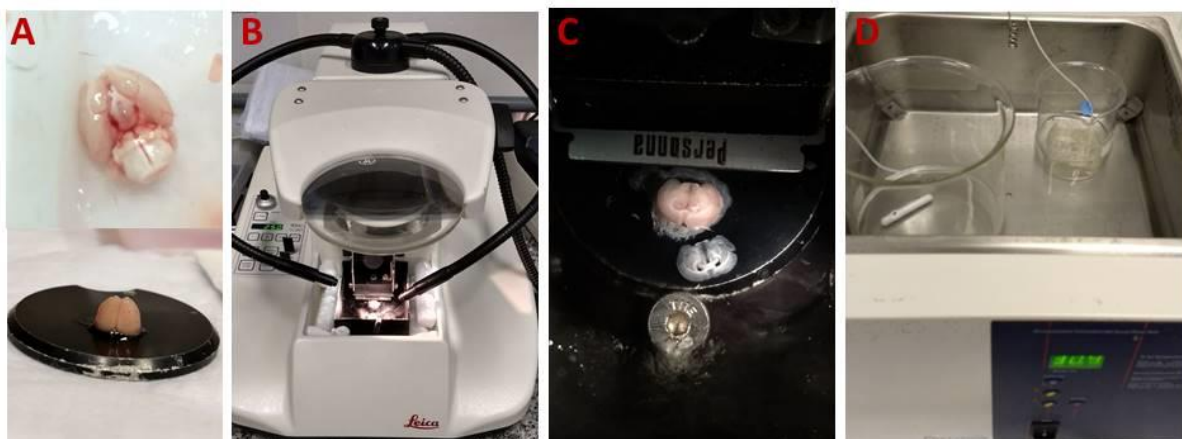


Figura 1. Processo de preparação do encéfalo para registro eletrofisiológico. (A) Encéfalo retirado e fixado na base do vibrátomo. (B) Encéfalo no vibrátomo. (C) Cortes encefálicos a 250 μM . (D) Cortes no banho em solução aCSF oxigenada à 30°C.

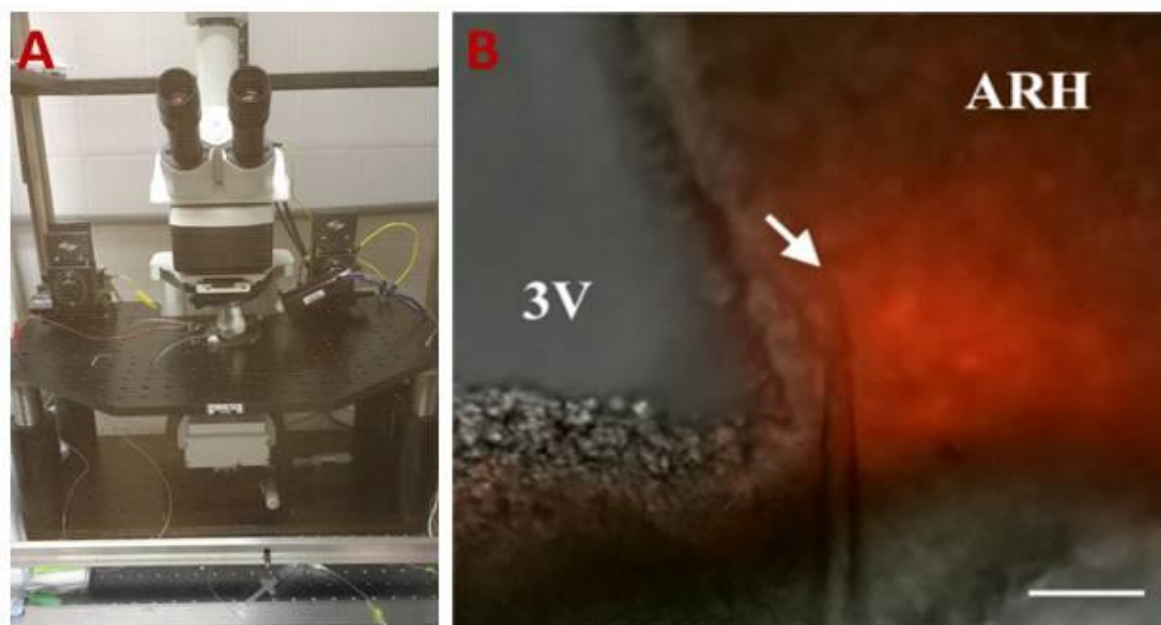


Figura 2. Processo de inserção do encéfalo na câmara de gravação e fotomicrografia mostrando a ponta da pipeta (seta) em uma célula gravada no ARH. Barra de escala, 50 μm . (A) Câmara de gravação e microscópio de fluorescência. (B) Fotomicrografia mostrando a ponta da pipeta (seta) em uma célula gravada no ARH. Abreviações: 3V, terceiro ventrículo, ARH, núcleo arqueado do hipotálamo. Imagem retirada e adaptada de um artigo do nosso grupo (PEDROSO; SILVEIRA; LIMA; FURIGO *et al.*, 2016).

3.3 Critérios para aceitação dos registros

As células registradas aceitas para as análises deveriam apresentar:

- ✓ A capacitância ser em torno de 10 pF
- ✓ A resistência de acesso até 25 $\mu\Omega$
- ✓ A resistência de acesso final não ultrapassar 30% da inicial
- ✓ Estabilidade durante o registro

3.4 Forma de análise dos resultados

O software GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA) foi utilizado para a análise estatística. Os efeitos das citocinas foram avaliados pelo teste t de *Student* bicaudal emparelhado. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 Validação do modelo

Para realizar a confirmação da fluorescência no tecido alvo e, portanto, realizar a validação inicial do modelo, camundongos AgRP-Cre/tdTomato e POMC-Cre/GFP foram perfundidos com solução à base de formalina, de acordo com o protocolo detalhado em publicações de nosso grupo (FURIGO; DE SOUZA; TEIXEIRA; GUADAGNINI *et al.*, 2019; QUARESMA; TEIXEIRA; FURIGO; WASINSKI *et al.*, 2019; TEIXEIRA; COUTO; FURIGO; LIST *et al.*, 2019). Posteriormente os encéfalos foram cortados e os cortes encefálicos montados em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram observados em microscópio fluorescente. Pudemos confirmar a expressão da proteína tdTomato na porção ventromedial do núcleo arqueado do hipotálamo no modelo AgRP-Cre/tdTomato (Figura 3A). Quando analisamos os cortes dos camundongos POMC-Cre/GFP confirmamos a expressão da proteína GFP na porção lateral do núcleo arqueado (Figura 3B), o que está de acordo com a localização anatômica dos neurônios POMC (HUO; GRILL; BJORBAEK, 2006). Uma vez que esses modelos representam de maneira fidedigna a distribuição de neurônios NPY/AgRP e POMC no núcleo arqueado (RAMOS-LOBO; DONATO JR, 2017), esses modelos foram utilizados a fim de registrar os efeitos de citocinas sobre os mesmos.

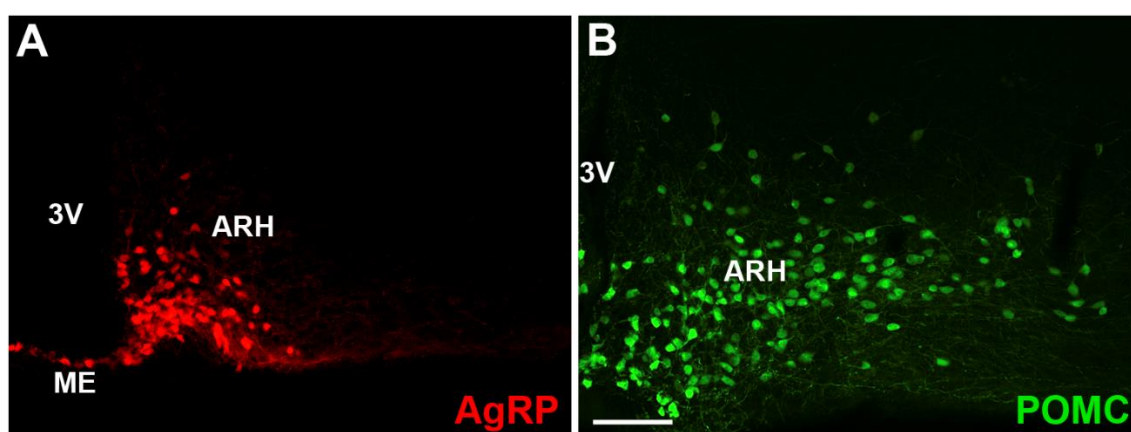


Figura 3. Fotomicrografias de cortes coronais do encéfalo de camundongos AgRP-Cre/tdTomato (A) e POMC-Cre/GFP (B). Abreviações: 3V, terceiro ventrículo, ARH, núcleo arqueado do hipotálamo, ME, eminência mediana. Barra de escala 100 μ m.

4.2 Caracterização das propriedades biofísicas de repouso dos neurônios AgRP

Ao registrar as células neuronais AgRP ou POMC foram encontrados dois perfis celulares, células denominadas ativas (apresentavam disparo de potencial de ação) e células denominadas quiescentes (não apresentavam disparo de potencial de ação) (Figura 4A e 4B).

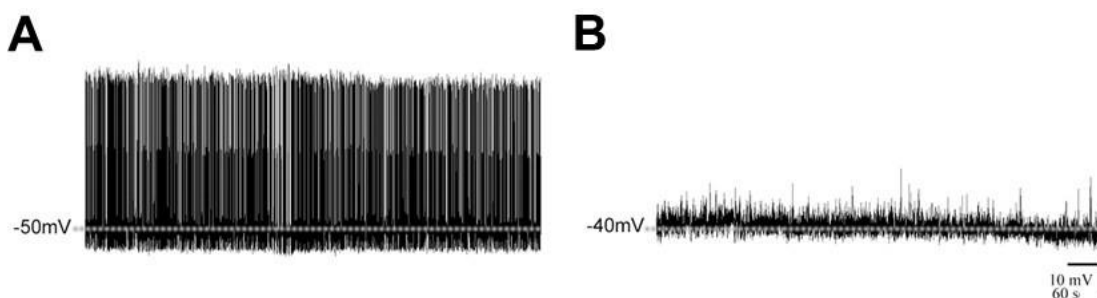


Figura 4. Perfis celulares encontrados. Representação de uma célula ativa (A) e representação de uma célula quiescente (B).

Para o registro de neurônios AgRP, provenientes dos animais AgRP-Cre/tdTomato, foram obtidos em geral 4 cortes por encéfalo a uma espessura de 250 μm cada. No total, foram registradas 50 células provenientes de 24 camundongos.

O RMP médio dos neurônios AgRP ativos foi de $-52,64 \pm 0,7$ mV (intervalo de -45 mV a -63 mV) e o IR médio em repouso foi de $1,8 \pm 0,1$ G Ω (intervalo de 0,9 G Ω a 2,9 G Ω) e dos neurônios quiescentes foi de $-52,5 \pm 2,5$ mV (intervalo de -40 mV a -70 mV) e o IR médio em repouso foi de $1,0 \pm 0,1$ G Ω (intervalo de 0,4 G Ω a 1,8 G Ω). Foram analisadas 37 células ativas, representando 75% dos neurônios registrados, e 13 células quiescentes (25% das células).

4.3 Avaliação dos efeitos do TNF- α sobre neurônios AgRP

Para determinar os efeitos agudos da TNF- α , 23 neurônios AgRP foram registrados em 15 camundongos. Em relação às células ativas, o TNF- α induziu hiperpolarização significativa em 6 células, representando 35,3% dos neurônios AgRP

registrados (Figura 5A). Nesse sentido, o TNF- α alterou o RMP das células responsivas em $-9,8 \pm 0,6$ mV ($P < 0,0001$; Figura 5A). Além disso, o IR foi significativamente reduzido após a administração de TNF- α ($-0,34 \pm 0,11$ G Ω ; $P = 0,0391$; Figura 5A). Vale ressaltar que o efeito do TNF- α não foi reversível durante o período de lavagem registrado (Figura 5A). Em contraste, 11 neurônios AgRP (64,7% das células) não exibiram alterações significativas após a aplicação de TNF- α no banho (Figura 5B). Todas as células quiescentes ($n = 4$) também não apresentaram alterações significativas em relação ao RMP e ao IR após a administração de TNF- α (Figura 5C). Portanto, o TNF- α produz efeito inibitório agudo em um subgrupo de neurônios AgRP ativos.

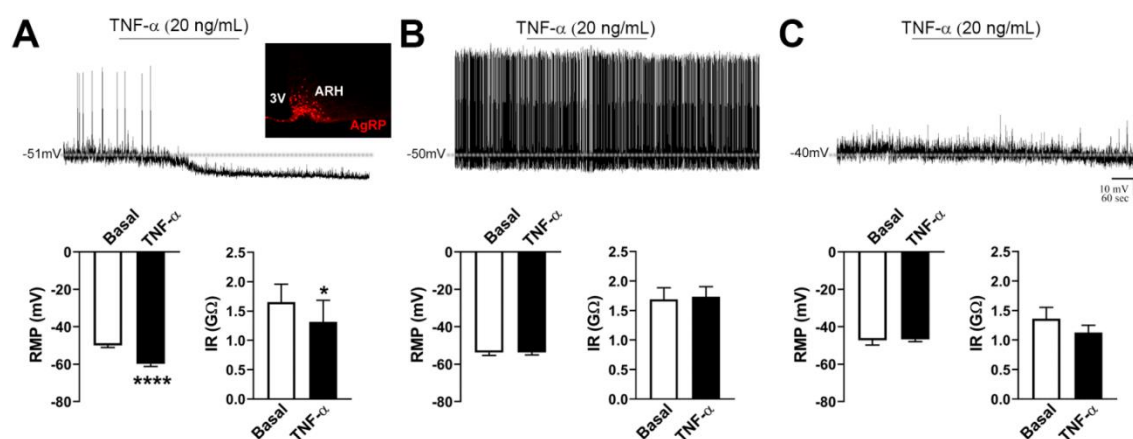


Figura 5. Efeitos do TNF- α sobre neurônios AgRP. (A) Efeitos agudos do TNF- α sobre o RMP e o IR dos neurônios AgRP responsivos ($n = 6$). A inserção mostra neurônios produtores de AgRP na parte ventromedial do núcleo arqueado (ARH). 3V = terceiro ventrículo (B) Efeitos agudos do TNF- α sobre o RMP e o IR dos neurônios AgRP ativos e não responsivos. (C) Efeitos agudos do TNF- α sobre o RMP e o IR dos neurônios AgRP quiescentes. Em todas as condições, foram mostradas traçados representativos de registros eletrofisiológicos no modo *whole-cell*. As linhas tracejadas indicam o RMP da baseline. O TNF- α foi aplicado ao banho por aproximadamente 5 minutos. * $P = 0,0391$; **** $P < 0,0001$.

4.4 Avaliação dos efeitos da IL-6 sobre neurônios AgRP

Para determinar os efeitos agudos da IL-6, 10 neurônios AgRP foram registrados em 4 camundongos. Das células registradas, metade estava ativa e a outra metade quiescente. Em contraste aos efeitos gerados pela administração de TNF- α , descobrimos

que a IL-6 não alterou significativamente o RMP ($0,0 \pm 0,6$ mV) e o IR ($-0,1 \pm 0,1$ mV) dos neurônios AgRP ativos (Figura 6A) e quiescentes (Figura 6B).

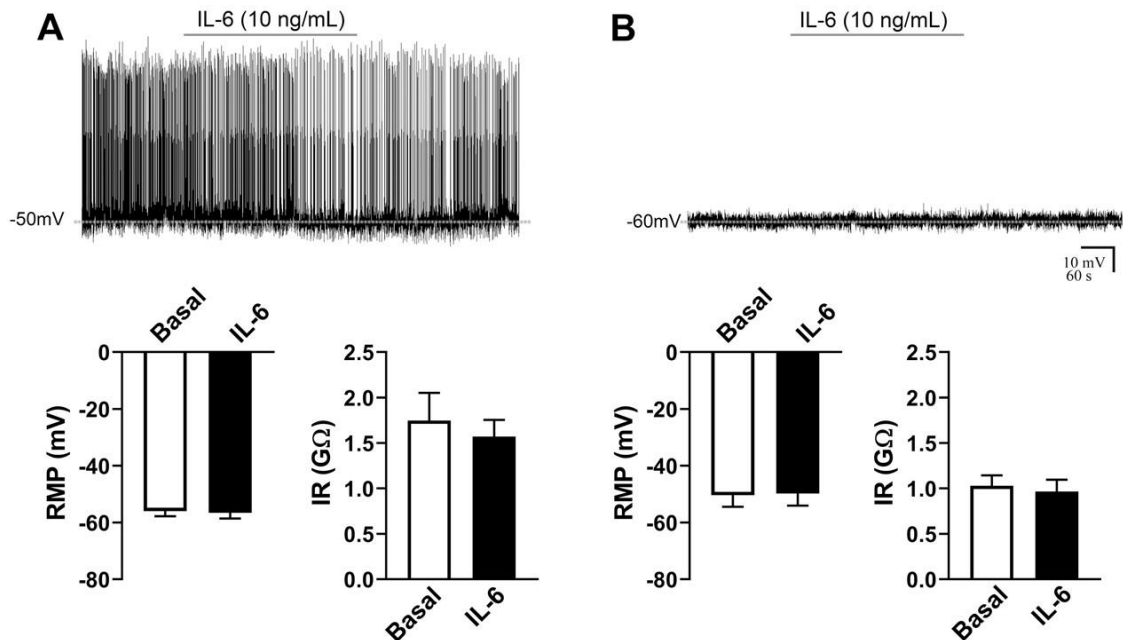


Figura 6. Efeitos da citocina IL-6 sobre neurônios AgRP. (A) Efeitos agudos da citocina IL-6 sobre o RMP e o IR dos neurônios AgRP ativos e não responsivos ($n = 5$ células). (B) Efeitos agudos da citocina IL-6 sobre o RMP e o IR dos neurônios AgRP quiescentes ($n = 5$ células). As linhas tracejadas indicam o RMP da baseline. A citocina IL-6 foi aplicada ao banho por aproximadamente 5 minutos.

4.5 Avaliação dos efeitos da IL-1 β sobre neurônios AgRP

Para determinar os efeitos agudos da IL-1 β , 19 neurônios AgRP foram registrados em 7 camundongos. Das células registradas, 15 delas estavam ativas, enquanto 4 células estavam quiescentes. IL-1 β induziu uma hiperpolarização estatisticamente significativa em 8 células, o que representa 42% dos neurônios AgRP registrados. Nos neurônios responsivos, IL-1 β induziu uma mudança de $-6,2 \pm 1,1$ mV no RMP ($P = 0,0007$; Figura 7A). O IR também foi significativamente reduzido após o tratamento com IL-1 β ($-0,24 \pm 0,09$ G Ω ; $P = 0,0442$; Figura 7A). Assim como o TNF- α , o efeito induzido pela IL-1 β não foi reversível durante o período registrado (Figura 7A). Em relação às células não responsivas, 11 neurônios AgRP (58% das células) não

exibiram alterações significativas no RMP e IR após a administração de IL-1 β (Figura 7B). Uma vez que um estudo anterior descobriu que IL-6 e IL-1 β agem sinergicamente no cérebro para induzir comportamento doente (HARDEN; DU PLESSIS; POOLE; LABURN, 2008), também estudamos em neurônios AgRP os efeitos da coadministração de IL-6 nas respostas induzidas por IL-1 β . Após a infusão isolada de IL-1 β , IL-6 foi coadministrada em 7 neurônios AgRP (registrados em 4 camundongos). Semelhante aos resultados anteriores, IL-1 β induziu uma hiperpolarização do RMP em aproximadamente 42% dos neurônios AgRP (3 de 7 células, alteração no RMP: $-6,6 \pm 2,3$ mV; Figura 7C). É importante notar que a coadministração de IL-6 não aumentou nem inibiu a resposta a IL-1 β ($P = 0,99$, IL-1 β versus IL-6 + IL-1 β ; Figura 7C). Em conjunto, a IL-1 β causa um efeito inibitório agudo na atividade dos neurônios que expressam AgRP no ARH.

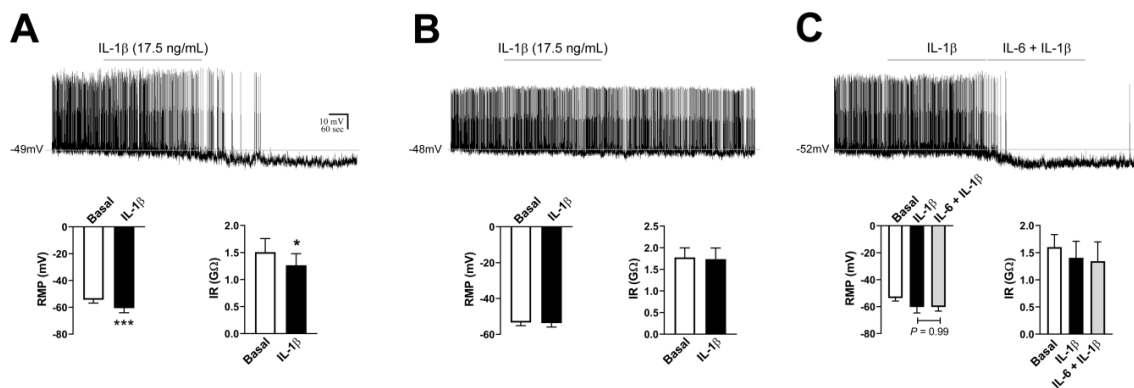


Figura 7. Efeitos da citocina IL-1 β sobre neurônios AgRP. (A) Efeitos agudos da citocina IL-1 β sobre o RMP e o IR dos neurônios AgRP ativos responsivos ($n = 8$ células). (B) Efeitos agudos da citocina IL-1 β sobre o RMP e o IR dos neurônios AgRP ativos e não responsivos ($n = 11$). (C) Efeitos combinados de IL-6 e IL-1 β no RMP e IR de neurônios AgRP responsivos ($n = 3$). Neste último caso, fatias de cérebro foram inicialmente tratadas com IL-1 β , seguido pela aplicação de IL-6 e IL-1 β . Em todas as condições, gravações representativas de *whole-cell patch-clamp* são mostradas. As linhas tracejadas indicam RMP de linha de base. IL-1 β ou IL-6 + IL-1 β foram aplicados ao banho por aproximadamente 5 min. * $P < 0,05$; *** $P = 0,0007$.

4.6 Caracterização das propriedades biofísicas de repouso dos neurônios POMC

Para o registro de neurônios POMC, provenientes dos animais POMC-Cre/GFP, foram obtidos em geral 3 cortes por cada encéfalo na espessura de 250 μm . No total,

foram registradas 35 células provenientes de 22 camundongos. Dos neurônios POMC registrados, 31 células estavam ativas (60,5%), enquanto 4 células analisadas estavam quiescentes.

O RMP médio dos neurônios POMC ativos foi de $-52,0 \pm 0,8$ mV (intervalo de -42 mV a -61 mV) e o IR médio em repouso foi de $1,7 \pm 0,1$ G Ω (intervalo de 0,5 G Ω a 3,3 G Ω) e dos neurônios quiescentes foi de $-53,5 \pm 4,2$ mV (intervalo de -42 mV a -62 mV) e o IR médio em repouso foi de $1,0 \pm 0,2$ G Ω (intervalo de 0,7 G Ω a 0,8 G Ω).

4.7 Avaliação dos efeitos do TNF- α sobre neurônios POMC

Para determinar os efeitos agudos da TNF- α , 21 neurônios POMC foram registrados em 13 camundongos. Das células registradas 17 estavam ativas (83%), enquanto 4 células estavam quiescentes (17%). Em relação às células ativas, 15 neurônios POMC não mostraram alterações significativas no RMP ($-0,3 \pm 0,4$ mV) ou IR ($+0,0 \pm 0,1$ G Ω) após a administração de TNF- α (Figura 8A). No entanto, 2 neurônios POMC do mesmo animal, mas em diferentes fatias do cérebro, mostraram uma despolarização significativa após a aplicação de TNF- α e este efeito foi reversível durante o período de lavagem (Figura 8B). Porém devido ao pequeno número de neurônios POMC que responderam ao TNF- α , nenhuma análise estatística foi realizada. O TNF- α não produziu alterações significativas no RMP e no IR dos neurônios POMC quiescentes (Figura 8C).

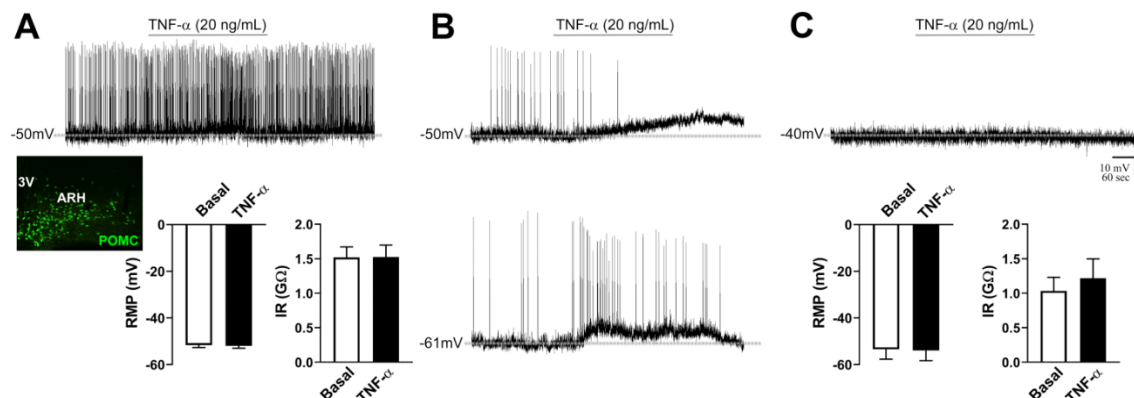


Figura 8. Efeitos do TNF- α sobre neurônios POMC. (A) Efeitos agudos do TNF- α sobre o RMP e o IR dos neurônios AgRP ativos e não responsivos (n = 15). Na inserção mostra neurônios que

expressam POMC na parte lateral do núcleo arqueado (ARH). 3V = terceiro ventrículo (B) Registros eletrofisiológicos no modo *whole-cell* representativos de dois neurônios POMC do mesmo animal que despolarizaram após a aplicação de TNF- α . Este efeito foi reversível durante o período de lavagem. (C) Efeitos agudos do TNF- α sobre o RMP e o IR dos neurônios POMC quiescentes (n = 4). As linhas tracejadas indicam o RMP da *baseline*. O TNF- α foi aplicado ao banho por aproximadamente 5 minutos.

4.8 Avaliação dos efeitos da IL-6 sobre neurônios POMC

Para determinar os efeitos agudos da IL-6, 15 neurônios POMC foram registrados em 9 camundongos. Todas as células registradas estavam ativas. Os resultados demonstraram que não houve efeito sobre o RMP ($-0,1 \pm 0,5$ mV) ou no IR ($-0,1 \pm 0,1$ mV), indicando que a IL-6 também não apresentou efeito agudo sobre a atividade elétrica dos neurônios POMC (Figura 9).

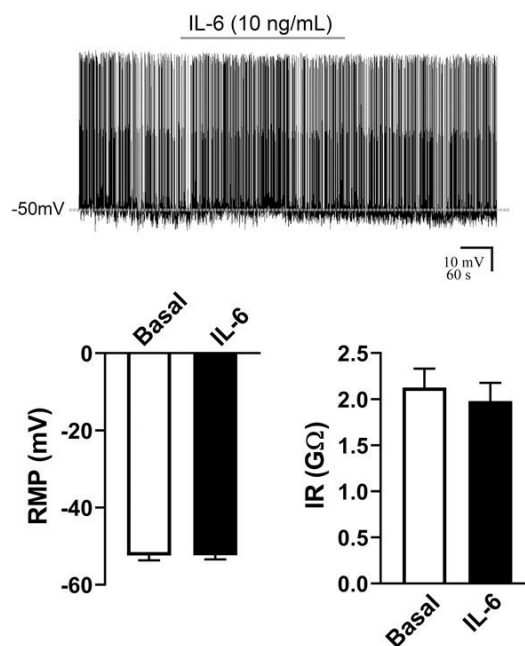


Figura 9. Efeitos da citocina IL-6 sobre neurônios POMC. A IL-6 não causa alterações agudas no RMP e no IR dos neurônios POMC (n = 15). Todos os neurônios POMC registrados estavam ativos. A linha tracejada indica o RMP da *baseline*. A IL-6 foi aplicada no banho por aproximadamente 5 minutos.

5 DISCUSSÃO

Sinais inflamatórios no sistema nervoso central podem produzir efeitos opostos na ingestão de alimentos e conseqüentemente no peso corporal. O consumo excessivo de nutrientes desencadeia fatores inflamatórios no hipotálamo que contribuem para a obesidade. Por outro lado, em uma infecção sistêmica e/ou aguda, esses fatores contribuem para anorexia e perda de peso (THALER; CHOI; SCHWARTZ; WISSE, 2010). Para melhor entender como as citocinas pró-inflamatórias afetam os circuitos neurais envolvidos na regulação central do metabolismo, determinamos se a excitabilidade de membrana dos neurônios AgRP/NPY e POMC do ARH é agudamente afetada por TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Os neurônios AgRP e POMC foram visualizados por camundongos repórteres dependentes de Cre. Esses modelos foram utilizados com sucesso em experimentos histológicos e eletrofisiológicos anteriores (FURIGO; TEIXEIRA; DE SOUZA; COUTO *et al.*, 2019; QUARESMA; TEIXEIRA; FURIGO; WASINSKI *et al.*, 2019; TEIXEIRA; COUTO; FURIGO; LIST *et al.*, 2019).

Estudos anteriores do nosso grupo utilizaram registros eletrofisiológicos no modo *whole-cell* para determinar possíveis alterações na excitabilidade de membrana induzida por diferentes hormônios/citocinas, incluindo prolactina (BUONFIGLIO; RAMOS-LOBO; SILVEIRA; FURIGO *et al.*, 2015; SILVEIRA; FURIGO; ZAMPIERI; BOHLEN *et al.*, 2017) e GH (FURIGO; TEIXEIRA; DE SOUZA; COUTO *et al.*, 2019; SILVEIRA; ZAMPIERI; FURIGO; ABDULKADER *et al.*, 2019). Este método permite determinar com precisão se a ação hormonal dominante é estimulatória ou inibitória. No entanto, uma limitação do nosso projeto experimental é que avaliamos apenas os efeitos celulares agudos. Além disso, as doses utilizadas são relativamente altas, embora tenham sido empregadas em estudos anteriores *in vitro* (KATAFUCHI; MOTOMURA; BABA; OTA *et al.*, 1997; TRUJILLO; SULLIVAN; HARTEN; SCHNEIDER *et al.*, 2004). Nesse sentido, nossos experimentos provavelmente reproduzem o que acontece durante uma inflamação sistêmica aguda e forte, como sepse (THALER; CHOI; SCHWARTZ; WISSE, 2010), em vez da inflamação crônica de baixo grau observada na obesidade (JOHNSON; OLEFSKY, 2013; THALER, JOSHUA P.; YI, CHUN-XIA; SCHUR, ELLEN A.; GUYENET, STEPHAN J. *et al.*, 2012; VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015).

Uma doença que promove inflamação sistêmica aguda apresenta como sintomas anorexia, perda de peso e caquexia, entre outros. No SNC a anorexia induzida por inflamação é provocada por citocinas (THALER; CHOI; SCHWARTZ; WISSE, 2010). Assim, nossos resultados demonstram que as citocinas TNF- α e IL1- β ao inibirem aproximadamente 35 a 42% dos neurônios AgRP registrados indicam um efeito agudo que está relacionado com a anorexia induzida pela inflamação. Lembrando que os neurônios AgRP são indutores da fome, logo sua inibição promoverá diminuição da ingestão alimentar podendo levar à perda de peso (ANDERMANN; LOWELL, 2017; APONTE; ATASOY; STERNSON, 2011; KRASHES; KODA; YE; ROGAN *et al.*, 2011). Dessa forma, nossos resultados apontam a importância dos neurônios AgRP do ARH como importantes alvos de citocinas na produção da resposta anoréxica aos sinais inflamatórios agudos. Além disso, podemos especular que a citocina TNF- α pode aumentar a saciedade através da ativação de neurônios POMC do ARH, isto porque nossos resultados demonstram que dois neurônios POMC foram despolarizados após a aplicação do TNF- α . Apesar desse efeito ter sido restrito a um animal e não estar claro se é um efeito real ou provocado por alguma razão desconhecida, esses resultados estão de acordo com dados *in vivo*, que demonstraram a infusão central de TNF- α inibe a ingestão de alimentos em roedores (BODNAR; PASTERNAK; MANN; PAUL *et al.*, 1989; PLATA-SALAMAN; OOMURA; KAI, 1988; PLATA-SALAMAN; VASSELLI; SONTI, 1997). É importante ressaltar que todas as células responsivas ao TNF- α estavam ativas (disparavam potencial de ação) antes da aplicação da droga e que nenhum neurônio inativo, tanto para AgRP como para POMC, responderam a essa citocina. Esse padrão de resposta pode ter significado biológico, ou seja, o TNF- α pode atuar predominantemente bloqueando a resposta alimentar induzida por neurônios produtores de AgRP ativos, que supostamente estão induzindo a sensação de fome naquele momento. Em adição, outro estudo também mostrou que o lipopolissacarídeo (LPS) evita o aumento da ingestão de alimentos induzido pela ativação neuronal de AgRP (LIU; HUANG; LIU; WU *et al.*, 2016).

Nossos resultados também demonstraram que TNF- α e IL1- β reduziram o IR em neurônios AgRP responsivos às citocinas. O IR é um parâmetro afetado pelo número de canais iônicos abertos na membrana celular. A abertura dos canais iônicos diminui a resistência da membrana. Dessa forma, nossos resultados sugerem que o TNF- α e a IL1- β inibem os neurônios produtores de AgRP, aumentando o número de canais iônicos abertos. Os canais de K⁺ ou Cl⁻ são candidatos potenciais para mediar o efeito

hiperpolarizante do TNF- α e IL1- β nos neurônios AgRP. Uma vez que nossa solução extracelular continha 131,8 mM de Cl⁻ e a solução de pipeta continha 15 mM de Cl⁻, o potencial de equilíbrio para Cl⁻ é esperado ser ≈ -57 mV, que está perto do RMP médio de neurônios AgRP responsivos ($-52,5 \pm 1,6$ mV). Por outro lado, o potencial de equilíbrio para K⁺ é ≈ -101 mV. Assim, o TNF- α e a IL1- β provavelmente alteraram a condutância do potássio, em vez dos canais de cloreto, para promover o efeito de hiperpolarização observado nos neurônios AgRP.

O papel da citocina IL-6 no metabolismo é complexo. O seu receptor é expresso por neurônios do ARH de camundongos, incluindo as células AgRP e POMC e essa citocina é frequentemente liberada em situações inflamatórias (SCHELE; BENRICK; GRAHNEMO; EGECIOGLU *et al.*, 2013). A infusão periférica ou central aguda de IL-6 não afeta a ingestão de alimentos, apesar do fato de camundongos *nocautes* para IL-6 desenvolvam obesidade tardia devido à redução do gasto energético (WALLENIOUS; WALLENIOUS; AHREN; RUDLING *et al.*, 2002). Nossos resultados demonstram que a ausência de alterações na atividade dos neurônios AgRP e POMC após a aplicação de citocina IL-6 está de acordo com a falta de efeitos dessa citocina no comportamento alimentar. Porém, a redução na atividade biológica de IL-6 liberada periféricamente atenua o comportamento em resposta a doença em ratos (HARDEN; DU PLESSIS; ROTH; LORAM *et al.*, 2011). Além disso, a co-infusão ICV de IL-6 e IL-1 β , em doses que não afetam a ingestão de alimentos quando administradas individualmente, causa anorexia (HARDEN; DU PLESSIS; POOLE; LABURN, 2008). Portanto, a IL-6 está envolvida na resposta à doença, embora sua capacidade de afetar os circuitos neuronais que controlam a ingestão de alimentos talvez dependa do efeito combinado de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β . No entanto, nossos resultados indicam que a co-infusão de IL-6 não afetou a resposta geral induzida por IL-1 β na atividade dos neurônios AgRP.

6 CONCLUSÃO

Demonstramos que o TNF- α e a IL-1 β reduzem agudamente a atividade elétrica das células que expressam AgRP/NPY no ARH. Esse efeito ajuda a explicar a anorexia causada por condições inflamatórias agudas e aponta os neurônios AgRP como principais alvos dos sinais inflamatórios para afetar o metabolismo, embora possa existir um efeito menor nos neurônios POMC. Nossos achados eletrofisiológicos estão de acordo com experimentos *in vivo* que demonstram que a IL-6 sozinha não é suficiente para afetar a ingestão de alimentos. Em conjunto, nossos resultados fornecem novas informações que ajudam a compreender os efeitos das citocinas pró-inflamatórias em populações neuronais responsáveis pela regulação da ingestão alimentar e homeostase energética.

CAPÍTULO 2: EFEITO DA DELEÇÃO DO RECEPTOR DE IGF1 E/OU RECEPTOR DE GH EM NEURÔNIOS QUE EXPRESSAM SOMATOSTATINA SOBRE O CRESCIMENTO CORPORAL, EIXO SOMATOTRÓFICO E METABOLISMO DE CAMUNDONGOS

REVISÃO DA LITERATURA

O GH, também conhecido como somatotropina ou hormônio somatotrófico, é o fator mais expresso por células somatotróficas, sendo que essas constituem quase a metade da parte anterior da hipófise (MØLLER; JØRGENSEN, 2009; RIVIER; SPIESS; THORNER; VALE, 1982). A síntese e liberação do GH são promovidas pelo hormônio liberador de GH (GHRH) e inibidas pela somatostatina (SST) e são reguladas por mecanismos de retroalimentação negativa (GIUSTINA; MAZZIOTTI; CANALIS, 2008).

Inicialmente o GH foi descrito por estar associado ao crescimento e desenvolvimento de diversas estruturas que compõem o corpo humano, principalmente na fase pré-púbere, onde sua concentração sanguínea e sua ação sobre a placa epifisária estão aumentadas (VELDHUIS; BOWERS, 2003; WATERS; SHANG; BEHNCKEN; TAM *et al.*, 1999). O GH tem conhecidas ações sobre os tecidos periféricos e está relacionado a múltiplas funções biológicas envolvidas com crescimento somático, metabolismo e processos celulares, como a divisão e regeneração celular (LICHANSKA; WATERS, 2008). Suas ações clássicas, como o crescimento muscular e de tecido ósseo, são desencadeadas quando o hormônio interage com o seu receptor cognato transmembrânico GHR (WATERS; SHANG; BEHNCKEN; TAM *et al.*, 1999). Dessa forma, o GH pode ativar o GHR em vários órgãos (NYBERG, 2000).

A estrutura do GHR é do tipo I dos receptores de citocinas (MOUTOUSSAMY; KELLY; FINIDORI, 1998). Tanto em humanos quanto em roedores, o GHR é expresso em várias regiões do SNC, como mostra o mapeamento detalhado que o nosso grupo de pesquisa realizou, o qual indica a presença numerosa de células responsivas ao GH no ARH, núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), núcleo dorsomedial (DMH), área

hipotalâmica lateral (LHA), núcleo pré-mamilar ventral (PMv) e NTS (FURIGO; METZGER; TEIXEIRA; SOARES *et al.*, 2017).

Quando o GH se liga ao seu receptor promove suas ações recrutando e ativando a proteína Janus Cinase (JAK2) que induz a fosforilação em resíduos tirosina do GHR. A fosforilação desses resíduos inicia a via de sinalização intracelular do GH. A transdução do sinal é classicamente determinada pela ligação e fosforilação dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição 5 (STAT5) no complexo JAK2-GHR. Esse fator de transcrição é essencial para regular a transcrição de genes proliferativos e de diferenciação, que promovem o crescimento celular, bem como importante regulador da transcrição do gene que codifica o IGF-1 (HERRINGTON; SMIT; SCHWARTZ; CARTER-SU, 2000; MOUTOUSSAMY; KELLY; FINIDORI, 1998).

É importante ressaltar que vários efeitos promovidos pelo GH são mediados pelo IGF-1 (DEHKHODA; LEE; MEDINA; BROOKS, 2018). O qual pode ser secretado pelo fígado para o sangue desencadeando as ações indiretas do GH, entre elas o crescimento e a manutenção do sistema nervoso central e periférico (ABERG; BRYWE; ISGAARD, 2006; DEHKHODA; LEE; MEDINA; BROOKS, 2018; WASINSKI; FRAZÃO; DONATO JR, 2019). No crescimento corporal, por exemplo, o IGF-1 tem um importante papel regulatório, do mesmo modo que nas funções metabólicas e funções cerebrais como a neurogênese (ALEXIA; FALLOT; LASFER; SCHWEIZER-GROYER *et al.*, 2004). O receptor de IGF-1 (IGF-1R) é altamente expresso nas células que constituem a barreira hematoencefálica e, além de manter a integridade dessa barreira, fornecem a via pela qual o IGF-1 sérico acessa o cérebro (VELLOSO, 2008). Além disso, o IGF-1R é amplamente expresso no próprio SNC, porém em quantidades menores do que pelo fígado. Ainda assim, possuem importante papel no desenvolvimento do SNC (H. D. VENTERS, 2001; J. A. D'ERCOLE, 2002).

O IGF-1 circulante encontra-se parcialmente acoplado às proteínas ligantes presentes no plasma (IGFBPs), que controlam a meia-vida do hormônio livre plasmático. Ao se ligar ao seu receptor na placa epifisária, por exemplo, ele possui um papel crucial na proliferação e diferenciação de condrócitos, induzindo a mitogênese e crescimento longitudinal dos ossos. O GH também promove aumento da síntese de IGF-1 na placa epifisária, onde o IGF-1 pode atuar de maneira parácrina ou autócrina (DEHKHODA; LEE; MEDINA; BROOKS, 2018). A ação do IGF-1 na musculatura promove a hipertrofia das células, aumentando a síntese proteica pela ativação da via PI3K/AKT/mTOR (TORRES-ALEMAN, 2010).

A estimulação do GH sobre a expressão do IGF-1 é dependente de sua pulsatilidade, sendo que a meia-vida do GH é de apenas alguns minutos (NIEVES-RIVERA; KERRIGAN; KRIEG; EGAN *et al.*, 1993). O eixo GH/IGF-1 é um importante regulador do crescimento e metabolismo (TUERSUNJIANG; ODHIAMBO; SHASA; SMITH *et al.*, 2017; WASINSKI; FRAZÃO; DONATO JR, 2019). Um estudo demonstrou que uma única dose de um antagonista do GHRH diminui a concentração basal e os pulsos de GH. Ainda, a infusão do mesmo antagonista por um período prolongado reduz a concentração sérica de IGF-1, mostrando que o IGF-1 depende da secreção de GH e seu padrão pulsátil (ISGAARD; CARLSSON; ISAKSSON; JANSSON, 1988). Ademais, outros estudos mostraram que a manutenção de altas concentrações de GH durante um determinado período diminui significativamente a produção de IGF-1 hepático, tal como acontece na privação alimentar crônica. Isso se deve a uma possível resistência ao GH e depressão de seus receptores localizados na membrana dos hepatócitos, sendo os mesmos regulados negativamente pelo próprio GH (DOMENÉ; KRISHNAMURTHI; ESHET; GILAD *et al.*, 1993; MAITER; UNDERWOOD; MAES; DAVENPORT *et al.*, 1988). Dessa forma, a secreção de GH tem um padrão pulsátil, o que é crítico para sua função fisiológica, essa secreção é regulada por interações complexas, mediadas por influências neurais e periféricas (STEYN; TOLLE; CHEN; EPELBAUM, 2016).

A regulação do GH é feita por diversos fatores, entre eles, o sono, jejum prolongado, estresse e alguns neuro-hormônios hipotalâmicos (HARTMAN; VELDHUIS; JOHNSON; LEE *et al.*, 1992; RIVIER; SPIESS; THORNER; VALE, 1982; SPIESS; RIVIER; VALE, 1983; TANNENBAUM; BOWERS, 2001). Esses fatores são os principais estimuladores do eixo somatotrófico e podem influenciar a amplitude e frequência dos picos de secreção de GH (HARTMAN; VELDHUIS; JOHNSON; LEE *et al.*, 1992; RIVIER; SPIESS; THORNER; VALE, 1982; SPIESS; RIVIER; VALE, 1983; TANNENBAUM; BOWERS, 2001).

A expressão e a liberação de GH hipofisário têm como principais reguladores os neurônios que expressam SST e o GHRH. Os corpos celulares dos neurônios que produzem esses neuro-hormônios estão localizados principalmente nos núcleos PVN e ARH (BURTON; KABIGTING; CLIFTON; STEINER, 1992; FODOR; CSABA; KORDON; EPELBAUM, 1994; KASTRUP; LE GREVÈS; NYBERG; BLOMQVIST, 2005). Como dito anteriormente, o GHRH estimula a produção e liberação do GH pela ligação ao seu receptor (GHRHR) (MACGREGOR; LENG, 2005). Esse neuro-

hormônio é secretado de forma pulsátil estimulando a liberação pulsátil do GH (PLOTSKY; VALE, 1985). Um dos mais importantes reguladores endógenos da expressão do GHRH é a SST hipotalâmica (PLOTSKY; VALE, 1985). Estudos mostraram a presença de subtipos de receptores de SST, como o tipo 1 e o 2, em neurônios que expressam GHRH no hipotálamo (BOUYER; LOUDES; ROBINSON; EPELBAUM *et al.*, 2006). A atividade de neurônios SST e GHRH em núcleos hipotalâmicos é regulada, em parte, por mecanismos de retroalimentação negativa do GH. Assim, existem evidências que o GH age diretamente no cérebro para governar sua própria secreção. Nesse sentido, regiões do cérebro que contém neurônios que expressam a SST e o GHRH expressam o GHR (IKENO; HUBBARD; LEE; CORTEZ *et al.*, 2009). Essa alça de retroalimentação é crítica para a regulação do crescimento corporal (IKEDA; CHANG; MATSUMOTO; FURUHATA *et al.*, 1998).

Já a retroalimentação negativa feita pelo GH e IGF-1 no próprio eixo somatotrófico é complexa e os mecanismos pelo qual é regulado ainda não foram completamente esclarecidos, principalmente no que se refere à ação direta sobre os neurônios hipotalâmicos que controlam a síntese e secreção de GH, bem como sobre as ações diretas de células somatotróficas (BERELOWITZ; SZABO; FROHMAN; FIRESTONE *et al.*, 1981). Estudos em humanos e roedores mostraram ações clássicas de retroalimentação negativa do GH e IGF-1 sobre o eixo somatotrófico, onde sujeitos tratados com GH apresentaram diminuição da concentração de GH sanguíneo após 24h do tratamento (ROSENTHAL; HULSE; KAPLAN; GRUMBACH, 1986). Mas, não se sabe ao certo o mecanismo pelo qual a administração de GH inibe a secreção de GH endógeno. Existe uma vertente postulando a existência de uma ação direta do GH sobre a inibição do eixo somatotrófico, seja estimulando a produção de SST ou pela inibição do GHRH hipotalâmico (MINAMI; KAMEGAI; HASEGAWA; SUGIHARA *et al.*, 1993). Burton e colaboradores (1992) identificaram expressão do mRNA do GHR em neurônios STT, demonstrando assim uma real possibilidade da ação do GH no controle do eixo somatotrófico (BURTON; KABIGTING; CLIFTON; STEINER, 1992). Ainda outro estudo mostrou que a inibição da expressão do mRNA do GHR nos núcleos PVN afeta de maneira efetiva os neurônios SST que em resposta a essa diminuição não são mais capazes de serem estimulados pelo GH (PELLEGRINI; BLUET-PAJOT; MOUNIER; BENNETT *et al.*, 1996). Outros estudos propuseram que essa ação de retroalimentação negativa do GH se deve a uma estimulação primária de IGF-1 e que esse hormônio teria uma ação primordial sobre regiões hipotalâmicas que controlam a

secreção de GH. Isso porque já foi mostrado a existência de receptores de IGF-1 nos neurônios que expressam SST (WERNER; WOLOSCHAK; ADAMO; SHEN-ORR *et al.*, 1989) e que a infusão de IGF-1 recombinantes de humanos (rhIGF-1) inibe a secreção de GH por estimular a secreção de SST (BERMANN; JAFFE; TSAI; DEMOTT-FRIBERG *et al.*, 1994). Toda essa teoria foi embasada em trabalhos que administravam GH de forma ICV ou na circulação de ratos e verificavam supressão da amplitude de secreção endógena do GH (MINAMI; KAMEGAI; HASEGAWA; SUGIHARA *et al.*, 1993). É importante notar que os reguladores da liberação de GH podem não interagir com todos os componentes primários do eixo hipotalâmico do GH e, portanto, podem ter impacto apenas sobre a SST, GHRH ou na hipófise (STEYN; TOLLE; CHEN; EPELBAUM, 2016).

Para entender melhor a complexa interação entre os fatores que regulam a liberação de GH, devemos primeiro definir a importância dos vários mecanismos de retroalimentação que contribuem para sua secreção em geral. Embora progressos significativos tenham sido feitos na definição dos processos que governam a secreção do GH, as vias pelas quais ele promove tais ações que controlam o eixo somatotrófico não estão totalmente esclarecidas, portanto necessitam ser mais bem exploradas.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo geral

Investigar a importância dos mecanismos de retroalimentação negativa do GH sobre os neurônios SST para o controle do eixo somatotrópico.

7.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar em camundongos os efeitos induzidos pela ablação seletiva do receptor de IGF-1, exclusivamente em neurônios que expressam SST, sobre possíveis alterações no crescimento, metabolismo e secreção de GH.
- ✓ Avaliar em camundongos os efeitos induzidos pela ablação seletiva dos receptores de GH e de IGF-1, exclusivamente em neurônios que expressam SST, sobre possíveis alterações no crescimento, metabolismo e secreção de GH.

7.3 Justificativa

O GH é o protagonista das ações somatotróficas, entre outras coisas porque é capaz de estimular a expressão do IGF-1 em diversos tecidos, além de possuir efeitos diretos nos tecidos periféricos. Sabe-se que, classicamente, o GH e o IGF-1 controlam a atividade do eixo somatotrófico via alças de retroalimentação negativa sobre neurônios hipotalâmicos e hipofisários. No nível do hipotálamo, o eixo somatotrófico é constituído principalmente por neurônios que expressam o GHRH e a SST. O GHRH e a SST regulam de forma positiva e negativa, respectivamente, a síntese e liberação de GH hipofisário. As vias pelas quais o GH promove tais ações não são totalmente esclarecidas e torna-se imprescindível investigar em mais detalhes como esse controle é

realizado. Pretendemos com nossos resultados ajudar na compreensão dos distúrbios que envolvem alterações no crescimento, e ainda esclarecer qual é a real participação do GH e IGF-1 via neurônios que expressam SST no controle do eixo somatotrófico.

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Animais

Para a geração de animais com deleção do IGF-1R exclusivamente em células que expressam SST utilizamos a tecnologia Cre/LoxP. Os camundongos que expressam a enzima Cre recombinase sob promotores da SST (The Jackson Laboratory) foram cruzados com camundongos portadores de alelos IGF-1R (The Jackson Laboratory) flanqueados por um par de sítios LoxP. Portanto, foram gerados camundongos com inativação do IGF-1R especificamente em células que expressam SST. Além disso, produzimos animais duplo-nocautess condicionais, na qual inativamos o GHR e o IGF-1R apenas nos neurônios SST. Cabe destacar que estudos anteriores em nosso laboratório já haviam estudado animais com ablação apenas do GHR nas células SST (WILLIAN DOS SANTOS *et al.*, resultados não publicados). Todos os experimentos foram conduzidos com machos e fêmeas. As amostragens usadas em cada experimento foram descritas nas legendas das figuras.

Para identificar as mutações gênicas, quando os animais completaram 28 dias de vida foram separados de suas progenitoras (desmamados) e um pequeno pedaço (0,5 cm) da cauda foi coletado para a análise genética, sendo que marcações em suas orelhas identificavam os animais dentro de sua caixa. Desse pedaço da cauda foi extraído o DNA, com o qual foram feitos ciclos de PCR utilizando primers específicos para identificar as mutações SST-cre, GHR-Flox/Flox e IGF-1R-Flox/Flox. O produto do PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose onde o peso molecular das bandas geradas confirmou se o animal expressava ou não a mutação. Os animais foram mantidos no biotério em condições ambientais padrão, com ciclo claro/escuro de 12h/12h, a temperatura de 22-25°C, com acesso a água e ração de roedor padrão.

8.2 Avaliação do crescimento somático

Avaliamos o peso corporal, uma vez por semana, desde o desmame até aproximadamente 5 meses de vida. A composição corporal (massa magra e massa de gordura) foi determinada por meio de ressonância magnética nuclear, através da utilização do equipamento Minispec (Bruker).

8.3 Avaliação do Balanço energético

Para determinar a ingestão alimentar, os animais e suas rações foram mensurados durante 4 dias consecutivos, sempre no mesmo horário. Avaliamos a atividade locomotora, a ingestão de água, o consumo de oxigênio (VO_2), volume de gás carbônico produzido (VCO_2) e o coeficiente respiratório (QR), que é a relação entre o VCO_2/VO_2 . Para isso, utilizamos o sistema de calorimetria indireta (Oxymax/Clams, Columbus Instruments). Nesse equipamento, os animais ficaram em adaptação por 2 dias, seguido de mensuração por 3 dias consecutivos.

8.4 Teste de tolerância a glicose (GTT)

Para esse teste, avaliamos a tolerância do animal frente uma dose intraperitoneal (i.p.) de 2g de glicose por kg corporal. Anteriormente ao teste, os animais tiveram suas rações removidas e a maravalha de suas caixas trocadas, de maneira a garantir período de 4 horas de jejum. A glicemia dos animais foi mensurada por meio de um glicosímetro portátil no ponto 0 (antes da administração i.p. de glicose) e nos pontos 20, 40, 60, 90 e 120 minutos (após a administração de glicose) por meio da retirada de uma gota de sangue do epitélio caudal do animal. Após o teste, suas respectivas rações foram retornadas e os animais tiveram dois dias de descanso antes da realização do próximo teste glicêmico.

8.5 Teste de sensibilidade à insulina (ITT)

O teste foi realizado com as mesmas condições experimentais do GTT citado acima, entretanto, nesse caso foi administrada injeção i.p. de insulina na dose de 1UI/kg corporal do animal.

8.6 Teste da resposta contra regulatória à hipoglicemia após injeção de 2-deoxiglicose (2DG)

O teste foi realizado com as mesmas condições experimentais do GTT citado acima, entretanto, nesse caso foi administrada injeção i.p. de 2DG (Sigma) na dose de 0,5 mg/kg do animal e os tempos foram de 0 (antes da administração i.p. de 2-deoxiglicose) e nos pontos 20, 40, 60, 90, 120 e 180 minutos (após a administração de 2DG).

8.7 Eutanásia

Após avaliação do crescimento corporal, balanço energético e homeostase glicêmica, os animais com aproximadamente 6 meses de vida foram anestesiados com isoflurano, seguido da medida do comprimento naso-anal.

Os seguintes órgãos foram pesados para determinar possíveis alterações no crescimento tecidual: cérebro, fígado, musculo gastrocnêmio, coração, rim, tecido adiposo perigonadal e gônadas (nos machos).

8.8 Avaliação do eixo somatotrófico

Para analisar o controle hipotalâmico da secreção do GH, um novo grupo de animais foi produzido e quando completaram 8 semanas de vida os animais foram eutanasiados e foram coletadas amostras de soro. Avaliamos a concentração sérica IGF-1 (Quantikine ELISA Mouse/Rat IGF-1 kit, R&D Systems).

8.9 Análise dos resultados

O software GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA) foi utilizado para a análise estatística. Utilizamos o teste de t-Student para analisar animais controles *versus* animais nocautes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

9 RESULTADOS

9.1 Deleção do IGF-1R nas células SST

9.1.1 Composição corporal e consumo alimentar

O peso dos camundongos machos e fêmeas foram acompanhados por 20 semanas e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle (IGF1R) e aqueles que carregam deleção do IGF1R nas células que expressam SST (camundongos IGF1R/SST) (Figuras 10A e 11A). As análises da composição corporal também mostraram não haver diferenças na massa gorda (Figuras 10B e 11B) ou na massa magra (Figuras 10C e 11C) entre os grupos, tanto nos machos (Figura 10), quanto nas fêmeas (Figura 11). Em adição, o consumo de ração foi avaliado no período de uma semana, e não observamos diferenças no consumo alimentar entre os grupos IGF1R versus IGF1R/SST nos machos e nas fêmeas (Figuras 10D e 11D).

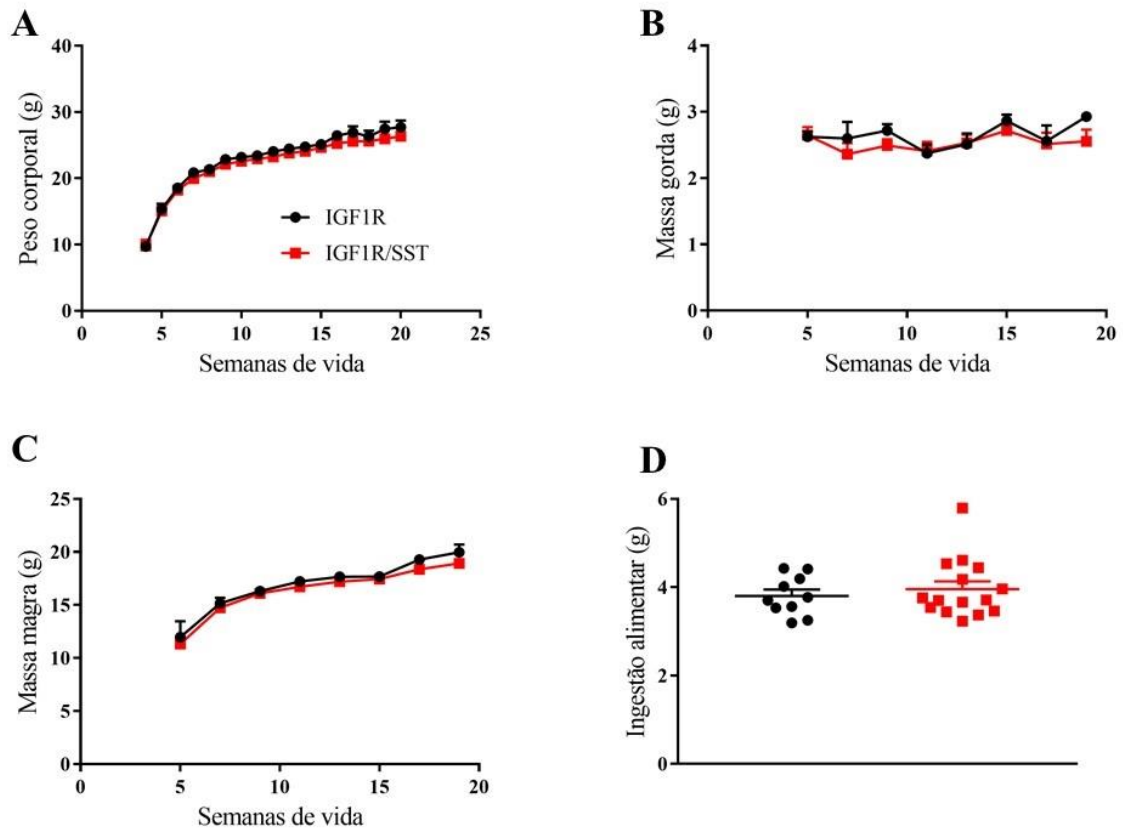


Figura 10: Avaliação de peso e composição corporal de animais machos. (A) Peso corporal em gramas (n=6 para controles e n=11 para nocautes). (B) Massa gorda em gramas (n=6 para controles e n=11 para nocautes). (C) Massa magra em gramas (n=6 para controles e n=11 para nocautes). (D) Ingestão alimentar em 5 dias em gramas (n=10 para controles e n=15 para nocautes), Machos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

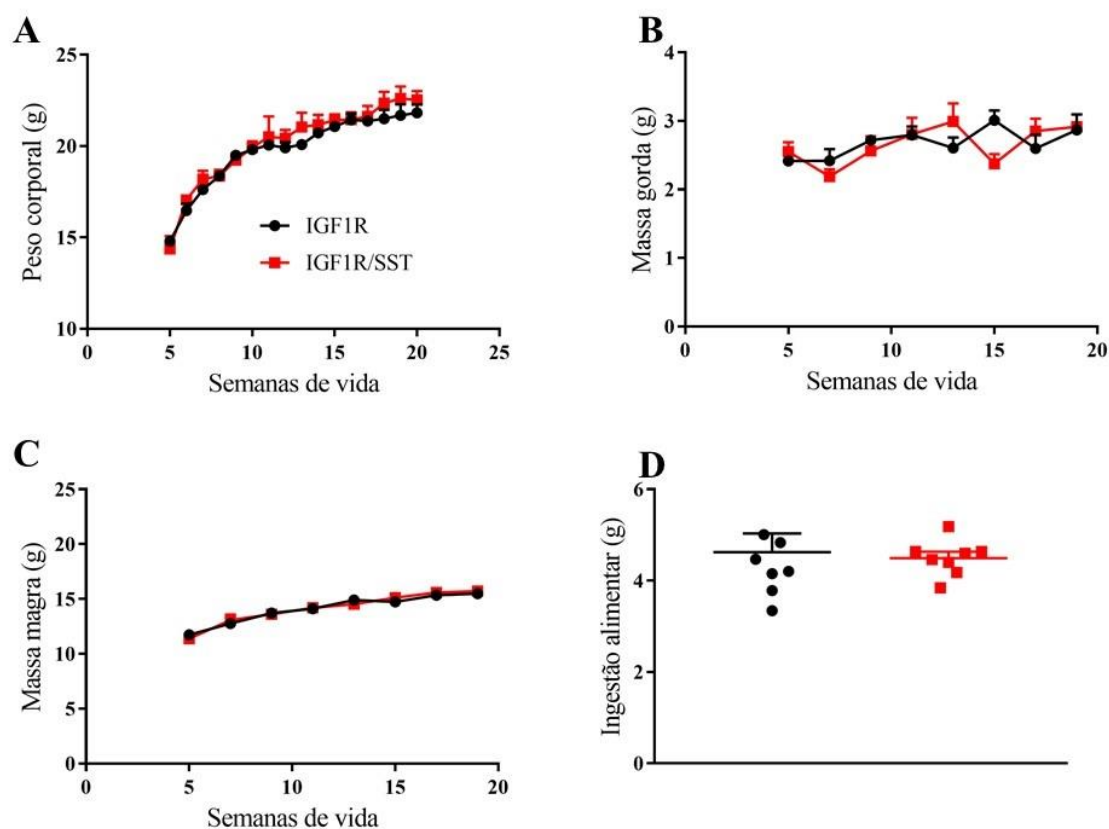


Figura 11: Avaliação de peso e composição corporal de animais fêmeas. (A) Peso corporal em gramas (n=10 para controles e n=9 para nocautes). (B) Massa gorda em gramas (n=10 para controles e n=9 para nocautes). (C) Massa magra em gramas (n=10 para controles e n=9 para nocautes). (D) Ingestão alimentar em 5 dias em gramas (n=8 para controles e n=8 para nocautes), Fêmeas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

9.1.2 Homeostase glicêmica

Os animais foram então submetidos às análises da homeostase glicêmica. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no teste de tolerância a glicose, no teste da resposta contra regulatória a hipoglicemia induzida pela injeção de 2DG e no teste de sensibilidade à insulina, tanto nos machos (Figuras 12 A-C) quanto nas fêmeas (Figuras 13 A-C).

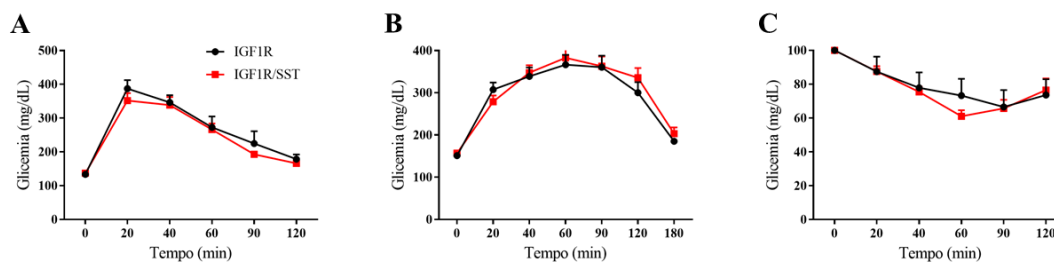


Figura 12: Análise de homeostase glicêmica de animais Machos. (A) Teste de tolerância à glicose (GTT) (n=9 para controles e n=13 para nocautes). (B) Teste da resposta contra regulatória a hipoglicemia à 2-deoxiglicose (2DG) (n=10 para controles e n=15 para nocautes). (C) Teste de sensibilidade a insulina (ITT) em porcentagem (n=9 para controles e n=11 para nocautes), Machos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

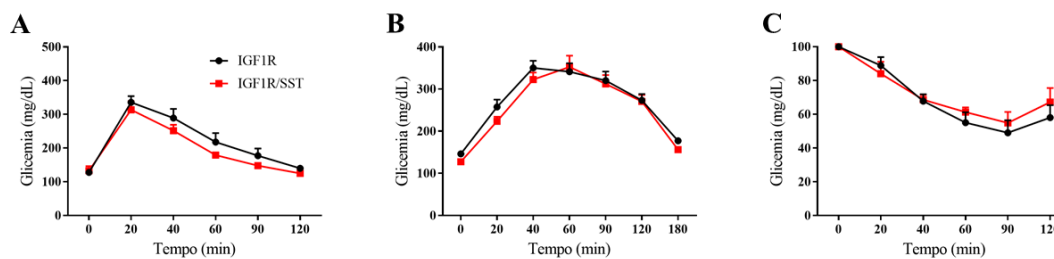


Figura 13: Análise de homeostase glicêmica de animais Fêmeas. (A) Teste de tolerância à glicose (GTT) (n=8 para controles e n=6 para nocautes). (B) Teste da resposta contra regulatória a hipoglicemia à 2-deoxiglicose (2DG) (n=8 para controles e n=8 para nocautes). (C) Teste de sensibilidade a insulina (ITT) em porcentagem (n=8 para controles e n=7 para nocautes), Fêmeas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

9.1.3 Balanço Energético

Os animais foram também submetidos a análises do balanço energético pelo sistema de calorimetria indireta (Oxymax/Clams, Columbus Instruments). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de machos nos parâmetros consumo de oxigênio (VO_2), coeficiente respiratório (RER), ingestão hídrica e atividade ambulatoria (Figuras 14 A-D). Nas fêmeas, encontramos diferença significativa apenas no coeficiente respiratório (RER) no momento escuro e no período de 24h, mas não no momento claro (Figura 15 A-D).

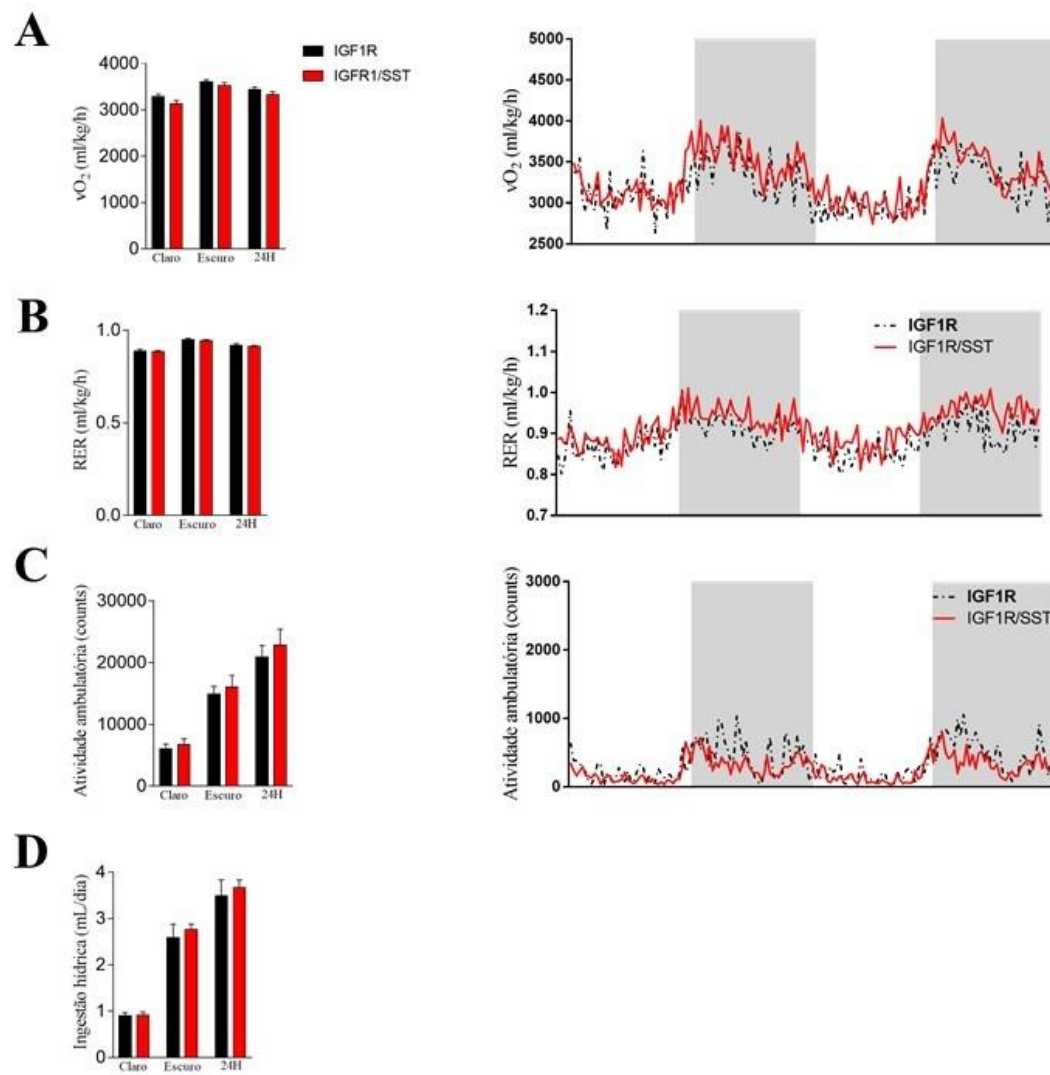


Figura 14: Análise do balanço energético de animais Machos. (A) Consumo de oxigênio (VO_2). (B) Coeficiente respiratório (RER). (C) Ingestão hídrica. (D) Atividade ambulatoria, (n=7 para controles e n=14 para nocautes), Machos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

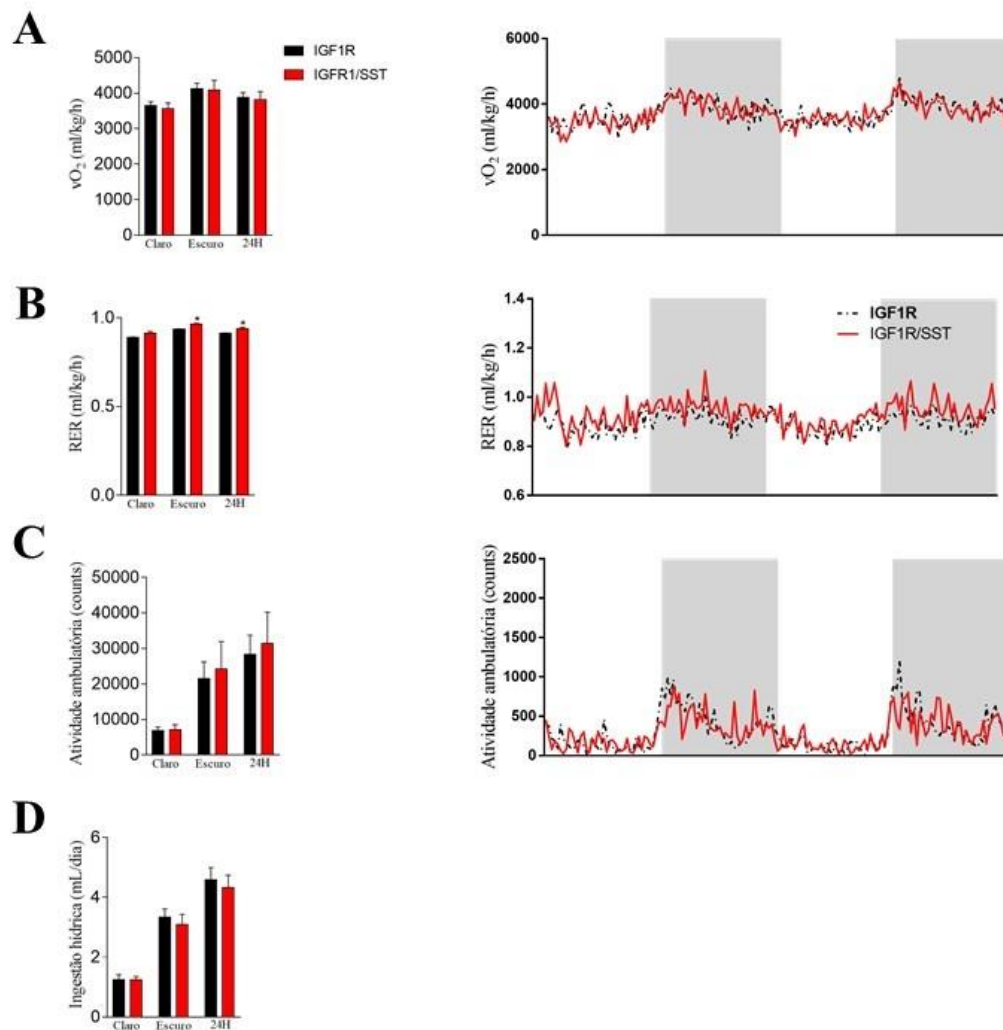


Figura 15: Análise do balanço energético de animais Fêmeas. (A) Consumo de oxigênio (VO₂). (B) Coeficiente respiratório (RER). (C) Ingestão hídrica. (D) Atividade ambulatoria, (n=7 para controles e n=5 para nocautes), Fêmeas. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. * P<0,01 no período de 24h e * P<0,002 no período escuro.

9.1.4 Comprimento naso-anal e peso dos órgãos

Com relação crescimento corporal e tecidual, não foram observadas diferenças significativas entre os animais controle e IGF1R/SST no comprimento naso-anal e no peso do encéfalo, fígado, músculo gastrocnêmio, coração, rim, gônada (somente nos machos) e tecido adiposo perigonadal, nos machos e nas fêmeas (Figuras 16 e 17 B-H).

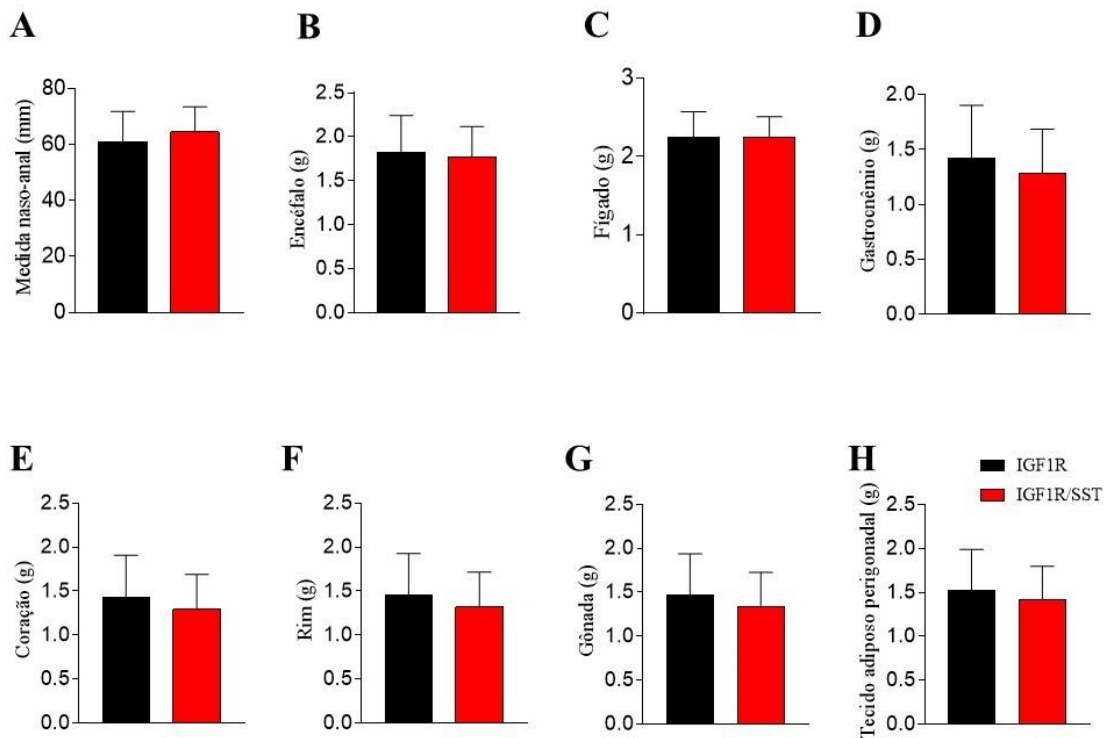


Figura 16: Comprimento naso-anal e peso dos órgãos Machos (A) Medida naso-anal. (B) Peso do encéfalo. (C) Peso do fígado. (D) Peso do gastrocnêmio. (E) Peso do coração. (F) Peso do rim. (G) Peso da gônada. (H) Peso do tecido adiposo perigonadal. N=15 para controles e n=20 para nocautes. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

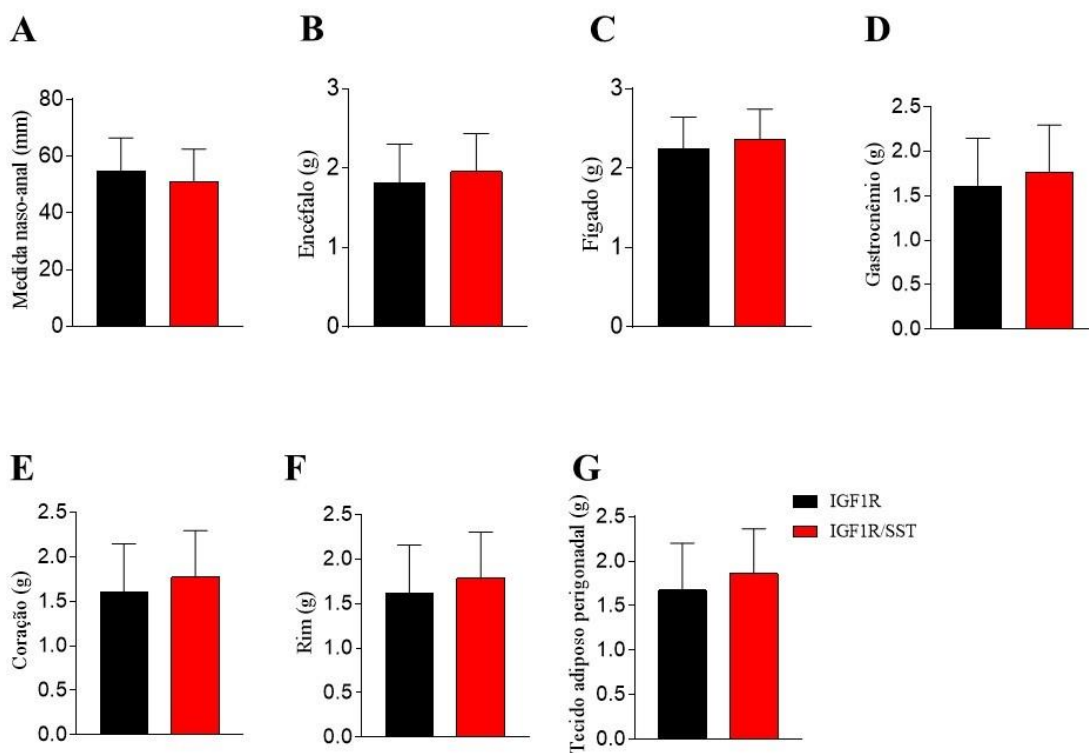


Figura 17: Comprimento naso-anal e peso dos órgãos Fêmeas (A) Medida naso-anal. (B) Peso do encéfalo. (C) Peso do fígado. (D) Peso do gastrocnêmio. (E) Peso do coração. (F) Peso do rim.

(G) Peso do tecido adiposo perigonadal. N=13 para controles e n=14 para nocautes. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

9.1.5 Avaliação do eixo somatotrófico

Avaliamos a concentração sérica IGF-1 para analisar o controle hipotalâmico da secreção do GH. Não observamos diferenças significativas entre os animais controle e IGF1R/SST tanto nos machos (Figuras 18 A) quanto nas fêmeas (Figuras 19 A).

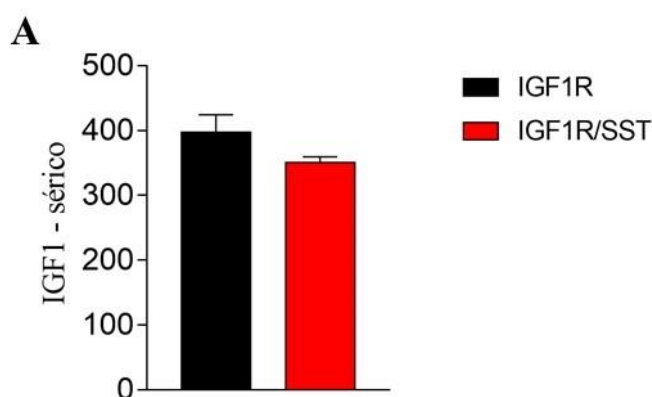


Figura 18: Secreção sérica de IGF-1 de animais Machos (A) Secreção de IGF-1. N=3 para controles e n=4 para nocautes. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

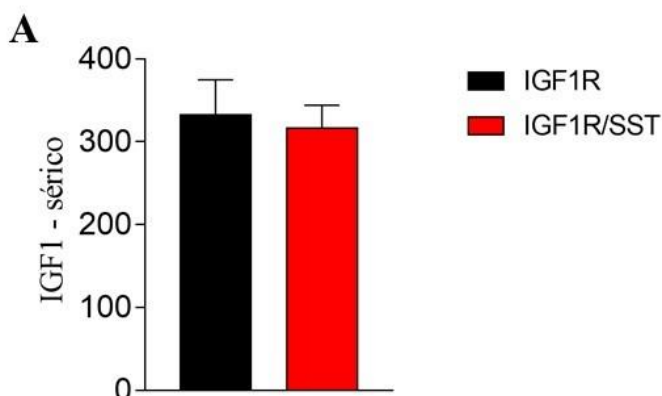


Figura 19: Secreção sérica de IGF-1 de animais Fêmeas (A) Secreção de IGF-1. N=7 para controles e n=6 para nocautes. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

9.2 Dupla deleção do GHR e IGF-1R nas células SST

9.2.1 Composição corporal e consumo alimentar

O peso dos camundongos machos e fêmeas foram acompanhados por 26 semanas e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle (GHR/IGF1R) e aqueles que carregam deleção do GHR e IGF1R nas células que expressam SST (camundongos GHR/IGF1R/SST) (Figuras 20A e 21A). As análises da composição corporal também mostraram não haver diferenças na massa gorda (Figuras 20B e 21B) ou na massa magra (Figuras 20C e 21C) entre os grupos, tanto nos machos (Figura 20), quanto nas fêmeas (Figura 21). Em adição, o consumo de ração foi avaliado no período de uma semana, e não observamos diferenças no consumo alimentar entre os grupos GHR/IGF1R versus GHR/IGF1R/SST nos machos e nas fêmeas (Figuras 20D e 21D).

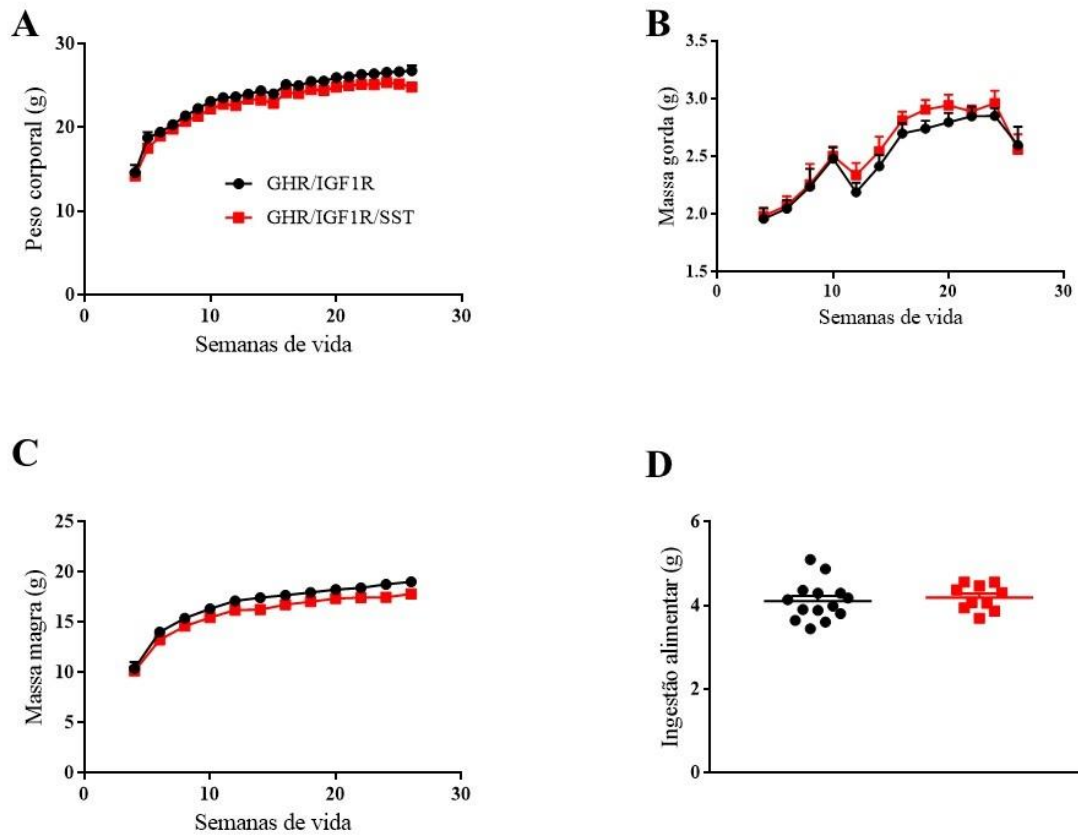


Figura 20: Avaliação de peso e composição corporal de animais machos. (A) Peso corporal em gramas. (B) Massa gorda em gramas. (C) Massa magra em gramas. (D) Ingestão alimentar em 4 dias em gramas. N=14 para controles e n=10 para nocautes, Machos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

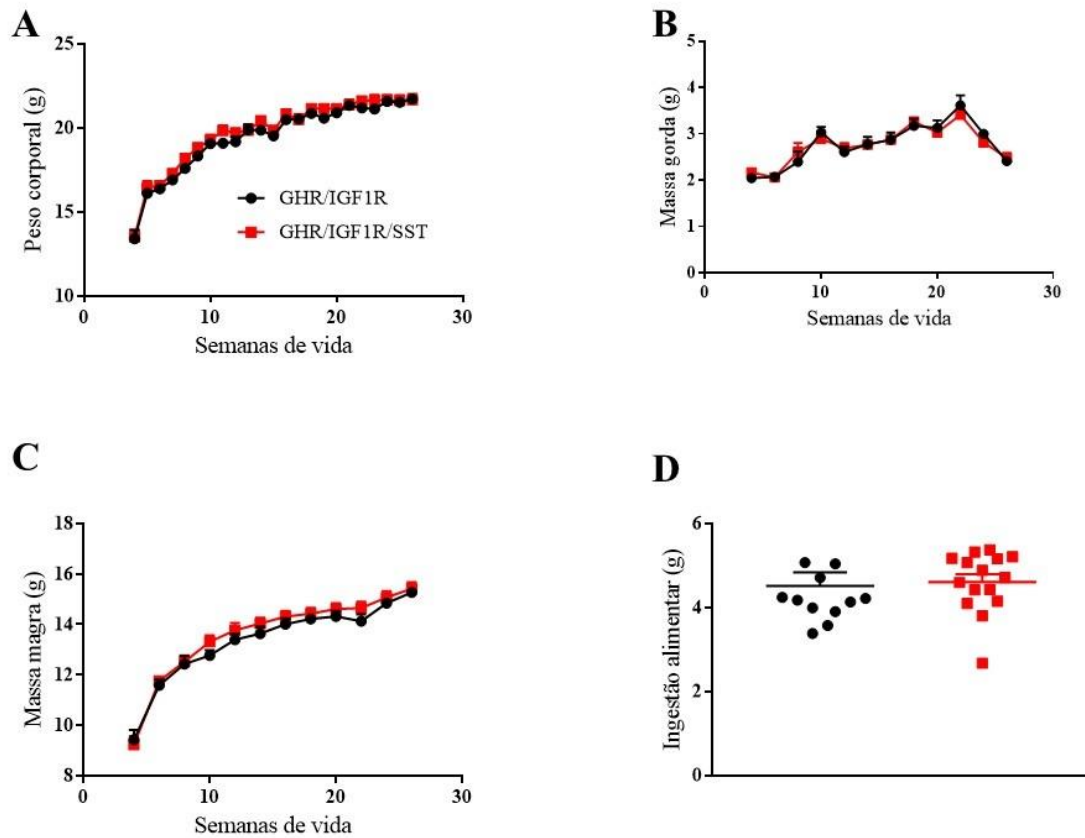


Figura 21: Avaliação de peso e composição corporal de animais fêmeas. (A) Peso corporal em gramas. (B) Massa gorda em gramas. (C) Massa magra em gramas. (D) Ingestão alimentar em 5 dias em gramas. N=12 para controles e n=15 para nocautes, Fêmeas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

9.2.2 Homeostase glicêmica

Os animais com dupla deleção do GHR e IGF-1R nas células SST foram submetidos às análises da homeostase glicêmica. Contudo, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no teste de tolerância a glicose e no teste de sensibilidade a insulina, tanto nos machos (Figuras 22 A-B) quanto nas fêmeas (Figuras 23 A-B).

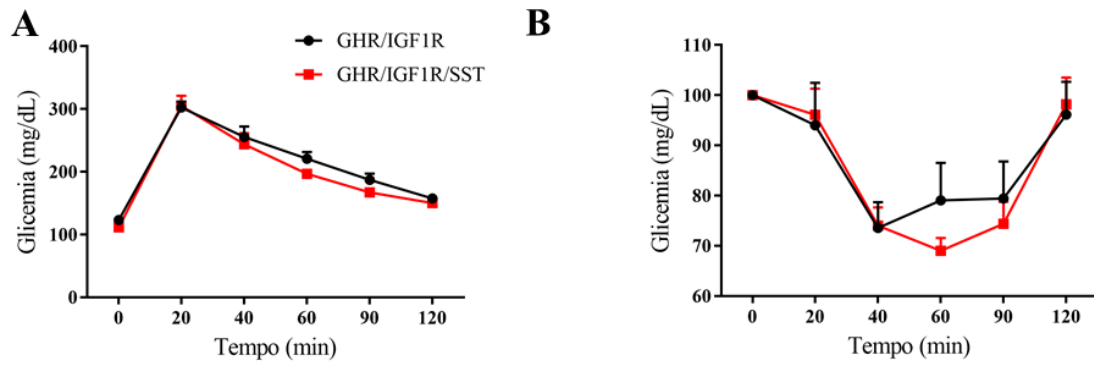


Figura 22: Análise de homeostase glicêmica de animais Machos. (A) Teste de tolerância à glicose (GTT) (n=14 para controles e n=10 para nocautes). (B) Teste de sensibilidade a insulina (ITT) em porcentagem (n=14 para controles e n=10 para nocautes), Machos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

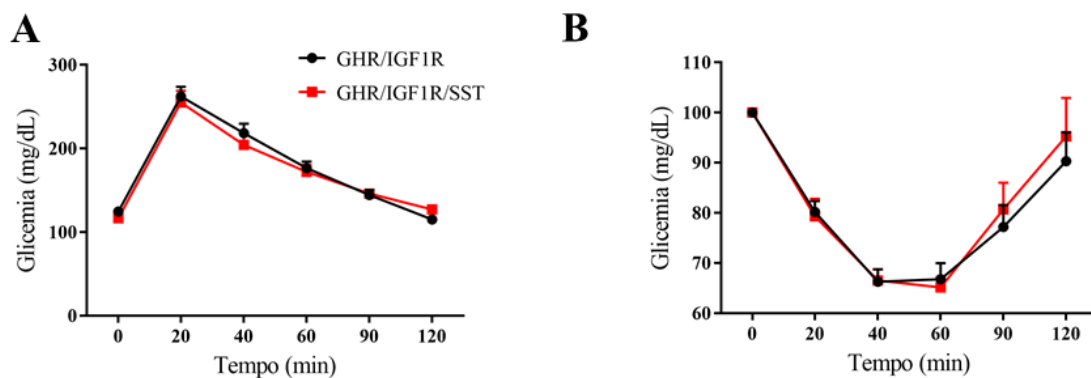


Figura 23: Análise de homeostase glicêmica de animais Fêmeas. (A) Teste de tolerância à glicose (GTT) (n=12 para controles e n=15 para nocautes). (B) Teste de sensibilidade a insulina (ITT) em porcentagem (n=12 para controles e n=15 para nocautes), Fêmeas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

9.2.3 Balanço Energético

Os animais com dupla deleção do GHR e IGF-1R também foram submetidos a análises do balanço energético pelo sistema de calorimetria indireta (Oxymax/Clams, Columbus Instruments). Não foram observadas diferenças significativas tanto entre os grupos de machos, quanto os grupos de fêmeas nos parâmetros consumo de oxigênio

(VO_2), coeficiente respiratório (RER), ingestão hídrica e atividade ambulatória (Figuras 24 A-D e 25 A-D).

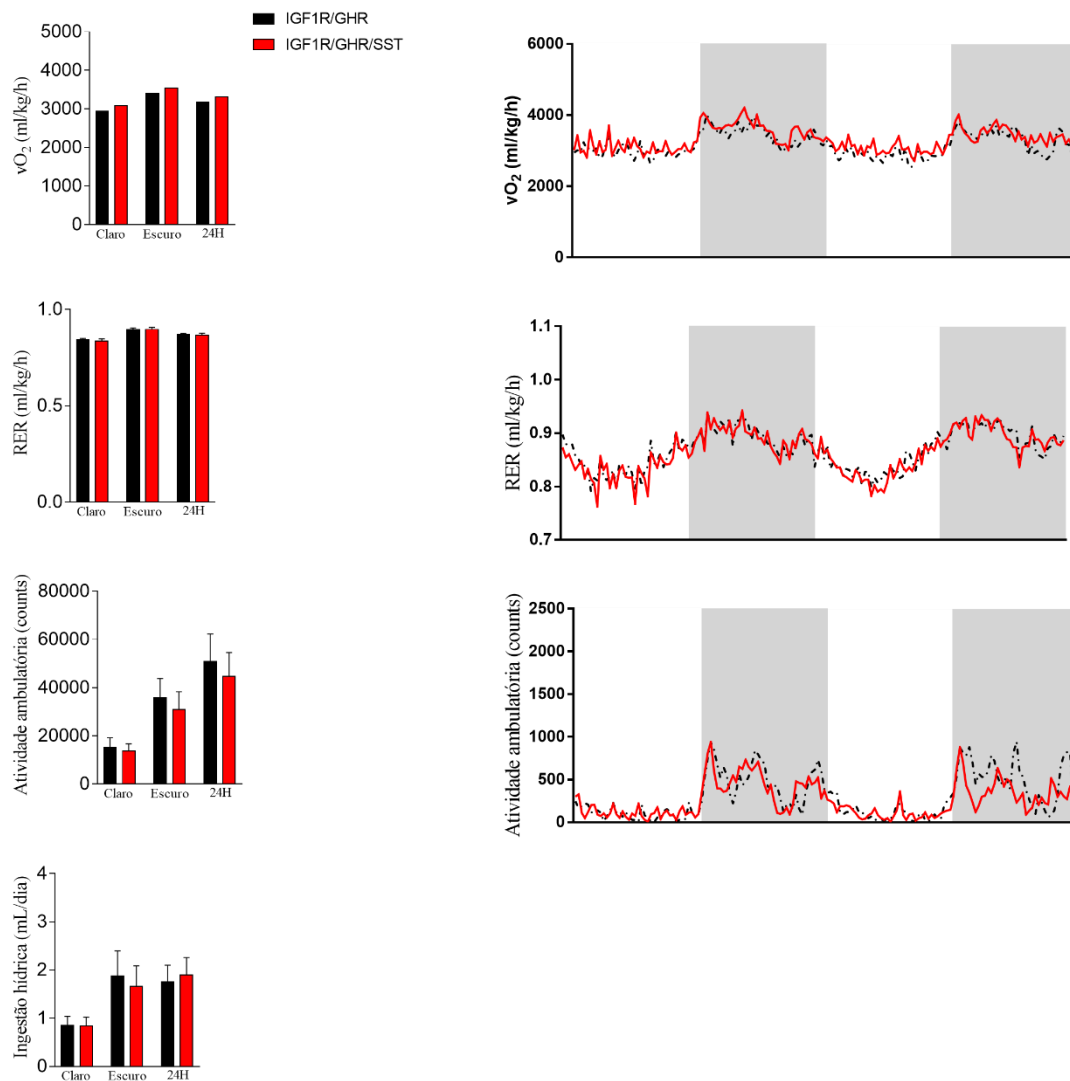


Figura 24: Análise do balanço energético de animais Machos. (A) Consumo de oxigênio (VO_2). (B) Coeficiente respiratório (RER). (C) Ingestão hídrica. (D) Atividade ambulatória, (n=10 para controles e n=10 para nocautes), Machos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

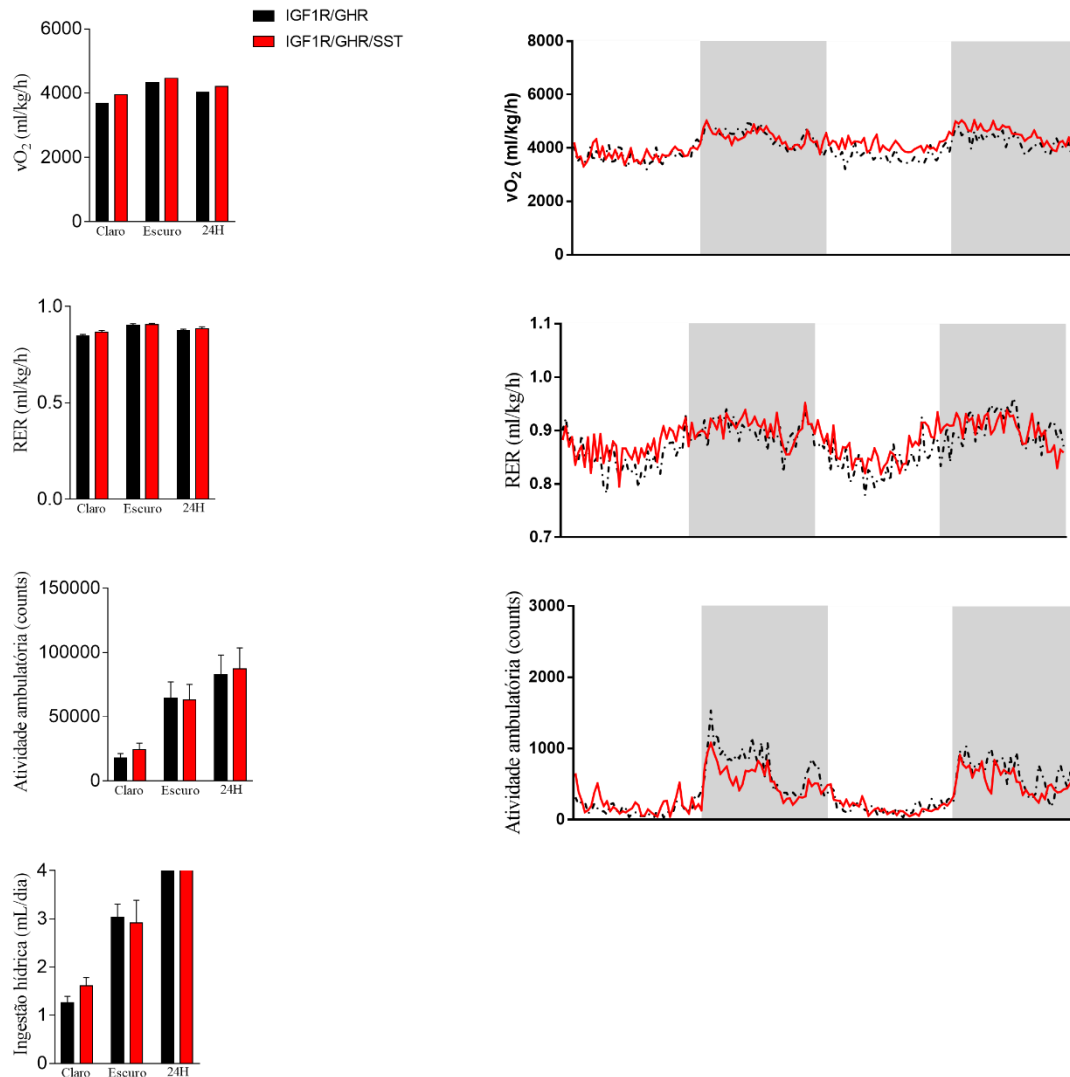


Figura 25: Análise do balanço energético de animais Fêmeas. (A) Consumo de oxigênio (VO_2). (B) Coeficiente respiratório (RER). (C) Ingestão hídrica. (D) Atividade ambulatória, (n=10 para controles e n=10 para nocautes), Fêmeas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

9.2.4 Comprimento naso-anal e peso dos órgãos

Com relação crescimento corporal e tecidual, não foram observadas diferenças significativas entre os animais controle e os animais IGF1R/GHR/SST no comprimento naso-anal e no peso do encéfalo, coração, rim e gônada (somente nos machos) e tecido adiposo perigonadal, nos machos e nas fêmeas (Figuras 26 A-B, E-H e 27 A-G). Nos

machos, encontramos diferença significativa apenas no peso do fígado e do músculo gastrocnêmio (Figura 26 C e D).

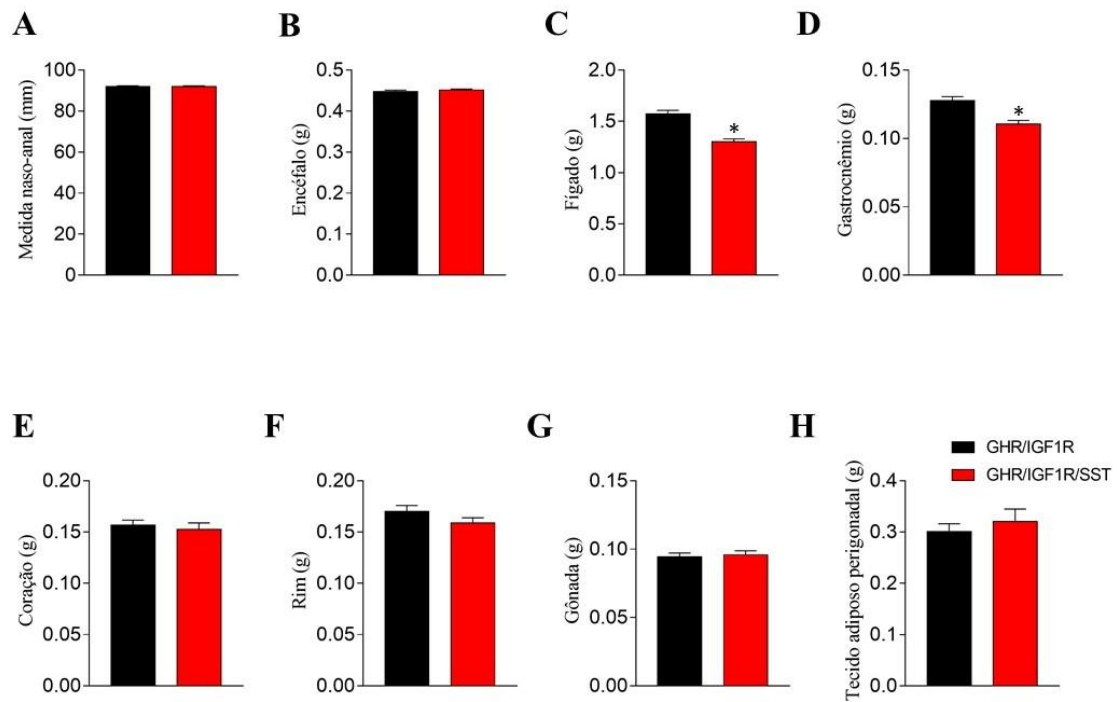


Figura 26: Comprimento naso-anal e peso dos órgãos Machos (A) Medida naso-anal. (B) Peso do encéfalo. (C) Peso do fígado. (D) Peso do gastrocnêmio. (E) Peso do coração. (F) Peso do rim. (G) Peso da gônada. (H) Peso do tecido adiposo perigonadal. N=14 para controles e n=10 para nocautes. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $P < 0,0001$ no fígado e * $P < 0,0006$ no músculo gastrocnêmio.

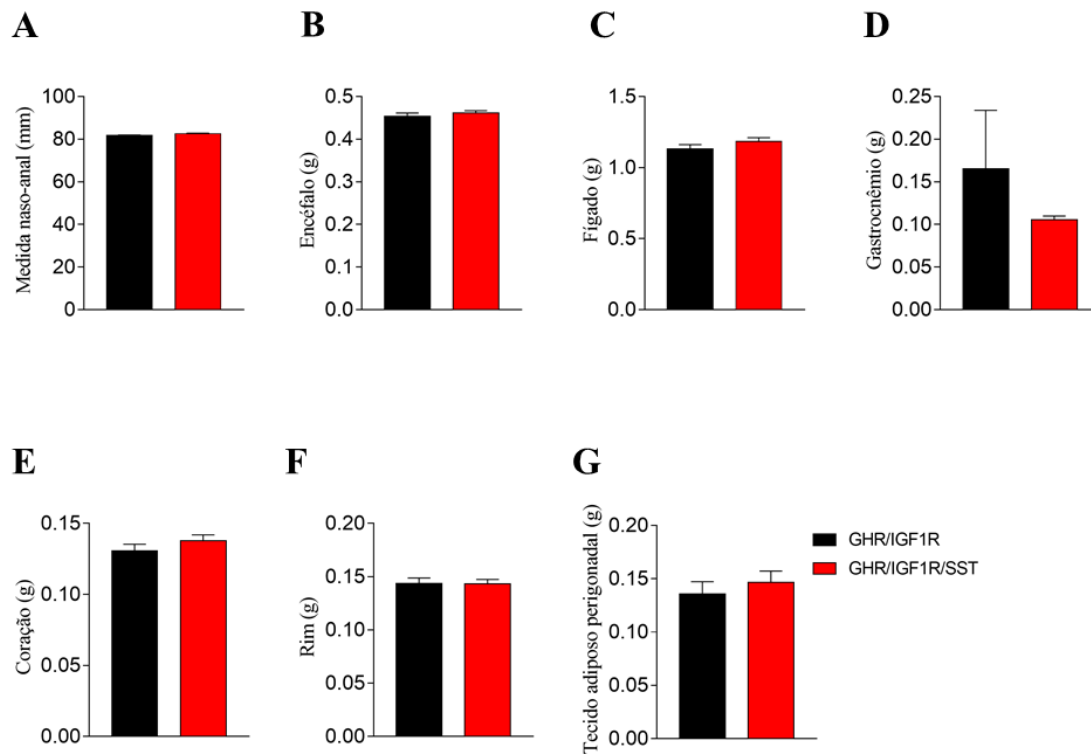


Figura 27: Comprimento naso-anal e peso dos órgãos Fêmeas (A) Medida naso-anal. (B) Peso do encéfalo. (C) Peso do fígado. (D) Peso do gastrocnêmio. (E) Peso do coração. (F) Peso do rim. (G) Peso do tecido adiposo perigonadal. N=12 para controles e n=15 para nocautes. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

9.2.5 Avaliação do eixo somatotrófico

Também não observamos diferenças significativas entre os animais controle e GHR/IGF1R/SST tanto nos machos (Figuras 28 A) quanto nas fêmeas (Figuras 29 A).

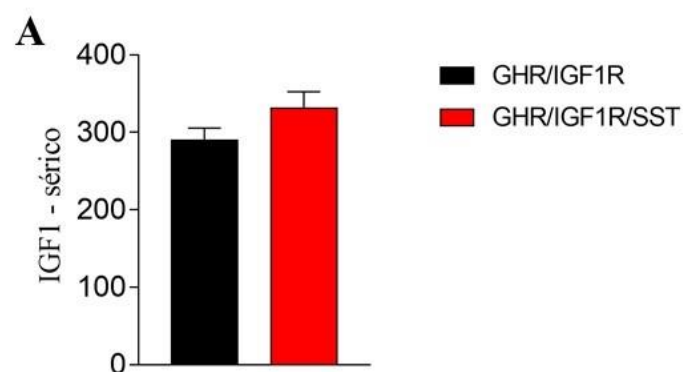


Figura 28: Secreção sérica de IGF-1 de animais Machos (A) Secreção de IGF-1. N=4 para controles e n=8 para nocautes. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

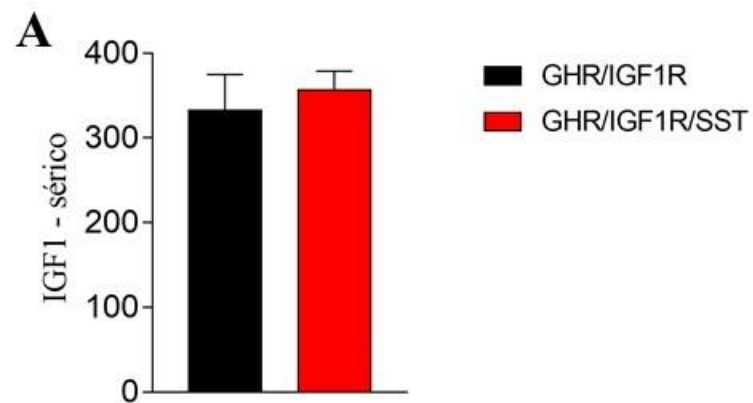


Figura 29: Secreção sérica de IGF-1 de animais Fêmeas (A) Secreção de IGF-1. N=7 para controles e n=8 para nocautes. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

10 DISCUSSÃO

Apesar dos efeitos biológicos mais conhecidos do GH serem mediados pelo fígado, músculo esquelético, osso e tecido adiposo branco (DEHKHODA; LEE; MEDINA; BROOKS, 2018), o cérebro expressa o GHR e deve ser considerado um importante alvo do GH para regular os principais aspectos fisiológicos, como funções cognitivas, neuroendócrinas, metabólicas e comportamentais (BURTON; KABIGTING; CLIFTON; STEINER, 1992; WASINSKI; FRAZÃO; DONATO JR, 2019). Dessa forma, a expressão de GHR no cérebro é importante para permitir que os neurônios neuroendócrinos detectem os níveis de GH e regulem a secreção hipofisária deste hormônio (STEYN; TOLLE; CHEN; EPELBAUM, 2016). A regulação da secreção de GH depende de alças de retroalimentação positiva e negativa que controlam a atividade de neurônios hipofisiotrópicos no hipotálamo (BERTHERAT; TIMSIT; BLUET-PAJOT; MERCADIER *et al.*, 1993; PELLEGRINI; BLUET-PAJOT; MOUNIER; BENNETT *et al.*, 1996; SCHWARTZ; WOODS; PORTE; SEELEY *et al.*, 2000). Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que a deleção do receptor de GH em neurônios que expressam tirosina hidroxilase (TH) ou em todo o cérebro aumentou significativamente a secreção de pulsos de GH e o crescimento corporal em camundongos machos e fêmeas (WASINSKI; PEDROSO; DOS SANTOS; FURIGO *et al.*, 2020). A literatura científica tem indicado que o GH controla sua própria secreção, principalmente através dos neurônios GHRH e SST (STEYN; TOLLE; CHEN; EPELBAUM, 2016). Contudo, interneurônios catecolaminérgicos são capazes de perceber mudanças nos níveis de GH e conseqüentemente, regular a expressão de GHRH para autocontrolar o eixo somatotrópico em camundongos (WASINSKI; PEDROSO; DOS SANTOS; FURIGO *et al.*, 2020). Ainda que os neurônios GHRH desempenhem importante papel no controle do padrão pulsátil da secreção de GH (STEYN; TOLLE; CHEN; EPELBAUM, 2016) menos de 10% dos neurônios GHRH expressam o GHR ou respondem diretamente ao GH (GODFREY; RAHAL; BEAMER; COPELAND *et al.*, 1993; WASINSKI; PEDROSO; DOS SANTOS; FURIGO *et al.*, 2020).

Resultados do nosso laboratório (ANEXO 3) mostraram que a ablação seletiva de GHR em neurônios SST de camundongos machos e fêmeas não promoveram alterações de crescimento corporal, bem como mudanças metabólicas e na secreção de

IGF1, revelando inesperadamente que a sinalização de GHR em neurônios SST não é suficiente nem necessária para controlar o eixo somatotrópico. Porém, como um pequeno percentual de neurônios GHRH expressa o GHR, esperávamos que os neurônios SST fossem mais relevantes no controle do eixo somatotrópico. As evidências que indicam que os neurônios SST eram importantes para alças de retroalimentação do controle de GH incluem que 70% dos neurônios SST coexpressam o mRNA de GHR nos núcleos PVN e PV (BURTON; KABIGTING; CLIFTON; STEINER, 1992; WASINSKI; FRAZÃO; DONATO JR, 2019). Além disso, a administração central de antisense do mRNA de GHR diminui a expressão hipotalâmica de SST, aumentando a pulsatilidade do GH (PELLEGRINI; BLUET-PAJOT; MOUNIER; BENNETT *et al.*, 1996). Juntas, essas evidências indicam que os neurônios que expressam SST seriam supostamente os principais responsáveis pela retroalimentação negativa no hipotálamo para controlar a secreção de GH (STEYN; TOLLE; CHEN; EPELBAUM, 2016; ZHU; YAO; XIONG; CHENG *et al.*, 2017). Para entender melhor a complexa interação entre os fatores que regulam a liberação de GH, devemos primeiro definir a importância dos vários mecanismos de retroalimentação que contribuem para sua secreção em geral. Por isso, investigamos a importância dos mecanismos de retroalimentação negativa sobre os neurônios SST para o controle do eixo somatotrópico.

Surpreendentemente, ao avaliarmos a deleção seletiva do receptor de IGF-1 e dos receptores de GH e de IGF-1, exclusivamente em neurônios que expressam SST, também não observamos alterações de crescimento, metabólicas e na secreção de IGF1 entre os grupos controles *versus* nocautes, tanto nos machos quanto nas fêmeas.

Steyn (2016) e colaboradores, demonstraram em uma revisão de literatura que os reguladores tradicionais (GHRH e STT) não são mais vistos como os únicos moduladores da pulsatilidade do GH. Em vez disso, agora é aceito que a produção de GH pode ser modificada pelas necessidades metabólicas e, portanto, é sob controle de feedback de vários intermediários que sinalizam fome, saciedade ou excesso ou desnutrição (STEYN; TOLLE; CHEN; EPELBAUM, 2016).

Em relação ao controle central do metabolismo, estudos anteriores demonstraram que a SST estimula a ingestão alimentar em roedores (APONTE; LEUNG; GROSS; YAMADA, 1984; STENGEL; TACHÉ, 2019; ZHU; YAO; XIONG; CHENG *et al.*, 2017). A infusão ICV de SST resultou em uma resposta bifásica, primeiro aumentando e depois diminuindo a ingestão alimentar. Nesse estudo, os efeitos

da somatostatina variaram de acordo com o estado nutricional dos animais. Em ratos alimentados, a infusão de SST diminuiu a ingestão de alimentar, enquanto que em ratos em jejum a infusão de SST aumentou a ingestão de alimentar (APONTE; LEUNG; GROSS; YAMADA, 1984). Zhu (2017) e colaboradores, demonstraram que a estimulação optogenética de neurônios de somatostatina e neurônios gabaérgicos no prosencéfalo basal levam a um aumento na ingestão alimentar (ZHU; YAO; XIONG; CHENG *et al.*, 2017). No entanto, em nosso estudo não observamos alterações na composição corporal e no consumo alimentar. Pode ser que os neurônios SST que expressam o GHR não são os mesmos neurônios SST envolvidos com o metabolismo. De fato, os neurônios SST que controlam o metabolismo estão localizados principalmente no núcleo tuberal, enquanto os neurônios SST que são responsivos ao GH estão presentes no PV e PVH. Além disso, nas condições estudadas neste trabalho, pode ser que a ação do GH nos neurônios SST não é importante para o controle metabólico.

Portanto, nossos resultados indicam que a ablação do receptor do IGF1 e do receptor do IGF1 em conjunto com o receptor de GH em neurônios que expressam SST não afetam diretamente o eixo somatotrófico o que pode sugerir que tem sido superdimensionado o papel desses neurônios no controle de retroalimentação negativa.

11 CONCLUSÃO

Demonstramos que a ablação do receptor do IGF1 e do receptor do IGF1 em conjunto com o receptor de GH em neurônios que expressam SST não promoveu alterações de crescimento, no metabolismo e na secreção de IGF1, conseqüentemente, não afetando diretamente o eixo somatotrófico. Esses resultados, embora negativos, são relevantes por demonstrar que os neurônios SST não medeiam a retroalimentação negativa que controla a secreção de GH e conseqüentemente o crescimento, conforme a literatura sugere.

12 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados apresentados nesta tese indicam que o efeito do TNF- α e da citocina IL-1 β sobre os neurônios produtores de AgRP contribui para a anorexia induzida por inflamação observada durante condições inflamatórias agudas. E que a ablação do receptor do IGF1 e do receptor do IGF1 em conjunto com o receptor de GH nos neurônios que expressam SST não afetam diretamente o eixo somatotrófico.

Os resultados desses estudos contribuem para o entendimento a respeito da importância fisiológica da ação de citocinas e fatores de crescimento sobre a atividade de neurônios hipotalâmicos e no controle neuroendócrino do metabolismo e do eixo somatotrófico.

13 REFERÊNCIAS

ABERG, N. D.; BRYWE, K. G.; ISGAARD, J. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. **ScientificWorldJournal**, 6, p. 53-80, Jan 2006.

ALEXIA, C.; FALLOT, G.; LASFER, M.; SCHWEIZER-GROYER, G. *et al.* An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis. **Biochem Pharmacol**, 68, n. 6, p. 1003-1015, Sep 2004.

ALLEN, T.; FEBBRAIO, M. IL6 as a mediator of insulin resistance: fat or fiction? **Diabetologia**, 53, n. 3, p. 399-402, 2010.

ANAND, B. K.; BROBECK, J. R. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. **The Yale journal of biology and medicine**, 24, n. 2, p. 123, 1951.

ANDERMANN, M. L.; LOWELL, B. B. Toward a Wiring Diagram Understanding of Appetite Control. **Neuron**, 95, n. 4, p. 757-778, Aug 16 2017. Review.

APONTE, G.; LEUNG, P.; GROSS, D.; YAMADA, T. Effects of somatostatin on food intake in rats. **Life Sci**, 35, n. 7, p. 741-746, Aug 1984.

APONTE, Y.; ATASOY, D.; STERNSON, S. M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. **Nat Neurosci**, 14, n. 3, p. 351-355, Mar 2011. 10.1038/nn.2739.

ARAUJO, E. P.; MORAES, J. C.; CINTRA, D. E.; VELLOSO, L. A. Mechanisms in endocrinology: hypothalamic inflammation and nutrition. **European journal of endocrinology**, 175, n. 3, p. R97-R105, 2016.

ASCHNER, M. Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. **Toxicology letters**, 102, p. 283-287, 1998.

BARBOUR, L. A.; SHAO, J.; QIAO, L.; LEITNER, W. *et al.* Human placental growth hormone increases expression of the p85 regulatory unit of phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle. **Endocrinology**, 145, n. 3, p. 1144-1150, 2004.

BAUER, S.; KERR, B. J.; PATTERSON, P. H. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. **Nature Reviews Neuroscience**, 8, n. 3, p. 221-232, 2007.

BELGARDT, B. F.; BRÜNING, J. C. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1212, n. 1, p. 97-113, 2010.

BELGARDT, B. F.; HUSCH, A.; ROTHER, E.; ERNST, M. B. *et al.* PDK1 deficiency in POMC-expressing cells reveals FOXO1-dependent and-independent pathways in control of energy homeostasis and stress response. **Cell metabolism**, 7, n. 4, p. 291-301, 2008.

BERELOWITZ, M.; SZABO, M.; FROHMAN, L. A.; FIRESTONE, S. *et al.* Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. **Science**, 212, n. 4500, p. 1279-1281, Jun 1981.

BERMANN, M.; JAFFE, C. A.; TSAI, W.; DEMOTT-FRIBERG, R. *et al.* Negative feedback regulation of pulsatile growth hormone secretion by insulin-like growth factor I. Involvement of hypothalamic somatostatin. **J Clin Invest**, 94, n. 1, p. 138-145, Jul 1994.

BERTHERAT, J.; TIMSIT, J.; BLUET-PAJOT, M. T.; MERCADIER, J. J. *et al.* Chronic growth hormone (GH) hypersecretion induces reciprocal and reversible changes in mRNA levels from hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin neurons in the rat. **J Clin Invest**, 91, n. 4, p. 1783-1791, Apr 1993.

BIEBERMANN, H.; CASTAÑEDA, T. R.; VAN LANDEGHEM, F.; VON DEIMLING, A. *et al.* A role for β -melanocyte-stimulating hormone in human body-weight regulation. **Cell metabolism**, 3, n. 2, p. 141-146, 2006.

BODNAR, R. J.; PASTERNAK, G. W.; MANN, P. E.; PAUL, D. *et al.* Mediation of anorexia by human recombinant tumor necrosis factor through a peripheral action in the rat. **Cancer Res**, 49, n. 22, p. 6280-6284, Nov 15 1989.

BOUYER, K.; LOUDES, C.; ROBINSON, I. C.; EPELBAUM, J. *et al.* Sexually dimorphic distribution of sst2A somatostatin receptors on growth hormone-releasing hormone neurons in mice. **Endocrinology**, 147, n. 6, p. 2670-2674, Jun 2006.

BUONFIGLIO, D. C.; RAMOS-LOBO, A. M.; SILVEIRA, M. A.; FURIGO, I. C. *et al.* Neuronal STAT5 signaling is required for maintaining lactation but not for postpartum maternal behaviors in mice. **Horm Behav**, 71, p. 60-68, Apr 17 2015.

BURFEIND, K. G.; MICHAELIS, K. A.; MARKS, D. L., 2016, **The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia**. Elsevier. 42-52.

BURTON, K. A.; KABIGTING, E. B.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid distribution in the adult male rat brain and its colocalization in hypothalamic somatostatin neurons. **Endocrinology**, 131, n. 2, p. 958-963, 1992.

CARSWELL, E.; OLD, L. J.; KASSEL, R.; GREEN, S. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 72, n. 9, p. 3666-3670, 1975.

CHOWEN, J. A.; FRAGO, L. M.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M. S. Physiological and pathophysiological roles of hypothalamic astrocytes in metabolism. **Journal of neuroendocrinology**, 31, n. 5, p. e12671, 2019.

CHUNG, I. Y.; BENVENISTE, E. Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. **The Journal of Immunology**, 144, n. 8, p. 2999-3007, 1990.

CLEMENZI, M. N.; WELLHAUSER, L.; ALJGHAMI, M. E.; BELSHAM, D. D. Tumour necrosis factor α induces neuroinflammation and insulin resistance in immortalised hypothalamic neurones through independent pathways. **Journal of neuroendocrinology**, 31, n. 1, p. e12678, 2019.

COPPARI, R.; ICHINOSE, M.; LEE, C. E.; PULLEN, A. E. *et al.* The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. **Cell metabolism**, 1, n. 1, p. 63-72, 2005.

DEHKHODA, F.; LEE, C. M.; MEDINA, J.; BROOKS, A. J. The growth hormone receptor: mechanism of receptor activation, cell signaling, and physiological aspects. **Frontiers in endocrinology**, 9, p. 35, 2018.

DENIS, R.; ARRUDA, A.; ROMANATTO, T.; MILANSKI, M. *et al.* TNF- α transiently induces endoplasmic reticulum stress and an incomplete unfolded protein response in the hypothalamus. **Neuroscience**, 170, n. 4, p. 1035-1044, 2010.

DOMENÉ, H.; KRISHNAMURTHI, K.; ESHET, R.; GILAD, I. *et al.* Growth hormone (GH) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I-binding protein-3, but not GH receptor gene expression in livers of juvenile rats. **Endocrinology**, 133, n. 2, p. 675-682, Aug 1993.

DONATO, J. The central nervous system as a promising target to treat diabetes mellitus. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 12, n. 19, p. 2070-2081, 2012.

DURAN-ORTIZ, S.; NOBOA, V.; KOPCHICK, J. J. Disruption of the GH receptor gene in adult mice and in insulin sensitive tissues. **Growth Hormone & IGF Research**, 38, p. 3-7, 2018.

FAN, W.; BOSTON, B. A.; KESTERSON, R. A.; HRUBY, V. J. *et al.* Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. **Nature**, 385, n. 6612, p. 165-168, 1997.

FEBBRAIO, M.; ROSE-JOHN, S.; PEDERSEN, B. K. Is interleukin-6 receptor blockade the Holy Grail for inflammatory diseases? **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 87, n. 4, p. 396-398, 2010.

FODOR, M.; CSABA, Z.; KORDON, C.; EPELBAUM, J. Growth hormone-releasing hormone, somatostatin, galanin and beta-endorphin afferents to the hypothalamic periventricular nucleus. **J Chem Neuroanat**, 8, n. 1, p. 61-73, Nov 1994.

FREDERICH, R. C.; HAMANN, A.; ANDERSON, S.; LÖLLMANN, B. *et al.* Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nature medicine**, 1, n. 12, p. 1311-1314, 1995.

FURIGO, I. C.; DE SOUZA, G. O.; TEIXEIRA, P. D. S.; GUADAGNINI, D. *et al.* Growth hormone enhances the recovery of hypoglycemia via ventromedial hypothalamic neurons. **FASEB J**, p. fj201901315R, Jul 31 2019.

FURIGO, I. C.; METZGER, M.; TEIXEIRA, P. D.; SOARES, C. R. *et al.* Distribution of growth hormone-responsive cells in the mouse brain. **Brain Struct Funct**, 222, n. 1, p. 341-363, 01 2017.

FURIGO, I. C.; TEIXEIRA, P. D. S.; DE SOUZA, G. O.; COUTO, G. C. L. *et al.* Growth hormone regulates neuroendocrine responses to weight loss via AgRP neurons. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 662, Feb 8 2019.

GIUSTINA, A.; MAZZIOTTI, G.; CANALIS, E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. **Endocr Rev**, 29, n. 5, p. 535-559, Aug 2008.

GODFREY, P.; RAHAL, J. O.; BEAMER, W. G.; COPELAND, N. G. *et al.* GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. **Nat Genet**, 4, n. 3, p. 227-232, Jul 1993.

GOLDFELD, A. E.; STROMINGER, J. L.; DOYLE, C. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation in phorbol ester stimulated T and B cell lines. **The Journal of experimental medicine**, 174, n. 1, p. 73-81, 1991.

H. D. VENTERS, S. R. B., J. H. ZHOU ET AL.,. Tumor necrosis factor α and insulin-like growth factor-I in the brain: is the whole greater than the sum of its parts? **Journal of Neuroimmunology**, vol. 119, no. 2, p. pp. 151-165, 2001.

HAMPL, R.; BICIKOVA, M.; SOSVOROVA, L. Hormones and the blood-brain barrier. **Horm Mol Biol Clin Investig**, 21, n. 3, p. 159-164, Mar 2015. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

HARDEN, L. M.; DU PLESSIS, I.; POOLE, S.; LABURN, H. P. Interleukin (IL)-6 and IL-1 beta act synergistically within the brain to induce sickness behavior and fever in rats. **Brain Behav Immun**, 22, n. 6, p. 838-849, Aug 2008.

HARDEN, L. M.; DU PLESSIS, I.; ROTH, J.; LORAM, L. C. *et al.* Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1beta and prostanoids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. **Psychoneuroendocrinology**, 36, n. 5, p. 608-622, Jun 2011.

HARTMAN, M. L.; VELDHUIS, J. D.; JOHNSON, M. L.; LEE, M. M. *et al.* Augmented growth hormone (GH) secretory burst frequency and amplitude mediate enhanced GH secretion during a two-day fast in normal men. **J Clin Endocrinol Metab**, 74, n. 4, p. 757-765, Apr 1992.

HERRICK, M. K.; FAVELA, K. M.; SIMERLY, R. B.; ABUMRAD, N. N. *et al.* Attenuation of diet-induced hypothalamic inflammation following bariatric surgery in female mice. **Molecular Medicine**, 24, n. 1, p. 56, 2018.

HERRINGTON, J.; SMIT, L. S.; SCHWARTZ, J.; CARTER-SU, C. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. **Oncogene**, 19, n. 21, p. 2585-2597, May 2000.

HILL, J. W. PVN pathways controlling energy homeostasis. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, 16, n. Suppl 3, p. S627, 2012.

HOLZWARATH-MCBRIDE, M. A.; HURST, E. M.; KNIGGE, K. M. Monosodium glutamate induced lesions of the arcuate nucleus. I. Endocrine deficiency and ultrastructure of the median eminence. **Anat Rec**, 186, n. 2, p. 185-205, Oct 1976.

HOPKINS, S. J.; ROTHWELL, N. J. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. **Trends in neurosciences**, 18, n. 2, p. 83-88, 1995.

HUO, L.; GRILL, H. J.; BJORBAEK, C. Divergent regulation of proopiomelanocortin neurons by leptin in the nucleus of the solitary tract and in the arcuate hypothalamic nucleus. **Diabetes**, 55, n. 3, p. 567-573, Mar 2006. Research Support, N.I.H., Extramural.

IKEDA, A.; CHANG, K. T.; MATSUMOTO, Y.; FURUHATA, Y. *et al.* Obesity and insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. **Endocrinology**, 139, n. 7, p. 3057-3063, Jul 1998.

IKENO, Y.; HUBBARD, G. B.; LEE, S.; CORTEZ, L. A. *et al.* Reduced incidence and delayed occurrence of fatal neoplastic diseases in growth hormone receptor/binding protein knockout mice. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 64, n. 5, p. 522-529, May 2009.

ISGAARD, J.; CARLSSON, L.; ISAKSSON, O. G.; JANSSON, J. O. Pulsatile intravenous growth hormone (GH) infusion to hypophysectomized rats increases insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in skeletal tissues more effectively than continuous GH infusion. **Endocrinology**, 123, n. 6, p. 2605-2610, Dec 1988.

J. A. D'ERCOLE, P. Y., AND J. R. O'KUSKY. Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides*. vol. 36, no. 2-3: pp. 209-220 p. 2002.

JAIS, A.; BRÜNING, J. C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, 127, n. 1, p. 24-32, 2017.

JOHNSON, A. M.; OLEFSKY, J. M. The origins and drivers of insulin resistance. **Cell**, 152, n. 4, p. 673-684, Feb 14 2013. Research Support, N.I.H., Extramural.

KASTRUP, Y.; LE GREVÈS, M.; NYBERG, F.; BLOMQVIST, A. Distribution of growth hormone receptor mRNA in the brain stem and spinal cord of the rat. **Neuroscience**, 130, n. 2, p. 419-425, 2005.

KATAFUCHI, T.; MOTOMURA, K.; BABA, S.; OTA, K. *et al.* Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and -beta on rat ventromedial hypothalamic neurons in vitro. **Am J Physiol**, 272, n. 6 Pt 2, p. R1966-1971, Jun 1997.

KIM, K.; CHOE, H. K. Role of hypothalamus in aging and its underlying cellular mechanisms. **Mechanisms of ageing and development**, 177, p. 74-79, 2019.

KRASHES, M. J.; KODA, S.; YE, C.; ROGAN, S. C. *et al.* Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. **J Clin Invest**, 121, n. 4, p. 1424-1428, Apr 2011. Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't.

KÖNNER, A. C.; HESS, S.; TOVAR, S.; MESAROS, A. *et al.* Role for insulin signaling in catecholaminergic neurons in control of energy homeostasis. **Cell metabolism**, 13, n. 6, p. 720-728, 2011.

LEE, Y. S.; CHALLIS, B. G.; THOMPSON, D. A.; YEO, G. S. *et al.* A POMC variant implicates β -melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. **Cell metabolism**, 3, n. 2, p. 135-140, 2006.

LICHANSKA, A. M.; WATERS, M. J. New insights into growth hormone receptor function and clinical implications. **Horm Res**, 69, n. 3, p. 138-145, 2008.

LIU, Y.; HUANG, Y.; LIU, T.; WU, H. *et al.* Lipopolysaccharide Rapidly and Completely Suppresses AgRP Neuron-Mediated Food Intake in Male Mice. **Endocrinology**, 157, n. 6, p. 2380-2392, Jun 2016. Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't.

LUGER, A.; PRAGER, R.; GAUBE, S.; GRAF, H. *et al.* Decreased peripheral insulin sensitivity in acromegalic patients. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, 95, n. 03, p. 339-343, 1990.

MACGREGOR, D. J.; LENG, G. Modelling the hypothalamic control of growth hormone secretion. **J Neuroendocrinol**, 17, n. 12, p. 788-803, Dec 2005.

MAITER, D.; UNDERWOOD, L. E.; MAES, M.; DAVENPORT, M. L. *et al.* Different effects of intermittent and continuous growth hormone (GH) administration on serum somatomedin-C/insulin-like growth factor I and liver GH receptors in hypophysectomized rats. **Endocrinology**, 123, n. 2, p. 1053-1059, Aug 1988.

MILLER, N. Experiments of motivation. Studies combining psychological. pharmacological techniques Science. Basic Books, New York Idézi: Réthyné 1978.

MILLER, V.; ROGERS, K.; MUIRDEN, K. Detection of tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in the rheumatoid osteoarthritic cartilage-pannus junction by immunohistochemical methods. **Rheumatology international**, 13, n. 2, p. 77-82, 1993.

MINAMI, S.; KAMEGAI, J.; HASEGAWA, O.; SUGIHARA, H. *et al.* Expression of growth hormone receptor gene in rat hypothalamus. **J Neuroendocrinol**, 5, n. 6, p. 691-696, Dec 1993.

MOHAMED-ALI, V.; FLOWER, L.; SETHI, J.; HOTAMISLIGIL, G. *et al.* β -Adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 86, n. 12, p. 5864-5869, 2001.

MOUTOUSSAMY, S.; KELLY, P. A.; FINIDORI, J. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. **Eur J Biochem**, 255, n. 1, p. 1-11, Jul 1998.

MØLLER, N.; JØRGENSEN, J. O. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. **Endocr Rev**, 30, n. 2, p. 152-177, Apr 2009.

NADEAU, S.; RIVEST, S. Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in the rat brain and pituitary in response to different models of systemic immune challenge. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, 58, n. 1, p. 61-77, 1999.

NIEVES-RIVERA, F.; KERRIGAN, J. R.; KRIEG, R. J.; EGAN, J. *et al.* Altered growth hormone (GH) secretion in vivo and in vitro in the diabetes-prone BB/Worcester rat. **Growth Regul**, 3, n. 4, p. 235-244, Dec 1993.

NYBERG, F. Growth hormone in the brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. **Front Neuroendocrinol**, 21, n. 4, p. 330-348, Oct 2000.

OLOFSSON, L. E.; UNGER, E. K.; CHEUNG, C. C.; XU, A. W. Modulation of AgRP-neuronal function by SOCS3 as an initiating event in diet-induced hypothalamic leptin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 8, p. E697-706, Feb 19 2013. Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't.

ONO, H. Molecular mechanisms of hypothalamic insulin resistance. **International journal of molecular sciences**, 20, n. 6, p. 1317, 2019.

PEDERSEN, B. K.; STEENBERG, A.; SCHJERLING, P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. **The Journal of physiology**, 536, n. 2, p. 329-337, 2001.

PEDROSO, J. A.; SILVEIRA, M. A.; LIMA, L. B.; FURIGO, I. C. *et al.* Changes in Leptin Signaling by SOCS3 Modulate Fasting-Induced Hyperphagia and Weight Regain in Mice. **Endocrinology**, 157, n. 10, p. 3901-3914, Oct 2016.

PELLEGRINI, E.; BLUET-PAJOT, M. T.; MOUNIER, F.; BENNETT, P. *et al.* Central administration of a growth hormone (GH) receptor mRNA antisense increases GH pulsatility and decreases hypothalamic somatostatin expression in rats. **J Neurosci**, 16, n. 24, p. 8140-8148, Dec 1996.

PIMENTEL, G. D.; GANESHAN, K.; CARVALHEIRA, J. B. Hypothalamic inflammation and the central nervous system control of energy homeostasis. **Molecular and cellular endocrinology**, 397, n. 1-2, p. 15-22, 2014.

PLATA-SALAMAN, C. R.; OOMURA, Y.; KAI, Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. **Brain Res**, 448, n. 1, p. 106-114, May 10 1988.

PLATA-SALAMAN, C. R.; VASSELLI, J. R.; SONTI, G. Differential responsiveness of obese (fa/fa) and lean (Fa/Fa) Zucker rats to cytokine-induced anorexia. **Obes Res**, 5, n. 1, p. 36-42, Jan 1997.

PLIQUETT, R.; FÜHRER, D.; FALK, S.; ZYSSET, S. *et al.* The effects of insulin on the central nervous system-focus on appetite regulation. **Hormone and metabolic Research**, 38, n. 07, p. 442-446, 2006.

PLOTSKY, P. M.; VALE, W. Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. **Science**, 230, n. 4724, p. 461-463, Oct 1985.

PLUM, L.; SCHUBERT, M.; BRÜNING, J. C. The role of insulin receptor signaling in the brain. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 16, n. 2, p. 59-65, 2005.

PURKAYASTHA, S.; ZHANG, G.; CAI, D. Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK- β and NF- κ B. **Nature medicine**, 17, n. 7, p. 883, 2011.

QUARESMA, P. G. F.; TEIXEIRA, P. D. S.; FURIGO, I. C.; WASINSKI, F. *et al.* Growth hormone/STAT5 signaling in proopiomelanocortin neurons regulates glucoprivic hyperphagia. **Mol Cell Endocrinol**, 498, p. 110574, Sep 5 2019.

RAMOS-LOBO, A. M.; DONATO JR, J. The role of leptin in health and disease. **Temperature**, 4, n. 3, p. 258-291, 2017.

RIVEST, S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Psychoneuroendocrinology**, 26, n. 8, p. 761-788, 2001.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Mechanisms mediating the effects of cytokines on neuroendocrine functions in the rat. **Corticotropin-Releasing Factor**, p. 204-225, 1993.

RIVIER, J.; SPIESS, J.; THORNER, M.; VALE, W. Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. **Nature**, 300, n. 5889, p. 276-278, Nov 1982.

RODNEY, T.; OSIER, N.; GILL, J. Pro-and anti-inflammatory biomarkers and traumatic brain injury outcomes: a review. **Cytokine**, 110, p. 248-256, 2018.

ROMANATTO, T.; CESQUINI, M.; AMARAL, M. E.; ROMAN, E. A. *et al.* TNF- α acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient—effects on leptin and insulin signaling pathways. **peptides**, 28, n. 5, p. 1050-1058, 2007.

ROSENTHAL, S. M.; HULSE, J. A.; KAPLAN, S. L.; GRUMBACH, M. M. Exogenous growth hormone inhibits growth hormone-releasing factor-induced growth hormone secretion in normal men. **J Clin Invest**, 77, n. 1, p. 176-180, Jan 1986.

ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. **Trends in neurosciences**, 18, n. 3, p. 130-136, 1995.

ROTTER, V.; NAGAEV, I.; SMITH, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. **Journal of Biological Chemistry**, 278, n. 46, p. 45777-45784, 2003.

SAMODIEN, E.; JOHNSON, R.; PHEIFFER, C.; MABASA, L. *et al.* Diet-induced hypothalamic dysfunction and metabolic disease, and the therapeutic potential of polyphenols. **Molecular metabolism**, 27, p. 1, 2019.

SAPER, C. B.; SCAMMELL, T. E.; LU, J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. **Nature**, 437, n. 7063, p. 1257-1263, 2005.

SCARLETT, J. M.; JOBST, E. E.; ENRIORI, P. J.; BOWE, D. D. *et al.* Regulation of central melanocortin signaling by interleukin-1 beta. **Endocrinology**, 148, n. 9, p. 4217-4225, Sep 2007. Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't.

SCHAEFFER, M.; LANGLET, F.; LAFONT, C.; MOLINO, F. *et al.* Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 4, p. 1512-1517, Jan 22 2013.

SCHELE, E.; BENRICK, A.; GRAHNEMO, L.; EGECIOGLU, E. *et al.* Inter-relation between interleukin (IL)-1, IL-6 and body fat regulating circuits of the hypothalamic arcuate nucleus. **J Neuroendocrinol**, 25, n. 6, p. 580-589, Jun 2013.

SCHROETER, M.; JANDER, S. T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. **Neuromolecular medicine**, 7, n. 3, p. 183-195, 2005.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D., JR.; SEELEY, R. J. *et al.* Central nervous system control of food intake. **Nature**, 404, n. 6778, p. 661-671, Apr 6 2000.

SCHÖBITZ, B.; DE KLOET, E. R.; SUTANTO, W.; HOLLSBOER, F. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. **European Journal of Neuroscience**, 5, n. 11, p. 1426-1435, 1993.

SEONG, J.; KANG, J. Y.; SUN, J. S.; KIM, K. W. Hypothalamic inflammation and obesity: a mechanistic review. **Archives of pharmacal research**, 42, n. 5, p. 383-392, 2019.

SHIZUYA, K.; KOMORI, T.; FUJIWARA, R.; MIYAHARA, S. *et al.* The expressions of mRNAs for interleukin-6 (IL-6) and the IL-6 receptor (IL-6R) in the rat hypothalamus and midbrain during restraint stress. **Life sciences**, 62, n. 25, p. 2315-2320, 1998.

SILVEIRA, M. A.; FURIGO, I. C.; ZAMPIERI, T. T.; BOHLEN, T. M. *et al.* STAT5 signaling in kisspeptin cells regulates the timing of puberty. **Mol Cell Endocrinol**, 448, p. 55-65, Jun 15 2017.

SILVEIRA, M. A.; ZAMPIERI, T. T.; FURIGO, I. C.; ABDULKADER, F. *et al.* Acute effects of somatomammotropin hormones on neuronal components of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. **Brain Res**, 1714, p. 210-217, Jul 1 2019.

SKELLY, D. T.; HENNESSY, E.; DANSEREAU, M.-A.; CUNNINGHAM, C. A systematic analysis of the peripheral and CNS effects of systemic LPS, IL-1 β , TNF- α and IL-6 challenges in C57BL/6 mice. **PloS one**, 8, n. 7, 2013.

SOUZA, G. F.; SOLON, C.; NASCIMENTO, L. F.; DE-LIMA-JUNIOR, J. C. *et al.* Defective regulation of POMC precedes hypothalamic inflammation in diet-induced obesity. **Scientific reports**, 6, p. 29290, 2016.

SOUZA, G. F.; SOLON, C.; NASCIMENTO, L. F.; DE-LIMA-JUNIOR, J. C. *et al.* Defective regulation of POMC precedes hypothalamic inflammation in diet-induced obesity. **Sci Rep**, 6, p. 29290, 2016.

SPIESS, J.; RIVIER, J.; VALE, W. Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. **Nature**, 303, n. 5917, p. 532-535, 1983 Jun 9-15 1983.

STANFIELD, C. L. Fisiologia Humana. **São Paulo: Person Education do Brasil**, 2014.

STENGEL, A.; TACHÉ, Y. Central somatostatin signaling and regulation of food intake. **Ann N Y Acad Sci**, 1455, n. 1, p. 98-104, 11 2019.

STEYN, F. J.; TOLLE, V.; CHEN, C.; EPELBAUM, J. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion. **Comprehensive Physiology**, 6, n. 2, p. 687-735, 2011.

STEYN, F. J.; TOLLE, V.; CHEN, C.; EPELBAUM, J. Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion. **Compr Physiol**, 6, n. 2, p. 687-735, Mar 2016.

SUTTON, A. K.; MYERS JR, M. G.; OLSON, D. P. The role of PVH circuits in leptin action and energy balance. **Annual review of physiology**, 78, p. 207-221, 2016.

SÁNCHEZ-LASHERAS, C.; KÖNNER, A. C.; BRÜNING, J. C. Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. **Frontiers in neuroendocrinology**, 31, n. 1, p. 4-15, 2010.

TANNENBAUM, G. S.; BOWERS, C. Y. Interactions of growth hormone secretagogues and growth hormone-releasing hormone/somatostatin. **Endocrine**, 14, n. 1, p. 21-27, Feb 2001.

TEIXEIRA, P. D. S.; COUTO, G. C.; FURIGO, I. C.; LIST, E. O. *et al.* Central growth hormone action regulates metabolism during pregnancy. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Sep 3 2019.

THALER, J. P.; CHOI, S. J.; SCHWARTZ, M. W.; WISSE, B. E. Hypothalamic inflammation and energy homeostasis: resolving the paradox. **Front Neuroendocrinol**, 31, n. 1, p. 79-84, Jan 2010.

THALER, J. P.; YI, C.-X.; SCHUR, E. A.; GUYENET, S. J. *et al.* Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **The Journal of clinical investigation**, 122, n. 1, p. 153-162, 2012.

THALER, J. P.; YI, C.-X.; SCHUR, E. A.; GUYENET, S. J. *et al.* Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin Invest**, 122, n. 1, p. 153-162, 2012.

TORRES-ALEMAN, I. Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. **Dev Neurobiol**, 70, n. 5, p. 384-396, Apr 2010.

TRUJILLO, M. E.; SULLIVAN, S.; HARTEN, I.; SCHNEIDER, S. H. *et al.* Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. **J Clin Endocrinol Metab**, 89, n. 11, p. 5577-5582, Nov 2004.

TUERSUNJIANG, N.; ODHIAMBO, J. F.; SHASA, D. R.; SMITH, A. M. *et al.* Maternal obesity programs reduced leptin signaling in the pituitary and altered GH/IGF1 axis function leading to increased adiposity in adult sheep offspring. **PLoS One**, 12, n. 8, p. e0181795, 2017.

VALDEARCOS, M.; XU, A. W.; KOLIWAD, S. K. Hypothalamic inflammation in the control of metabolic function. **Annual review of physiology**, 77, p. 131-160, 2015.

VELDHUIS, J. D.; BOWERS, C. Y. Human GH pulsatility: an ensemble property regulated by age and gender. **J Endocrinol Invest**, 26, n. 9, p. 799-813, Sep 2003.

VELLOSO, C. P. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. **Br J Pharmacol**, 154, n. 3, p. 557-568, Jun 2008.

VELLOSO, L. A.; FOLLI, F.; SAAD, M. J. TLR4 at the Crossroads of Nutrients, Gut Microbiota, and Metabolic Inflammation. **Endocr Rev**, 36, n. 3, p. 245-271, Jun 2015. Research Support, Non-U.S. Gov't

Review.

VOGT, M. C.; BRÜNING, J. C. CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism—from embryo to old age. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 24, n. 2, p. 76-84, 2013.

WALLENIOUS, V.; WALLENIOUS, K.; AHREN, B.; RUDLING, M. *et al.* Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. **Nat Med**, 8, n. 1, p. 75-79, Jan 2002.

WASINSKI, F.; FRAZÃO, R.; DONATO JR, J. Effects of growth hormone in the central nervous system. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, 63, n. 6, p. 549-556, 2019.

WASINSKI, F.; PEDROSO, J. A. B.; DOS SANTOS, W. O.; FURIGO, I. C. *et al.* Tyrosine Hydroxylase Neurons Regulate Growth Hormone Secretion via Short-Loop Negative Feedback. **J Neurosci**, 40, n. 22, p. 4309-4322, 05 2020.

WATERS, M. J.; SHANG, C. A.; BEHNCKEN, S. N.; TAM, S. P. *et al.* Growth hormone as a cytokine. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 26, n. 10, p. 760-764, Oct 1999.

WERNER, H.; WOLOSCHAK, M.; ADAMO, M.; SHEN-ORR, Z. *et al.* Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor I receptor gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 86, n. 19, p. 7451-7455, Oct 1989.

WILKINSON, L.; EDWARDS, J. Binding of antibodies raised against tumour necrosis factor alpha (TNF α) to blood vessels and macrophages in inflamed synovial tissue. **Rheumatology international**, 11, n. 1, p. 19-25, 1991.

WOODS, S. C.; SCHWARTZ, M. W.; BASKIN, D. G.; SEELEY, R. J. Food intake and the regulation of body weight. **Annual review of psychology**, 51, n. 1, p. 255-277, 2000.

ZHU, C.; YAO, Y.; XIONG, Y.; CHENG, M. *et al.* Somatostatin Neurons in the Basal Forebrain Promote High-Calorie Food Intake. **Cell Rep**, 20, n. 1, p. 112-123, 07 2017.

14 ANEXO 1: Artigo publicado

Article

Tumor Necrosis Factor α and Interleukin-1 β Acutely Inhibit AgRP Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus

Fernanda M. Chaves ¹, Naira S. Mansano ², Renata Frazão ^{2,*} and Jose Donato Jr. ^{1,*}

¹ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; fernandamchaves@gmail.com

² Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil; naira.mansano@gmail.com

* Correspondence: rfrazao@usp.br (R.F.); jdonato@icb.usp.br (J.D.J.)

Received: 9 November 2020; Accepted: 20 November 2020; Published: date

Abstract: Obesity-associated low-grade inflammation favors weight gain, whereas systemic infection frequently leads to anorexia. Thus, inflammatory signals can either induce positive or negative energy balance. In this study, we used whole-cell patch-clamp to investigate the acute effects of three important proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6, and interleukin-1 β (IL-1 β) on the membrane excitability of agouti-related peptide (AgRP)- or proopiomelanocortin (POMC)-producing neurons. We found that both TNF- α and IL-1 β acutely inhibited the activity of 35%–42% of AgRP-producing neurons, whereas very few POMC neurons were depolarized by TNF- α . Interleukin-6 induced no acute changes in the activity of AgRP or POMC neurons. Our findings indicate that the effect of TNF- α and IL-1 β , especially on the activity of AgRP-producing neurons, may contribute to inflammation-induced anorexia observed during acute inflammatory conditions.

Keywords: cytokines; inflammation; interleukin-6; obesity; POMC; sepsis

1. Introduction

The hypothalamus is a brain structure responsible for the regulation of numerous visceral functions, including the control of body temperature, autonomic nervous system, and feeding behavior, among others [1]. Particularly regarding the regulation of energy homeostasis, hypothalamic lesions can produce striking changes in hunger and body weight [2,3]. Several hypothalamic nuclei are involved in the central control of metabolism, even though a well-characterized population is composed of neurons located in the ventral aspects of the third ventricle. In rodents, this area is called the arcuate nucleus (ARH) and is composed of several neurochemically defined neuronal populations [4–7]. In the ventromedial aspects of the ARH, there is a great number of neurons co-expressing agouti-related peptide (AgRP) and neuropeptide Y (NPY) [8]. AgRP/NPY-producing neurons are powerful inducers of hunger, and their activation leads to weight gain [9,10]. A different group of neurons are spread over the lateral part of the ARH and they express proopiomelanocortin (POMC), which is a prohormone cleaved into different peptides, including α -melanocyte-stimulating hormone [11,12]. In contrast to AgRP/NPY-expressing cells, POMC neurons generally promote satiety [13,14].

An important aspect of ARH neurons is that they are very close to the median eminence, which is one of the circumventricular organs of the brain. Therefore, this region possesses a blood-brain barrier less selective than that in other brain areas [15]. Consequently, ARH neurons are exposed to circulating factors such as hormones, cytokines, nutrients, and toxins [15,16]. On the one hand, this characteristic allows ARH neurons to be an interface between what happens on the periphery to generate central responses [17]. However, ARH neurons are more vulnerable to insults or large variations in the levels of circulating factors [16,18]. In this regard, numerous pieces of evidence indicate the inflammatory status as a major factor that affects hypothalamic neurocircuits that control energy homeostasis, particularly ARH neurons [18–21]. Thus, both AgRP and POMC neurons are affected by cytokines involved in inflammatory responses [18–21].

Changes in hypothalamic inflammation are able to produce the opposite effects on energy homeostasis. It is well-known that obesity is characterized by a low-grade inflammation that affects several organs, including the adipose tissue, liver, gut, and hypothalamus [18–21]. In addition, obesogenic aspects in the environment, such as the consumption of saturated fatty acids [22,23] and alterations in the intestinal microbiota [24] are associated with systemic inflammation and altered energy metabolism. Therefore, obesity-associated low-grade inflammation is considered a factor that disturbs the ability of hypothalamic neurons to control energy homeostasis, predisposing individuals to metabolic imbalances [19,24]. Accordingly, high-fat diet intake induces acute increases in the hypothalamic expression of proinflammatory cytokines [20]. On the other hand, systemic infection or acute inflammatory conditions produce a sickness response in the central nervous system, frequently associated with fever, anorexia, anhedonia, and sleepiness [25]. For example, lipopolysaccharide (LPS)-treated mice exhibit reduced food intake [26]. In addition, LPS blunts the feeding response induced by AgRP neuronal activation [27]. Thus, it is clear that, depending on their magnitude, duration, and characteristics, hypothalamic inflammatory signals can either favor a positive or negative energy balance [25].

Although the consequences of the hypothalamic inflammation have been widely investigated, one aspect that has been less studied involves the effects of proinflammatory cytokines on the electrical activity of AgRP/NPY and POMC neurons. Scarlett et al. [28] showed that the proinflammatory interleukin-1 β (IL-1 β) increases the frequency of action potentials in ARH POMC neurons, which is expected to reduce hunger. However, whether other important proinflammatory cytokines, like tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), are also able to induce acute effects of the electrical activity of AgRP/NPY and POMC neurons is still unknown. Therefore, the objective of the present study was to investigate the acute effects induced by TNF- α , IL-6, and IL-1 β on the resting membrane potential (RMP) and input resistance (IR) of AgRP/NPY and POMC neurons in the ARH. These findings can contribute to the understanding of how proinflammatory cytokines affect neural circuits that regulate food intake and metabolism.

2. Results

2.1. Characterization of Resting Biophysical Properties of AgRP Neurons

Although AgRP and POMC neurons are found close to each other in the ARH, they represent different cell populations [4–6]. Before evaluating the effects of cytokines in the activity of ARH neurons, using histological methods [29] we confirmed the exclusive expression of AgRP in the ventromedial part of the ARH using the AgRP-reporter mice (Figure 1A). In total, 50 AgRP neurons were evaluated from 24 mice. From these cells, 37 AgRP neurons (74%) were considered active because they were firing action potentials during the basal recording, whereas the remaining cells (13/50; 26%) were quiescent. The average RMP of active AgRP neurons was -52.6 ± 0.7 mV (range from -45 mV to -63 mV) and the mean resting IR was $1.8 \pm$

0.1 G Ω (ranging from 0.9 G Ω to 2.9 G Ω). The RMP of quiescent AgRP neurons was -52.5 ± 2.5 mV (range from -40 mV to -70 mV) and the mean resting IR was 1.0 ± 0.1 G Ω (ranging from 0.4 G Ω to 1.8 G Ω).

2.2. TNF- α Acutely Inhibits the Activity of AgRP-Producing Neurons

The acute effect of the proinflammatory cytokine TNF- α was determined in brain slices of AgRP-reporter mice. For this purpose, 21 AgRP neurons were recorded from 15 mice. From the recorded cells, 17 of them were active, whereas four cells were quiescent. The results of active and quiescent cells are presented separately. Regarding the active cells, TNF- α induced a fast and significant hyperpolarization in six cells, representing 35% of the recorded AgRP neurons (Figure 1A). In this sense, TNF- α changed the RMP of responsive cells in -9.8 ± 0.6 mV ($p < 0.0001$, Figure 1A). In addition, IR was significantly reduced after TNF- α administration (-0.34 ± 0.11 G Ω , $p = 0.0391$, Figure 1A). It is worth mentioning that the TNF- α effect was not reversible during the washout period recorded (Figure 1A). In contrast, 11 AgRP neurons (65% of the cells) did not exhibit significant changes after TNF- α application to the bath (Figure 1B). All quiescent cells ($n = 4$) did not present significant alterations in their RMP and IR after TNF- α administration (Figure 1C). Thus, TNF- α produces an acute inhibitory effect on a subgroup of active AgRP neurons.

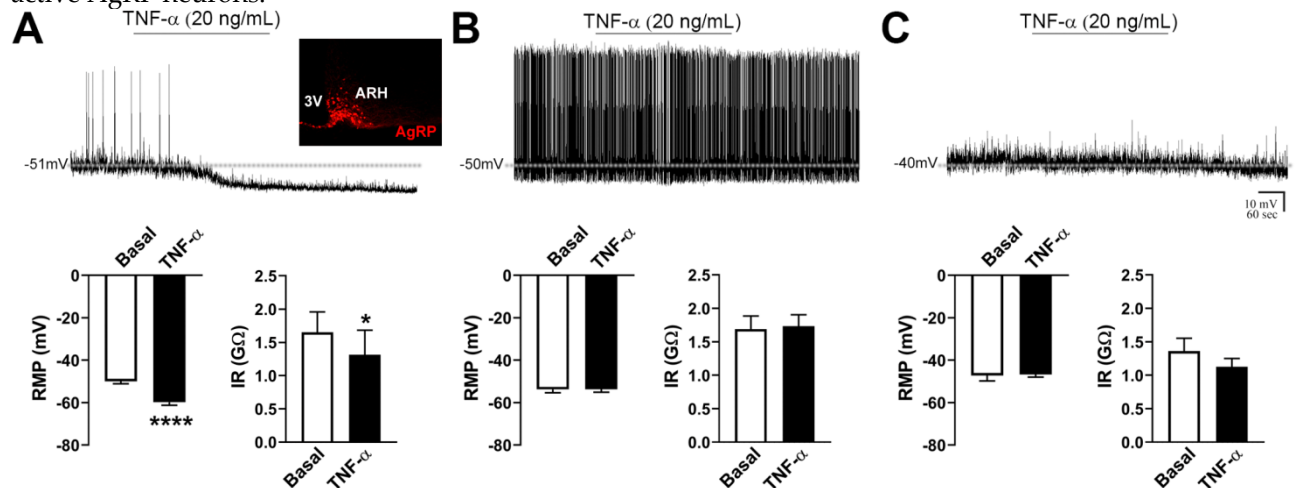


Figure 1. Tumor necrosis factor α (TNF- α) acutely inhibits the activity of agouti-related peptide (AgRP)-producing neurons. (A) Acute effects of TNF- α on the resting membrane potential (RMP) and input resistance (IR) of responsive AgRP neurons ($n = 6$). In inset shows AgRP-producing neurons in the ventromedial part of the arcuate nucleus (ARH). 3V = third ventricle. **(B)** Absence of changes in RMP and IR in nonresponsive AgRP neurons that were active (firing action potentials) during baseline ($n = 11$). **(C)** Absence of changes in RMP and IR in AgRP neurons that were quiescent during baseline ($n = 4$). In all conditions, representative whole-cell patch-clamp recordings are shown. Dashed lines indicate baseline RMP. TNF- α was applied to the bath for approximately 5 min. * $p = 0.0391$, **** $p < 0.0001$.

2.3. Activity of AgRP Neurons is not Acutely Affected by IL-6

The potential effects of IL-6 on the RMP and IR of AgRP neurons were also determined. The effects of an acute application of IL-6 were analyzed in 10 AgRP neurons from four mice. Half of the recorded neurons were active and the other half were quiescent. In contrast to the effects caused by TNF- α administration, we found that IL-6 did not significantly change the RMP and IR of either active (Figure 2A) or quiescent (Figure 2B) AgRP neurons.

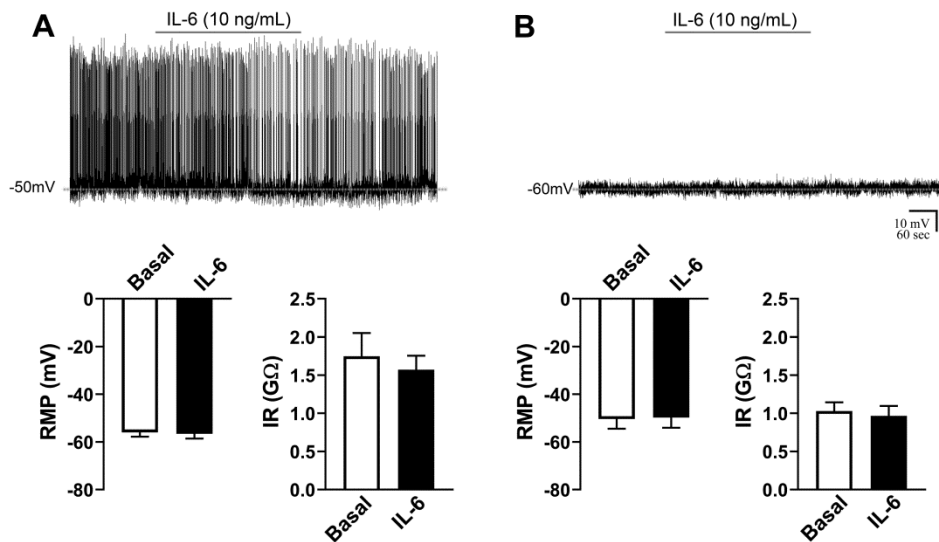


Figure 2. Activity of AgRP neurons is not acutely affected by interleukin-6 (IL-6). (A,B). IL-6 does not induce acute changes in the resting membrane potential (RMP) or input resistance (IR) of active (firing action potentials during baseline, $n = 5$) and quiescent (B, $n = 5$) AgRP-expressing neurons. Dashed lines indicate baseline RMP. IL-6 was applied to the bath for approximately 5 min.

2.4. AgRP Neurons are Acutely Inhibited by IL-1 β

To determine the acute effects of IL-1 β , 19 AgRP neurons were recorded from seven mice. From the recorded cells, 15 of them were active, whereas four cells were quiescent. IL-1 β induced a statistically significant hyperpolarization in eight cells, which represents 42% of the recorded AgRP neurons. In the responsive neurons, IL-1 β induced a -6.2 ± 1.1 mV change in the RMP ($p = 0.0007$, Figure 3A). IR was also significantly reduced after IL-1 β treatment (-0.24 ± 0.09 G Ω , $p = 0.0442$, Figure 3A). Similarly to TNF- α , the effect induced by IL-1 β was not reversible during the recorded period (Figure 3A). Regarding nonresponsive cells, 11 AgRP neurons (58% of the cells) did not exhibit significant changes in the RMP and IR after IL-1 β administration (Figure 3B). Since a previous study found that IL-6 and IL-1 β act synergistically in the brain to induce sickness behavior [30], we also studied the effects of the co-administration of IL-6 in AgRP neurons in the initial responses induced by IL-1 β . After the isolated infusion of IL-1 β , IL-6 was co-administered in seven AgRP neurons (recorded from four mice). Similar to the previous results, IL-1 β induced a hyperpolarization of the RMP in approximately 42% of AgRP neurons (3 out of 7 cells, change in RMP: -6.6 ± 2.3 mV, Figure 3C). The co-administration of IL-6 neither enhanced nor inhibited the response to IL-1 β ($p = 0.99$, IL-1 β versus IL-6 + IL-1 β , Figure 3C). Taken together, IL-1 β causes an acute inhibitory effect on the activity of ARH AgRP-expressing neurons.

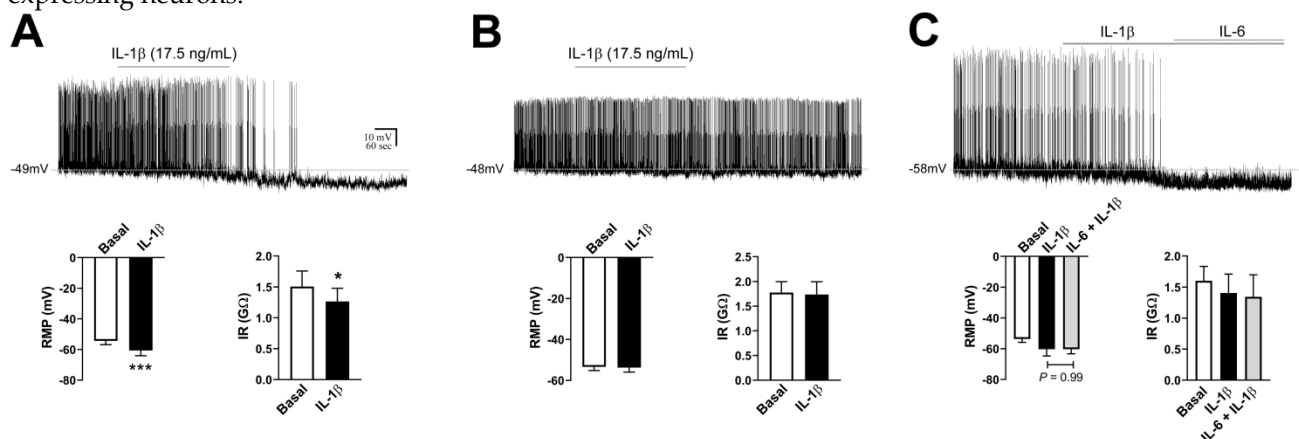


Figure 3. Interleukin-1 β (IL-1 β) inhibits the activity of AgRP neurons. (A). Acute effects of IL-1 β on the resting membrane potential (RMP) and input resistance (IR) of responsive AgRP neurons ($n = 8$). (B). RMP and IR of nonresponsive AgRP neurons ($n = 11$). (C). Combined effect of IL-6 and IL-1 β on the RMP and IR of responsive AgRP neurons ($n = 3$). In this last case, brain slices were initially treated with IL-1 β , followed by application of both IL-6 and IL-1 β . In all conditions, representative whole-cell patch-clamp recordings are shown. Dashed lines indicate baseline RMP. IL-1 β or IL-6 + IL-1 β were applied to the bath for approximately 5 min. * $p < 0.05$, *** $p = 0.0007$.

2.5. Characterization of Resting Biophysical Properties of ARH POMC Neurons

POMC-expressing cells were visualized in the ARH (Figure 4A) and in the nucleus of the solitary tract (data not shown), as previously demonstrated [31,32]. Differently than AgRP neurons, POMC-expressing cells are spread in the ARH, especially in the lateral part (Figure 4A). In total, 35 POMC neurons in the ARH were evaluated from 22 POMC-reporter mice. From the recorded cells, 31 POMC neurons were firing action potentials during the baseline period (88%), whereas four cells were quiescent. The mean RMP of active POMC neurons was -52.1 ± 0.8 mV (range from -42 mV to -61 mV) and the average resting IR was 1.7 ± 0.1 G Ω (range from 0.5 G Ω to 3.3 G Ω). In quiescent POMC neurons, the RMP was -53.5 ± 4.2 mV (-42 mV to -62 mV) and the average resting IR was 1.0 ± 0.2 G Ω (0.7 G Ω to 1.5 G Ω).

2.6. TNF- α Causes Mild Effects on the Activity of POMC Neurons

To determine the potential effect of TNF- α on the biophysical properties of POMC neurons in the ARH, 21 cells from 13 POMC-reporter mice were analyzed. Four quiescent neurons were unwittingly analyzed, whereas 17 POMC cells were active (81%) at the basal period. Regarding the active cells, 15 POMC neurons did not exhibit significant alterations in the RMP (-0.3 ± 0.4 mV) or IR ($+0.0 \pm 0.1$ G Ω) after TNF- α administration (Figure 4A). Of note, two POMC neurons from the same animal, but in different brain slices, exhibited a significant depolarization after TNF- α application and this effect was reversible during the washout period (Figure 4B). Due to the small number of POMC neurons that were responsive to TNF- α , no statistical analysis was performed. TNF- α did not produce significant changes in the RMP and IR of quiescent POMC neurons (Figure 4C).

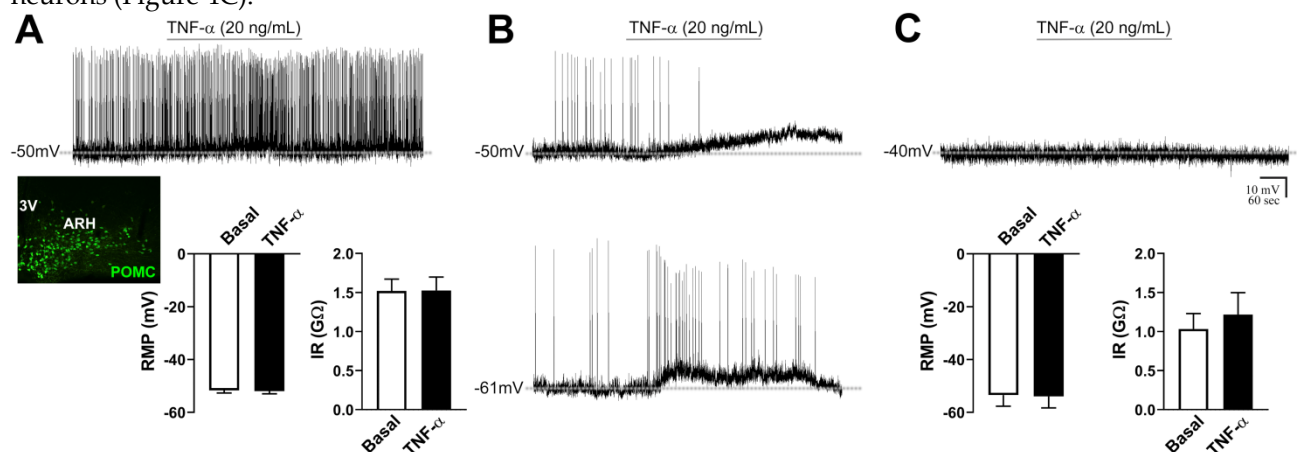


Figure 4. TNF- α causes mild effects on the activity of proopiomelanocortin (POMC) neurons in the arcuate nucleus. (A). Absence of changes in the resting membrane potential (RMP) and input resistance (IR) of nonresponsive POMC neurons that were active (firing action potentials) during baseline ($n = 15$). In inset shows POMC-expressing neurons in the lateral part of the arcuate nucleus (ARH). 3V = third ventricle. (B). Representative whole-cell patch-clamp recordings of two POMC neurons from the same animal that depolarized after TNF- α application. This effect was reversible during the washout period. (C). Absence of changes in

RMP and IR in quiescent POMC neurons ($n = 4$). Dashed lines indicate baseline RMP. TNF- α was applied to the bath for approximately 5 min.

2.7. IL-6 Causes No Acute Changes in the Activity of ARH POMC Neurons

The potential effects of an acute IL-6 administration were determined in 14 ARH POMC neurons from nine mice. In this case, all POMC neurons were firing action potentials during the basal recording period. Similar to the effects observed in AgRP neurons, we found that IL-6 did not acutely change the RMP (-0.1 ± 0.5 mV) or the IR (-0.1 ± 0.1 G Ω) of POMC neurons (Figure 5).

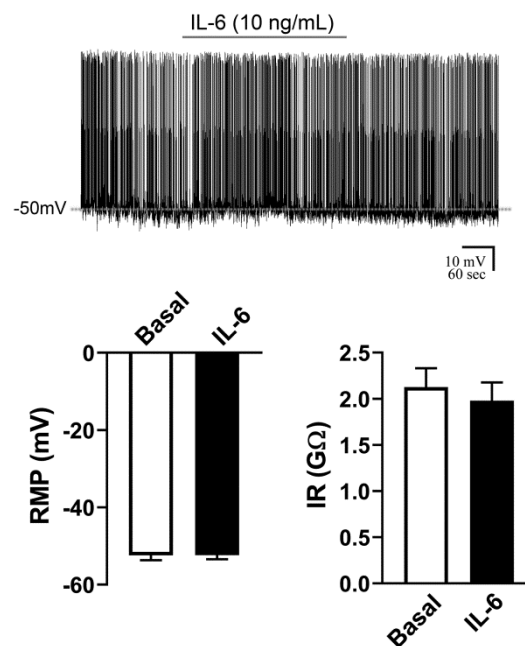


Figure 5. IL-6 causes no acute changes in the resting membrane potential (RMP) and input resistance (IR) of POMC neurons ($n = 14$) in the arcuate nucleus. All recorded POMC neurons were active at baseline. Dashed line indicates baseline RMP. IL-6 was applied to the bath for approximately 5 min.

3. Discussion

Inflammatory signals in the central nervous system can produce paradoxical effects on food intake and body weight. During nutrient excess, inflammatory factors in the hypothalamus favor obesity, whereas, in systemic and/or acute infection, these signals cause anorexia and weight loss [25]. To improve our understanding of how proinflammatory cytokines affect neural circuits involved in the central regulation of metabolism, we determined whether the membrane excitability of ARH AgRP/NPY and POMC neurons is acutely affected by TNF- α , IL-6, and IL-1 β . AgRP and POMC neurons were visualized by Cre-dependent reporter mice. Although developmental aspects may produce some false positive cells in these mouse models [33], the distribution of AgRP-reporter or POMC-reporter cells are in accordance with the known expression of these transcripts in the mouse brain [5,8,11,32]. Additionally, we have successfully used these mouse models in former histological and electrophysiological experiments [12,31,34,35].

Previous studies from our group employed whole-cell patch-clamp to determine possible changes in membrane excitability induced by different hormones/cytokines, including prolactin [36,37] and the growth hormone [34,38]. This method allows a precise determination whether the dominant hormonal action is stimulatory or inhibitory. However, a limitation of our experimental design is that we only evaluate acute cellular effects. In addition, the doses used are relatively high, even though they have been employed in previous *in vitro* studies

[28,39,40]. In this sense, our experiments likely reproduce what happens during a strong, acute systemic inflammation, such as sepsis [25], rather than the chronic low-grade inflammation observed in obesity [19,20,24]. Acute systemic inflammation is frequently followed by a sickness response, which, among other symptoms, causes anorexia, weight loss, and cachexia. Importantly, this inflammation-induced anorexia is driven by the action of cytokines in the central nervous system [25]. In this sense, our findings indicate that the acute effects of TNF- α and IL1- β on AgRP-producing neurons likely contributes to the inflammation-induced anorexia since both cytokines inhibit the activity of 35%–42% of AgRP neurons recorded. Of note, AgRP neurons induce hunger [6,9,10], so its inhibition is expected to decrease food intake and leads to weight loss. Another study also showed that either LPS or TNF- α blocks the activation of AgRP/NPY neurons by decreased glucose, which may alter glucose and energy homeostasis [41]. Additionally, our results highlight the importance of ARH AgRP-producing neurons as key targets of cytokines to produce the anorexic response for acute inflammatory signals.

TNF- α may also enhance satiety by increasing the activity of a subgroup of POMC neurons since a previous study found that TNF- α induces a slight membrane depolarization in spontaneously active POMC neurons (3 out of 10 cells analyzed) or in cells that received depolarizing current steps [42]. In our study, only two POMC neurons depolarized after TNF- α application and, interestingly, these cells were spontaneously active before TNF- α stimulus, which is in agreement with previous studies [42]. Taken together, the effect of TNF- α on the membrane excitability of ARH POMC neurons seems to be relatively lesser in comparison with the results observed in AgRP neurons. Nonetheless, the stimulatory effect of TNF- α on ARH POMC neurons is in accordance with *in vivo* data indicating that central TNF- α infusion inhibits food intake in rodents [43–46]. We did not evaluate the effects of IL-1 β on the activity of POMC neurons because a previous study already showed that intracerebroventricular infusion of IL-1 β induces Fos expression in ARH POMC neurons, and electrophysiological recordings demonstrated that IL-1 β increased the frequency of action potentials and the release of α -MSH of ARH POMC neurons [28]. Thus, our observation that IL-1 β causes an inhibitory effect in AgRP/NPY neurons is consistent with the well-known antagonistic role of POMC and AgRP/NPY neurons on feeding [14].

All TNF- α responsive cells were active (firing action potentials) before drug application, whereas no quiescent AgRP or POMC neuron was altered by this cytokine. Although the exclusive responsiveness of active cells may be coincidental, this response pattern likely has a biological significance. In this sense, TNF- α may act predominantly by blocking the feeding response induced by active AgRP-producing neurons, which are supposedly inducing the hunger feeling at that time. Another study also showed that LPS prevents the increase in food intake induced by AgRP neuronal activation [27].

TNF- α and IL1- β reduced the IR in AgRP-responsive neurons. IR is affected by the number of open ion channels in the cell membrane. The opening of ion channels decreases the membrane resistance. Thus, our findings suggest that TNF- α and IL1- β inhibit AgRP-producing neurons by increasing the number of ion channels opened. K⁺ or Cl⁻ channels are potential candidates to mediate the hyperpolarizing effect of TNF- α and IL1- β on AgRP neurons. However, since our extracellular solution contained 131.8 mM of Cl⁻ and the pipette solution contained 15 mM of Cl⁻, the equilibrium potential for Cl⁻ is expected to be ≈ -57 mV, which is close to the average RMP of responsive AgRP neurons (-52.5 ± 1.6 mV). On the other hand, the equilibrium potential for K⁺ is ≈ -101 mV. Thus, TNF- α and IL1- β likely altered potassium conductance, rather than chloride channels, to promote the hyperpolarizing effect observed in AgRP neurons.

IL-6 is a cytokine frequently released during inflammatory situations and the IL-6 receptor is expressed in the mouse ARH, including AgRP/NPY-producing and POMC-producing neurons [47]. However, the role of IL-6 in metabolism seems to be complex. Acute peripheral or central infusion of IL-6 does not affect food intake, even though IL-6 nocautes mice develop

late-onset obesity due to reduced energy expenditure [48]. IL-6 also does not inhibit food intake in chicks [49]. Thus, the absence of changes in the activity of AgRP and POMC neurons after IL-6 application is in accordance with the lack of IL-6 effects on feeding behavior. However, reduction in the biological activity of peripherally released IL-6 attenuates sickness behavior in rats [50]. Furthermore, intracerebroventricular co-infusion of IL-6 and IL-1 β in doses that do not affect food intake when administered individually causes anorexia [30]. Therefore, IL-6 is involved in the sickness response even though its capacity to affect neuronal circuits that control food intake may depend on the combined effects of other pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β . However, our findings indicate that the co-infusion of IL-6 did not affect the overall response induced by IL-1 β on the activity of AgRP neurons.

In conclusion, we demonstrated that TNF- α and IL-1 β induce an acute inhibition in the electrical activity of ARH AgRP-expressing cells. This inhibitory effect helps to explain the anorexia caused by acute inflammatory conditions and points out AgRP neurons as key downstream targets of inflammatory signals to affect metabolism, even though a minor effect on POMC neurons may also exist [28,42]. Our electrophysiological findings are in accordance with *in vivo* experiments showing that IL-6 alone is not sufficient to affect food intake. Taken together, our findings provide novel information that helps us understand the effects of proinflammatory cytokines in neuronal populations responsible for the regulation of food intake and energy homeostasis.

4. Materials and Methods

4.1. Mice

The experiments performed were previously approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (protocol number: 73/2017; approved on July 07, 2017). To visualize AgRP neurons, AgRP-Cre mice (Stock No: 012899; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) were bred with the Cre-inducible tdTomato-reporter mouse (Stock No: 007909, The Jackson Laboratory). To visualize POMC neurons, POMC-Cre mice (Stock No: 005965, The Jackson Laboratory) were bred with the Cre-inducible GFP-reporter mouse (Stock No: 004178, The Jackson Laboratory). AgRP-reporter and POMC-reporter mice were weaned at 3–4 weeks of age and genotyped via PCR using DNA extracted from the tail tip (REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit, Sigma, St. Louis, MO). Only male mice were used in the experiments. Mice were produced and maintained in standard conditions (with 12-h light/dark cycles) and received filtered water and regular rodent chow *ad libitum*.

4.2. Brain Histology

To demonstrate the distribution of AgRP or POMC neurons in the ARH, adult mice were anesthetized with isoflurane and perfused transcardially with saline, which was followed by a 10% buffered formalin solution. Brains were collected and post-fixed in the same fixative for 60 min and cryoprotected overnight at 4 °C in 0.1 M PBS containing 20% sucrose. Brains were cut in 30- μ m thick sections using a freezing microtome. In the histological experiment, a fluorescence reaction was performed to amplify GFP staining, as previously described [29]. No reactions were required to visualize the tdTomato reporter protein. Brain sections were mounted onto gelatin-coated slides and covered with Fluoromount G mounting medium (Electron Microscopic Sciences, Hatfield, PA). Photomicrographs were acquired with a Zeiss Axioimager A1 microscope (Zeiss, Munich, Germany).

4.3. Electrophysiology

To examine the acute effects induced by TNF- α , IL-6, or IL-1 β on the membrane excitability of AgRP and POMC neurons, whole-cell patch-clamp recordings were performed in hypothalamic slices of adult (8-week-old to 12-week-old) AgRP-reporter and POMC-reporter

male mice. Animals were decapitated, their brains were collected, and immediately submerged in ice-cold, carbogen-saturated (95% O₂ and 5% CO₂) artificial cerebrospinal fluid (aCSF, 124 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM glucose, and 2.5 mM CaCl₂). Coronal sections (250- μ m thick) from a hypothalamic block were cut with a vibratome (Leica Biosystems, model: VT1000S, Buffalo Grove, IL; RRID: SCR_016495) and then incubated in oxygenated aCSF at room temperature for at least 1 h before recording. Slices were transferred to the recording chamber and allowed to equilibrate for 10–20 min before the recording. The slices were bathed in oxygenated aCSF (30 °C) at a flow rate of 2 mL/min. In the current-clamp mode, neurons were recorded under zero current injection ($I = 0$). The pipette solution contained 120 mM K-gluconate, 1 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 3 mM KOH, and 4 mM (Mg)-ATP, pH 7.3. The input resistance was assessed by measuring the voltage deflection at the end of the response to a hyperpolarizing rectangular current pulse (500 ms of -10 to -30 pA). The resting membrane potential was monitored for at least 5 min (Basal), followed by the addition of mouse recombinant TNF- α (20 ng/mL, Sigma-Aldrich), mouse recombinant IL-6 (10 ng/mL, Sigma-Aldrich), or mouse recombinant IL-1 β (17.5 ng/mL, Abcam, Cambridge, UK) to the bath for approximately 5 min. The effects of TNF- α , IL-6, and IL-1 β on RMP were monitored for up to 15 minutes (washout period). Additionally, we determined whether the co-administration of IL-6 produces changes in the responses induced by IL-1 β on AgRP neurons. The membrane potential values were compensated to account for the junction potential (-8 mV). Only one cell was recorded in each brain slice.

4.4. Data Analysis

GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA; RRID: SCR_002798) was used for statistical analysis. The effects of the cytokines were evaluated by paired two-tailed Student's *t*-test. Results were expressed as a mean \pm standard error of the mean.

Author contributions: F.M.C. and N.S.M. performed the research. J.D.J. designed the research study. R.F. contributed with essential reagents and tools. F.M.C., N.S.M., and R.F. analyzed the data. J.D.J. wrote the paper. All authors revised and approved the final manuscript.

Funding: We thank Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP/Brazil, grants number: 17/02983-2 to J.D., 17/21840-8 to R.F., 17/22189-9 to N.S.M., 17/21854-9 to F.M.C. and 20/01318-8 to J.D.) for the financial support. J.D. is the investigator of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico (CNPq/Brazil).

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

References

1. Elmquist, J.K.; Elias, C.F.; Saper, C.B. From lesions to leptin: Hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* **1999**, *22*, 221–232.
2. Morgane, P.J. Distinct “feeding” and “hunger motivating” systems in the lateral hypothalamus of the rat. *Science* **1961**, *133*, 887–888.
3. Brobeck, J.R. Mechanisms of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol. Rev.* **1946**, *25*, 541–559.
4. Ramos-Lobo, A.M.; Donato, J., Jr. The role of leptin in health and disease. *Temperature* **2017**, *4*, 258–291.
5. Schwartz, M.W.; Woods, S.C.; Porte, D., Jr.; Seeley, R.J.; Baskin, D.G. Central nervous system control of food intake. *Nature* **2000**, *404*, 661–671.
6. Andermann, M.L.; Lowell, B.B. Toward a wiring diagram understanding of appetite control. *Neuron* **2017**, *95*, 757–778.

7. Campbell, J.N.; Macosko, E.Z.; Fenselau, H.; Pers, T.H.; Lyubetskaya, A.; Tenen, D.; Goldman, M.; Versteegen, A.M.; Resch, J.M.; McCarroll, S.A.; et al. A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nat. Neurosci.* **2017**, *20*, 484–496.
8. Hahn, T.M.; Breininger, J.F.; Baskin, D.G.; Schwartz, M.W. Coexpression of agrp and npy in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.* **1998**, *1*, 271–272.
9. Krashes, M.J.; Koda, S.; Ye, C.; Rogan, S.C.; Adams, A.C.; Cusher, D.S.; Maratos-Flier, E.; Roth, B.L.; Lowell, B.B. Rapid, reversible activation of agrp neurons drives feeding behavior in mice. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 1424–1428.
10. Aponte, Y.; Atasoy, D.; Sternson, S.M., Agrp neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 351–355.
11. Cowley, M.A.; Smart, J.L.; Rubinstein, M.; Cerdan, M.G.; Diano, S.; Horvath, T.L.; Cone, R.D.; Low, M.J. Leptin activates anorexigenic pomc neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* **2001**, *411*, 480–484.
12. Quaresma, P.G.F.; Teixeira, P.D.S.; Furigo, I.C.; Wasinski, F.; Couto, G.C.; Frazao, R.; List, E.O.; Kopchick, J.J.; Donato, J., Jr. Growth hormone/stat5 signaling in proopiomelanocortin neurons regulates glucoprivic hyperphagia. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *498*, 110574.
13. Krude, H.; Biebermann, H.; Luck, W.; Horn, R.; Brabant, G.; Gruters, A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by pomc mutations in humans. *Nat. Genet.* **1998**, *19*, 155–157.
14. Ollmann, M.M.; Wilson, B.D.; Yang, Y.K.; Kerns, J.A.; Chen, Y.; Gantz, I.; Barsh, G.S., Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* **1997**, *278*, 135–138.
15. Schaeffer, M.; Langlet, F.; Lafont, C.; Molino, F.; Hodson, D.J.; Roux, T.; Lamarque, L.; Verdie, P.; Bourrier, E.; Dehouck, B.; et al. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 1512–1517.
16. Holzwarth-McBride, M.A.; Hurst, E.M.; Knigge, K.M. Monosodium glutamate induced lesions of the arcuate nucleus. I. Endocrine deficiency and ultrastructure of the median eminence. *Anat. Rec.* **1976**, *186*, 185–205.
17. Hampl, R.; Bicikova, M.; Sosvorova, L. Hormones and the blood-brain barrier. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2015**, *21*, 159–164.
18. Olofsson, L.E.; Unger, E.K.; Cheung, C.C.; Xu, A.W. Modulation of agrp-neuronal function by socs3 as an initiating event in diet-induced hypothalamic leptin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E697–706.
19. Velloso, L.A.; Folli, F.; Saad, M.J. Tlr4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota, and metabolic inflammation. *Endocr. Rev.* **2015**, *36*, 245–271.
20. Thaler, J.P.; Yi, C.-X.; Schur, E.A.; Guyenet, S.J.; Hwang, B.H.; Dietrich, M.O.; Zhao, X.; Sarruf, D.A.; Izgur, V.; Maravilla, K.R.; et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 153–162.
21. Souza, G.F.; Solon, C.; Nascimento, L.F.; De-Lima-Junior, J.C.; Nogueira, G.; Moura, R.; Rocha, G.Z.; Fioravante, M.; Bobbo, V.; Morari, J.; et al. Defective regulation of pomc precedes hypothalamic inflammation in diet-induced obesity. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29290.
22. De Souza, C.T.; Araujo, E.P.; Bordin, S.; Ashimine, R.; Zollner, R.L.; Boschero, A.C.; Saad, M.J.; Velloso, L.A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* **2005**, *146*, 4192–4199.
23. Milanski, M.; Degasperis, G.; Coope, A.; Morari, J.; Denis, R.; Cintra, D.E.; Tsukumo, D.M.; Anhe, G.; Amaral, M.E.; Takahashi, H.K.; et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of tlr4 signaling in hypothalamus: Implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 359–370.
24. Johnson, A.M.; Olefsky, J.M. The origins and drivers of insulin resistance. *Cell* **2013**, *152*, 673–684.
25. Thaler, J.P.; Choi, S.J.; Schwartz, M.W.; Wisse, B.E. Hypothalamic inflammation and energy homeostasis: Resolving the paradox. *Front. Neuroendocrinol.* **2010**, *31*, 79–84.

26. Borges, B.C.; Garcia-Galiano, D.; Rorato, R.; Elias, L.L.; Elias, C.F. Pi3k p110beta subunit in leptin receptor expressing cells is required for the acute hypophagia induced by endotoxemia. *Mol. Metab.* **2016**, *5*, 379–391.
27. Liu, Y.; Huang, Y.; Liu, T.; Wu, H.; Cui, H.; Gautron, L. Lipopolysaccharide rapidly and completely suppresses agrp neuron-mediated food intake in male mice. *Endocrinology* **2016**, *157*, 2380–2392.
28. Scarlett, J.M.; Jobst, E.E.; Enriori, P.J.; Bowe, D.D.; Batra, A.K.; Grant, W.F.; Cowley, M.A.; Marks, D.L. Regulation of central melanocortin signaling by interleukin-1 beta. *Endocrinology* **2007**, *148*, 4217–4225.
29. Teixeira, P.D.S.; Wasinski, F.; Lima, L.B.; Frazao, R.; Bittencourt, J.C.; Donato, J., Jr. Regulation and neurochemical identity of melanin-concentrating hormone neurons in the preoptic area of lactating mice. *J. Neuroendocrinol.* **2020**, *32*, e12818.
30. Harden, L.M.; du Plessis, I.; Poole, S.; Laburn, H.P. Interleukin (il)-6 and il-1 beta act synergistically within the brain to induce sickness behavior and fever in rats. *Brain Behav. Immun.* **2008**, *22*, 838–849.
31. de Araujo, T.M.; Razolli, D.S.; Correa-da-Silva, F.; de Lima-Junior, J.C.; Gaspar, R.S.; Sidarta-Oliveira, D.; Victorio, S.C.; Donato, J., Jr.; Kim, Y.B.; Velloso, L.A. The partial inhibition of hypothalamic irx3 exacerbates obesity. *EBioMedicine* **2019**, *39*, 448–460.
32. Huo, L.; Grill, H.J.; Bjorbaek, C. Divergent regulation of proopiomelanocortin neurons by leptin in the nucleus of the solitary tract and in the arcuate hypothalamic nucleus. *Diabetes* **2006**, *55*, 567–573.
33. Padilla, S.L.; Carmody, J.S.; Zeltser, L.M. Pomc-expressing progenitors give rise to antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 403–405.
34. Furigo, I.C.; Teixeira, P.D.S.; de Souza, G.O.; Couto, G.C.L.; Romero, G.G.; Perello, M.; Frazao, R.; Elias, L.L.; Metzger, M.; List, E.O.; et al., Growth hormone regulates neuroendocrine responses to weight loss via agrp neurons. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 662.
35. Teixeira, P.D.S.; Couto, G.C.; Furigo, I.C.; List, E.O.; Kopchick, J.J.; Donato, J., Jr. Central growth hormone action regulates metabolism during pregnancy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2019**, *317*, E925–E940.
36. Buonfiglio, D.C.; Ramos-Lobo, A.M.; Silveira, M.A.; Furigo, I.C.; Hennighausen, L.; Frazao, R.; Donato, J., Jr. Neuronal stat5 signaling is required for maintaining lactation but not for postpartum maternal behaviors in mice. *Horm. Behav.* **2015**, *71*, 60–68.
37. Silveira, M.A.; Furigo, I.C.; Zampieri, T.T.; Bohlen, T.M.; de Paula, D.G.; Franci, C.R.; Donato, J., Jr.; Frazao, R. Stat5 signaling in kisspeptin cells regulates the timing of puberty. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2017**, *448*, 55–65.
38. Silveira, M.A.; Zampieri, T.T.; Furigo, I.C.; Abdulkader, F.; Donato, J., Jr.; Frazao, R. Acute effects of somatomammotropin hormones on neuronal components of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Brain Res.* **2019**, *1714*, 210–217.
39. Katafuchi, T.; Motomura, K.; Baba, S.; Ota, K.; Hori, T. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and -beta on rat ventromedial hypothalamic neurons in vitro. *Am. J. Physiol.* **1997**, *272*, R1966–1971.
40. Trujillo, M.E.; Sullivan, S.; Harten, I.; Schneider, S.H.; Greenberg, A.S.; Fried, S.K. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 5577–5582.
41. Hao, L.; Sheng, Z.; Potian, J.; Deak, A.; Rohowsky-Kochan, C.; Routh, V.H. Lipopolysaccharide (lps) and tumor necrosis factor alpha (tnfalpa) blunt the response of neuropeptide y/agouti-related peptide (npy/agrp) glucose inhibited (gi) neurons to decreased glucose. *Brain Res.* **2016**, *1648*, 181–192.
42. Yi, C.X.; Walter, M.; Gao, Y.; Pitra, S.; Legutko, B.; Kalin, S.; Layritz, C.; Garcia-Caceres, C.; Bielohuby, M.; Bidlingmaier, M.; et al. Tnfalpha drives mitochondrial stress in pomc neurons in obesity. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15143.
43. Plata-Salaman, C.R.; Oomura, Y.; Kai, Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: Suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res.* **1988**, *448*, 106–114.
44. Bodnar, R.J.; Pasternak, G.W.; Mann, P.E.; Paul, D.; Warren, R.; Donner, D.B. Mediation of anorexia by human recombinant tumor necrosis factor through a peripheral action in the rat. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 6280–6284.

45. Kapas, L.; Hong, L.; Cady, A.B.; Opp, M.R.; Postlethwaite, A.E.; Seyer, J.M.; Krueger, J.M. Somnogenic, pyrogenic, and anorectic activities of tumor necrosis factor-alpha and tnf-alpha fragments. *Am. J. Physiol.* **1992**, *263*, R708–715.
46. Plata-Salaman, C.R.; Vasselli, J.R.; Sonti, G. Differential responsiveness of obese (fa/fa) and lean (fa/fa) zucker rats to cytokine-induced anorexia. *Obes. Res.* **1997**, *5*, 36–42.
47. Schele, E.; Benrick, A.; Grahemo, L.; Egecioglu, E.; Anesten, F.; Palsdottir, V.; Jansson, J.O. Interrelation between interleukin (il)-1, il-6 and body fat regulating circuits of the hypothalamic arcuate nucleus. *J. Neuroendocrinol.* **2013**, *25*, 580–589.
48. Wallenius, V.; Wallenius, K.; Ahren, B.; Rudling, M.; Carlsten, H.; Dickson, S.L.; Ohlsson, C.; Jansson, J.O. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 75–79.
49. Tachibana, T.; Kodama, T.; Yamane, S.; Makino, R.; Khan, S.I.; Cline, M.A. Possible role of central interleukins on the anorexigenic effect of lipopolysaccharide in chicks. *Br. Poult. Sci.* **2017**, *58*, 305–311.
50. Harden, L.M.; du Plessis, I.; Roth, J.; Loram, L.C.; Poole, S.; Laburn, H.P. Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (il)-6, brain il-1beta and prostanoids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Psychoneuroendocrinology* **2011**, *36*, 608–622.

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

15 ANEXO 2: Resultados extras

15.1 Deleção do GHR nas células SST

Os resultados abaixo foram produzidos por uma equipe do laboratório em função de contribuir com outros projetos, visto que a deleção do GHR em células que expressam SST complementa os dados gerados neste e em outros estudos do próprio laboratório.

15.1.1 Composição corporal e consumo alimentar

O peso dos camundongos machos e fêmeas foram acompanhados por 20 semanas e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle (GHR) e aqueles que carregam deleção do GHR nas células que expressam SST (camundongos GHR/SST) (Figuras 30A e 31A). Além disso, análises da composição corporal também mostraram não haver diferenças na massa gorda (Figuras 30B e 31B) ou na massa magra (Figuras 31C e 31C) entre os grupos, tanto nos machos (Figura 30), quanto nas fêmeas (Figura 31). Ainda, o consumo de ração foi avaliado no período de uma semana, e não observamos diferenças no consumo alimentar entre os grupos GHR versus GHR/SST nos machos e nas fêmeas (Figuras 30D e 31D).

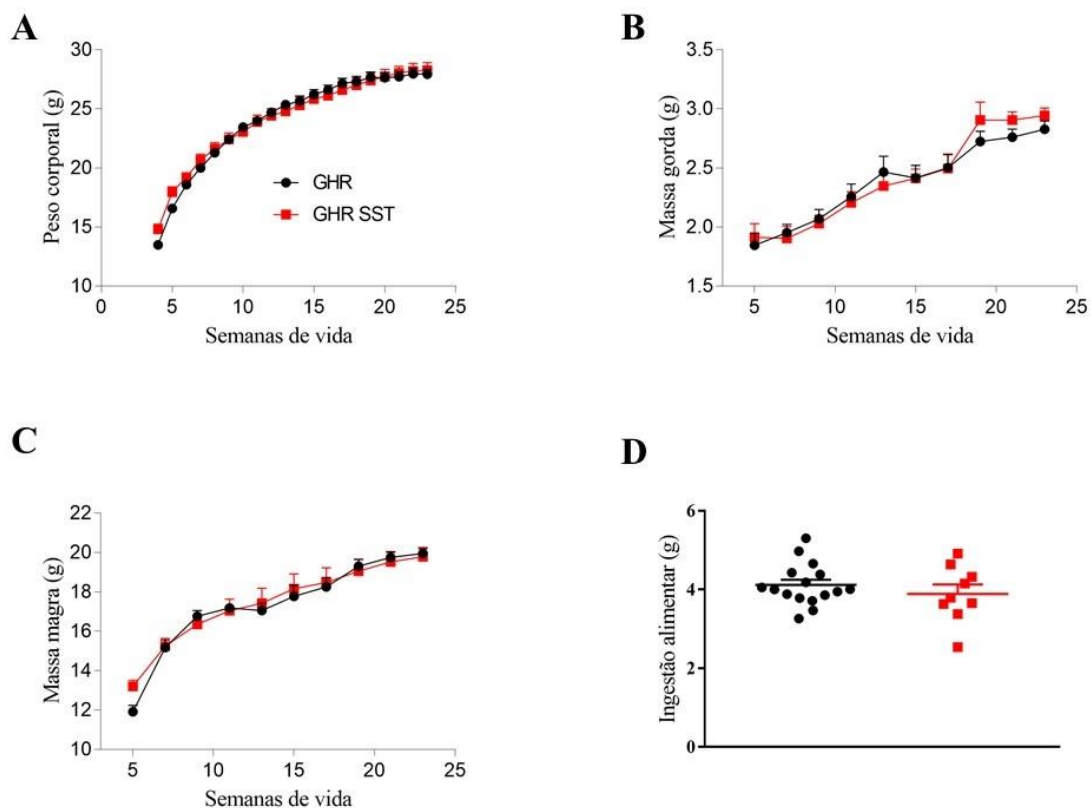


Figura 30: Avaliação de peso e composição corporal de animais machos. (A) Peso corporal em gramas (n=18 para controles e n=11 para nocautes). (B) Massa gorda em gramas (n=18 para controles e n=11 para nocautes). (C) Massa magra em gramas (n=18 para controles e n=11 para nocautes). (D) Ingestão alimentar em 5 dias em gramas (n=16 para controles e n=9 para nocautes), Machos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Dados produzidos pelo Doutores João A.B. Pedroso e Paula G.F. Quaresma.

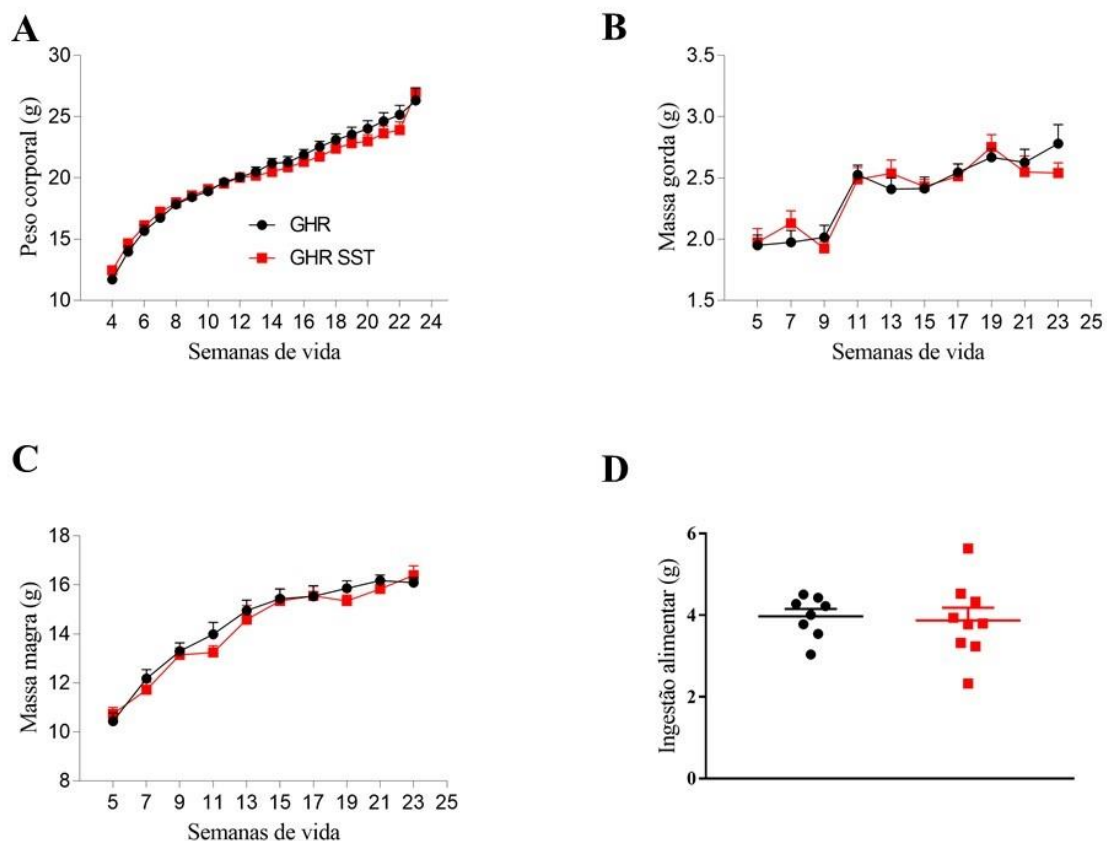


Figura 31: Avaliação de peso e composição corporal de animais fêmeas. (A) Peso corporal em gramas (n=14 para controles e n=11 para nocautes). (B) Massa gorda em gramas (n=14 para controles e n=11 para nocautes). (C) Massa magra em gramas (n=14 para controles e n=11 para nocautes). (D) Ingestão alimentar em 5 dias em gramas (n=8 para controles e n=9 para nocautes), Fêmeas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Dados produzidos pelo Doutores João A.B. Pedroso e Paula G.F. Quaresma.

15.1.2 Homeostase glicêmica

Os animais foram submetidos às análises da homeostase glicêmica. Neste modelo também não encontramos diferenças significativas entre os grupos no teste de tolerância a glicose, no teste da resposta contra regulatória a hipoglicemia induzida pela injeção de 2DG e no teste de sensibilidade à insulina, tanto nos machos (Figuras 32 A-C) quanto nas fêmeas (Figuras 33 A-C).

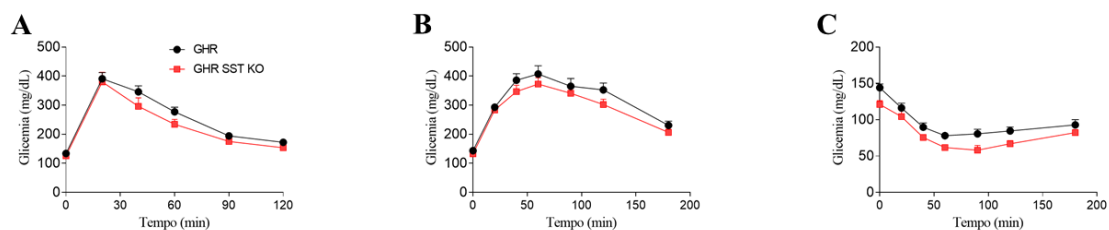


Figura 32: Análise de homeostase glicêmica de animais Machos. (A) Teste de tolerância à glicose (GTT) (n=14 para controles e n=9 para nocautes). (B) Teste da resposta contra regulatória a hipoglicemia à 2-deoxiglicose (2DG) (n=13 para controles e n=8 para nocautes). (C) Teste de sensibilidade a insulina (ITT) em porcentagem (n=13 para controles e n=7 para nocautes), Machos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Dados produzidos pela Doutora Paula G.F. Quaresma.

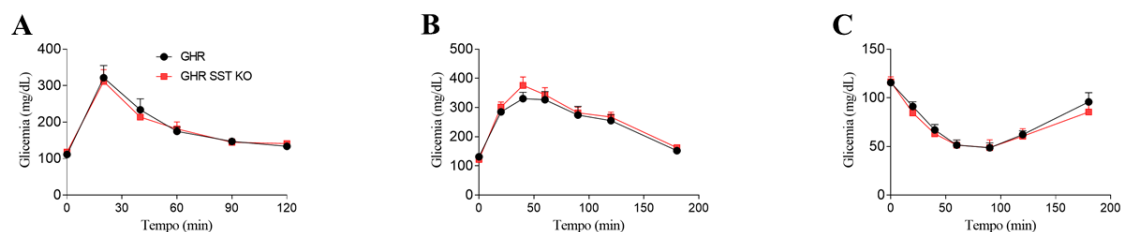


Figura 33: Análise de homeostase glicêmica de animais Fêmeas. (A) Teste de tolerância à glicose (GTT) (n=7 para controles e n=8 para nocautes). (B) Teste da resposta contra regulatória a hipoglicemia à 2-deoxiglicose (2DG) (n=6 para controles e n=8 para nocautes). (C) Teste de sensibilidade a insulina (ITT) em porcentagem (n=7 para controles e n=5 para nocautes), Fêmeas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Dados produzidos pela Doutora Paula G.F. Quaresma.

15.1.3 Balanço Energético

Os animais foram submetidos a análises do balanço energético pelo sistema de calorimetria indireta. Não foram observadas diferenças significativas tanto no grupo de machos quanto no grupo de fêmeas nos parâmetros de consumo de oxigênio (VO_2), coeficiente respiratório (RER), ingestão hídrica e atividade ambulatoria (Figuras 34 A-D) e (Figura 35 A-D) respectivamente.

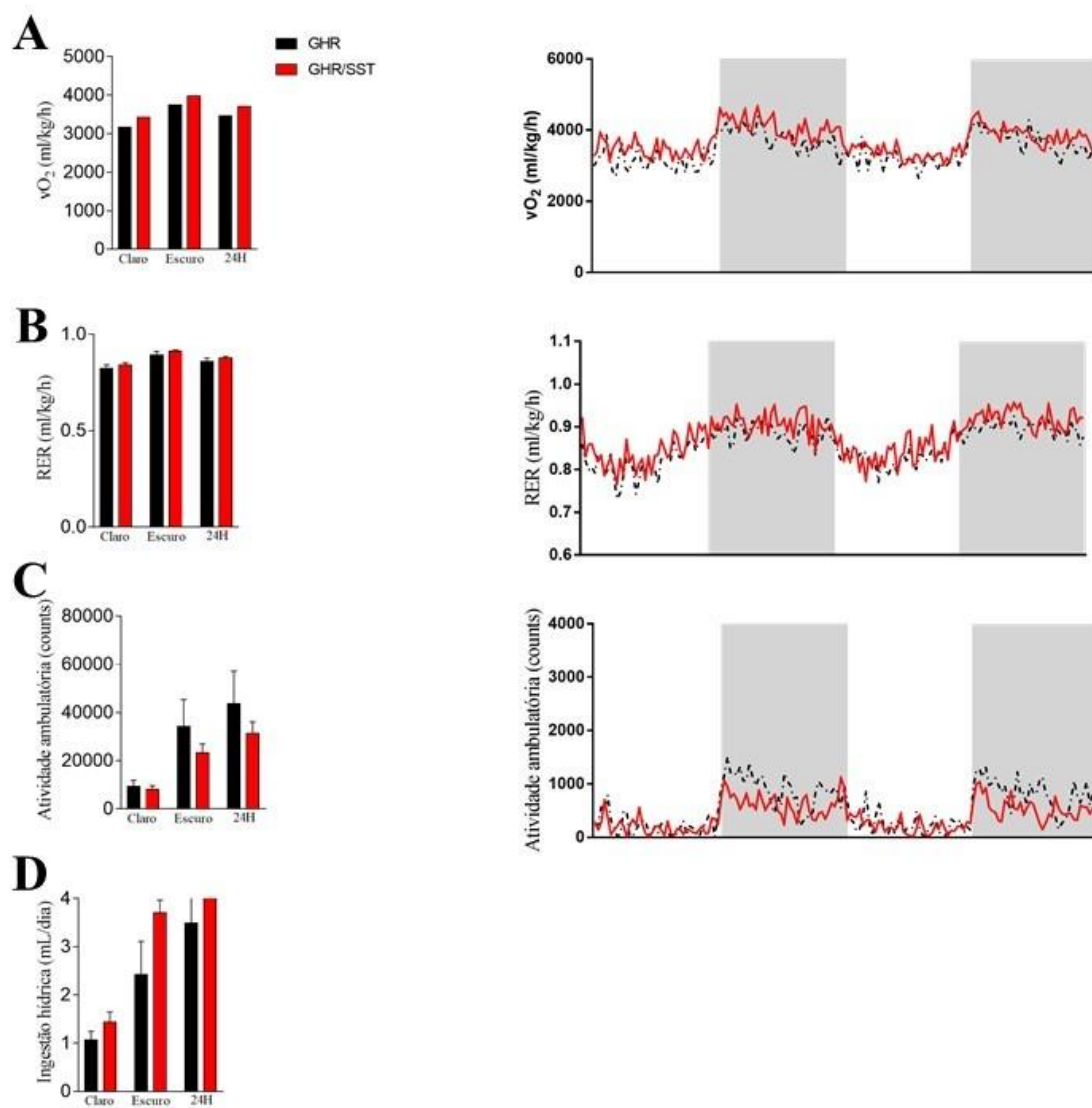


Figura 34: Análise do balanço energético de animais Machos. (A) Consumo de oxigênio (VO_2). (B) Coeficiente respiratório (RER). (C) Ingestão hídrica. (D) Atividade ambulatoria, (n=7 para controles e n=9 para nocautes), Machos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Dados produzidos pela aluna Fernanda Machado Chaves.

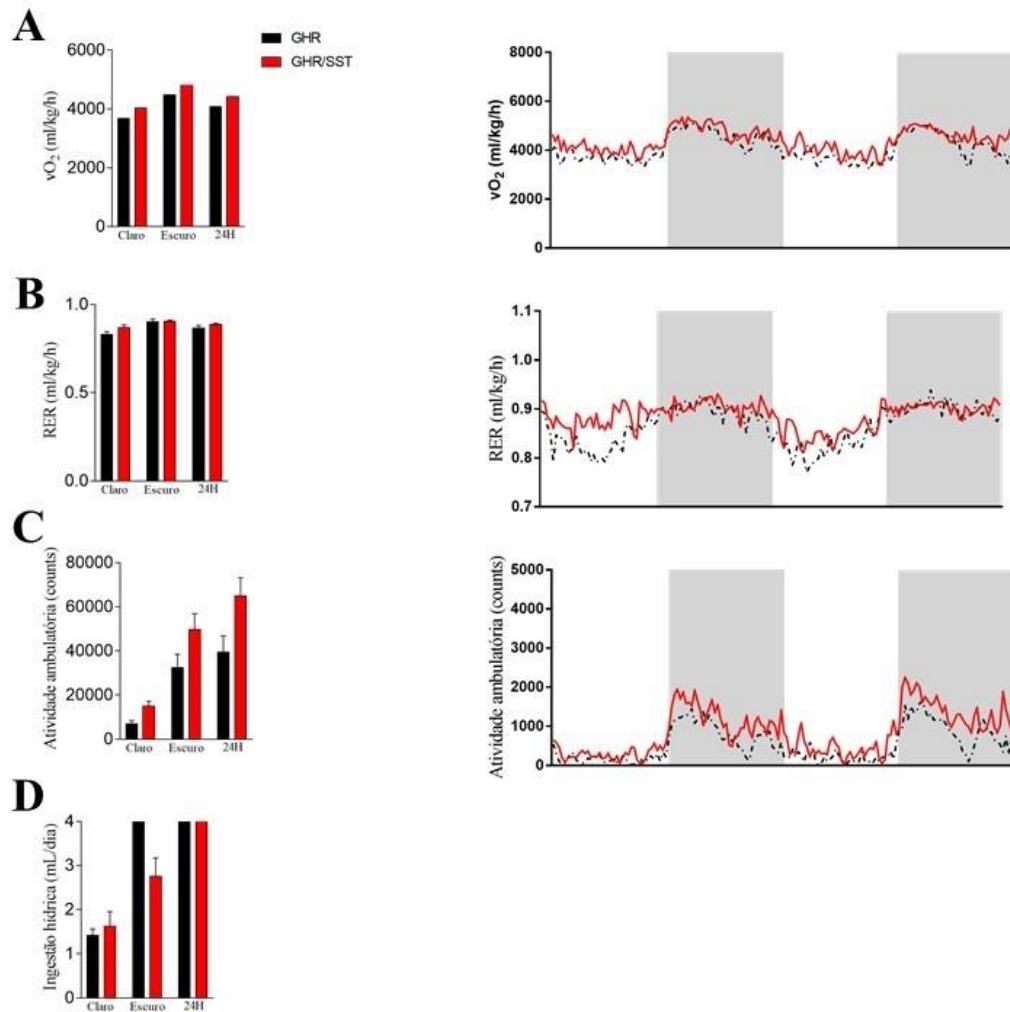


Figura 35: Análise do balanço energético de animais Fêmeas. (A) Consumo de oxigênio (VO_2). (B) Coeficiente respiratório (RER). (C) Ingestão hídrica. (D) Atividade ambulatória, (n=8 para controles e n=8 para nocautes), Fêmeas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Dados produzidos pela aluna Fernanda Machado Chaves.

15.1.4 Comprimento naso-anal e peso dos órgãos

Com relação crescimento corporal e tecidual, não foram observadas diferenças significativas entre os animais controle e os nocautes no comprimento naso-anal e no peso do encéfalo, fígado, músculo gastrocnêmio, coração, rim (machos e fêmeas) e gônada (somente nos machos) (Figuras 36 A-G e 37 A-F).

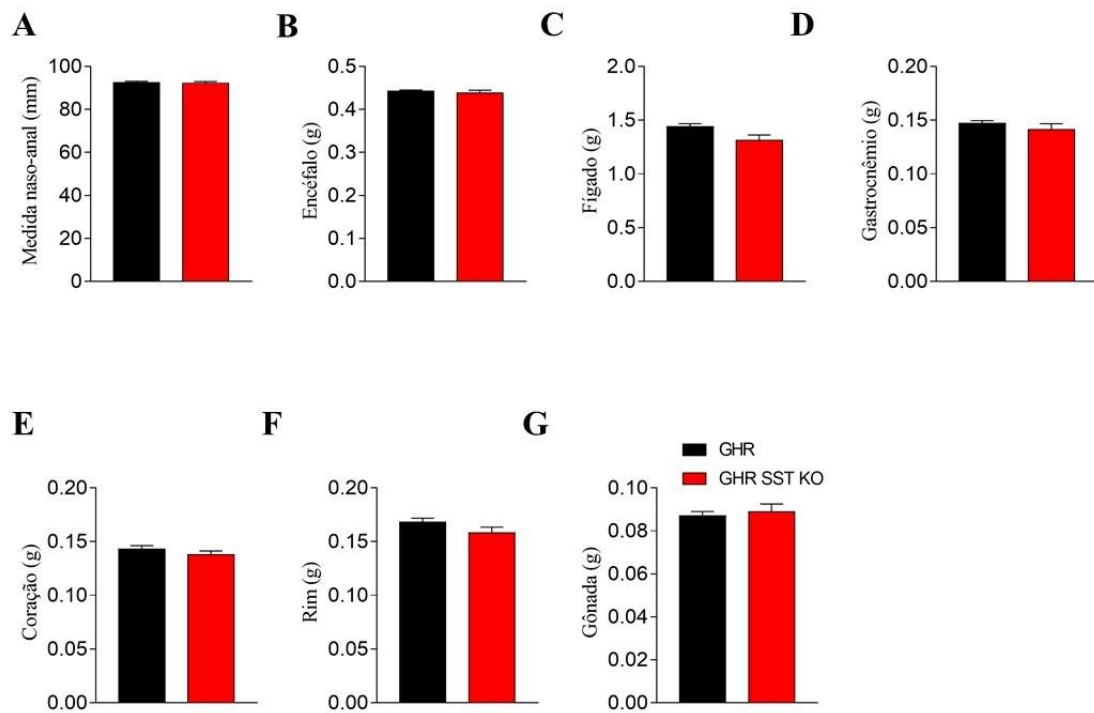


Figura 36: Comprimento naso-anal e peso dos órgãos Machos. (A) Medida naso-anal. (B) Peso do encéfalo. (C) Peso do fígado. (D) Peso do gastrocnêmio. (E) Peso do coração. (F) Peso do rim. (G) Peso da gônada. N=16 para controles e n=10 para nocautes. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Dados produzidos pela Doutora Paula G.F. Quaresma.

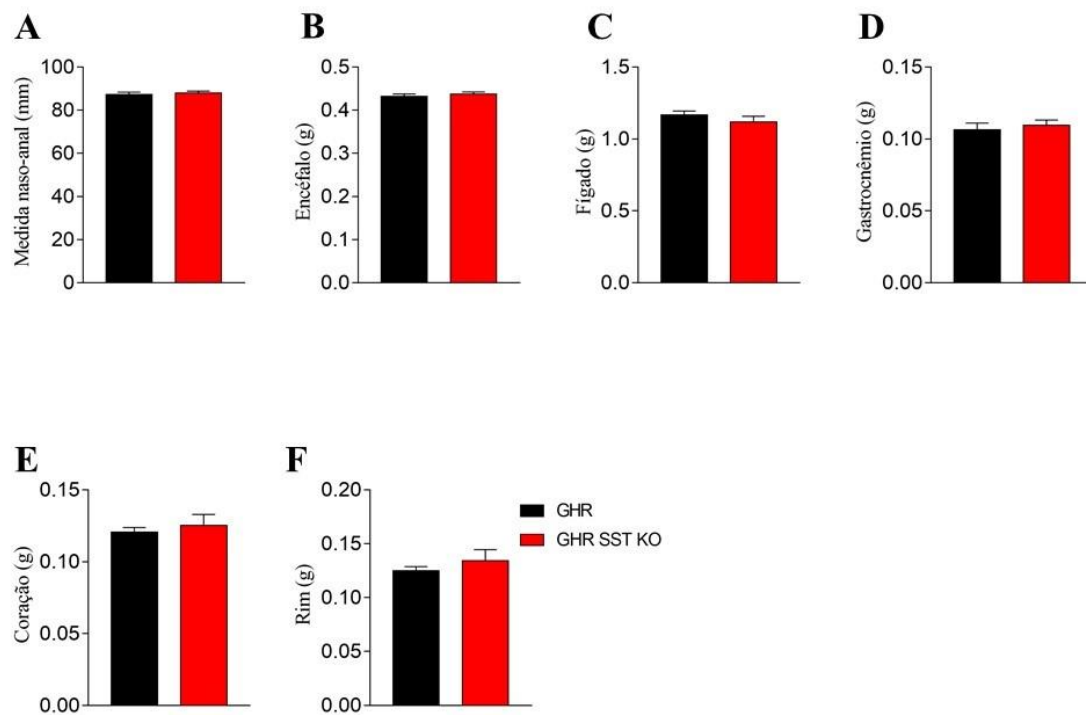


Figura 37: Comprimento naso-anal e peso dos órgãos Fêmeas. (A) Medida naso-anal. (B) Peso do encéfalo. (C) Peso do fígado. (D) Peso do gastrocnêmio. (E) Peso do coração. (F) Peso do rim. N=7 para controles e n=9 para nocautes. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Dados produzidos pela Doutora Paula G.F. Quaresma.

15.1.5 Avaliação do eixo somatotrófico

Neste modelo também não encontramos diferenças significativas entre os animais controle e GHR/SST nos machos e fêmeas ao avaliar a concentração sérica IGF-1 (Figuras 38 A e 39 A).

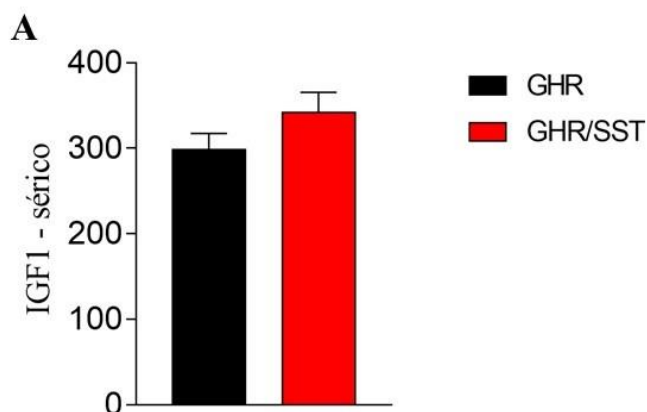


Figura 38: Secreção sérica de IGF-1 de animais Machos. (A) Secreção de IGF-1. N=6 para controles e n=8 para nocautes. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Dados produzidos pela aluna Fernanda Machado Chaves.

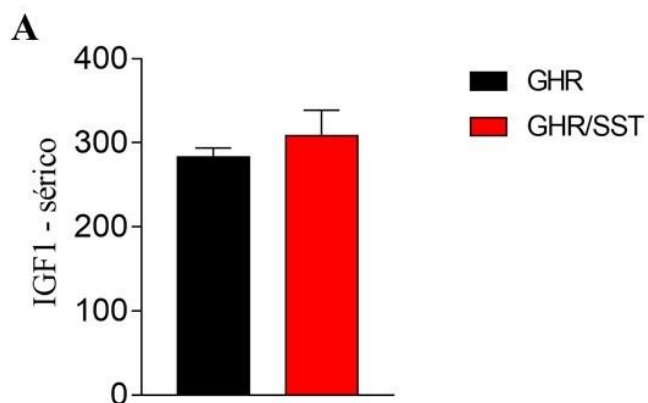


Figura 39: Secreção sérica de IGF-1 de animais Fêmeas. (A) Secreção de IGF-1. N=9 para controles e n=7 para nocautes. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Dados produzidos pela aluna Fernanda Machado Chaves.