

WILLIAN OLIVEIRA DOS SANTOS

Importância da sinalização do GH sobre neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos para o controle do balanço energético e homeostase glicêmica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2020

WILLIAN OLIVEIRA DOS SANTOS

Importância da sinalização do GH sobre neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos para o controle do balanço energético e homeostase glicêmica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). José Donato Junior

Versão corrigida.

São Paulo

2020

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)

dos Santos, Willian Oliveira

Importância da sinalização do GH sobre neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos para o controle do balanço energético e homeostase glicêmica / Willian Oliveira dos Santos; orientador José Donato Junior. -- São Paulo, 2020.

75 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Hipotálamo. 2. Neuroendocrinologia. 3. Hormônio do crescimento. 4. Metabolismo. 5. Neurotransmissores. I. Donato Junior, José , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Willian Oliveira dos Santos

Título da Dissertação/Tese: Importância da sinalização do GH sobre neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos para o controle do balanço energético e homeostase glicêmica.

Orientador: José Donato Junior

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/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:

Examinador(a): Assinatura:

Presidente: Assinatura:

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: *Pryscila Dryelle Sousa Teixeira, Isadora Clivatti Furigo (Pós-Doutorando), João Alfredo Bolívar Pedrosa (Pós-Doutorando), Frederick Wasinski (Pós-Doutorando), Gisele Cristina Colto, Ana Maria P Campo (Técnico de Laboratório), Renato Frazão (Pesquisador Colaborador), Leandro Bueno Lima (Pós-Doutorando), Tabata Bohlen, Lucas Brecht Palas dos Santos (Iniciação Científica), Igor Tomaz (Iniciação Científica), Gabriel Orefice de Souza (Iniciação Científica), Fernanda Machado (Pós-Graduando)*

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 Secretaria 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: *Pryscila Dryelle Sousa Teixeira, Isadora Clivatti Furigo (Postdoctoral Researcher), João Alfredo Bolívar Pedrosa (Postdoctoral Researcher), Frederick Wasinski (Postdoctoral Researcher), Gisele Cristina Colto, Ana Maria P Campo (Laboratory Technician), Renato Frazão (Collaborator Researcher), Leandro Bueno Lima (Postdoctoral Researcher), Tabata Bohlen, Lucas Brecht Palas 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 ^a | Macho/Male | até 8 meses/months | 170 (4) |
| Mus musculus | GHR-flox/Nestin-Cre ^c | Macho/Male | até 20 meses/months | 280 (6) |
| Mus musculus | db/db ^e | Macho/Male | até 8 meses/months | 30 (1) |
| Mus musculus | ob/ob ^a | Macho/Male | até 8 meses/months | 40 (1) |
| Mus musculus | lit/lit ^a | Macho/Male | até 8 meses/months | 30 (1) |



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Butantã, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 ICB III 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais Telefone (11) 3091-7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.30.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **73/2017/CEUA**, válido até 07/07/2021, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr(a) **José Donato Júnior**, do Departamento de **Fisiologia e Biofísica**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Willian Oliveira dos Santos** ao Projeto de Pesquisa "*Ação do hormônio do crescimento no sistema nervoso: relevância para as funções neurais e na doença*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 08 de março de 2018.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Dedico essa dissertação à minha **família**, que sempre esteve comigo nos bons e maus momentos. Me dando força e sempre tirando de mim um sorriso sincero.

Dedico também a **DEUS**, por não me deixar desistir mesmo quando duvidei de mim mesmo. Me trazendo conforto e paz nos momentos de angústia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Donato, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório. Sempre me incentivou e me conduziu pelos melhores caminhos. Obrigado pelos ensinamentos, pelas cobranças e por não desistir de mim nesse período de quarentena. Foi muito difícil terminar de escrever essa dissertação. Sem você, tenho certeza que não conseguiria.

Aos meus colegas de laboratório: João, Gisele, Fred, Paulinha, Gabis, Isa, Pry, Fernanda, Bodinho e Rudi. Que estiveram comigo nessa trajetória tão importante. Me ensinado, tirando dúvidas, contribuindo para que eu me tornasse um aluno melhor, uma pessoa melhor. Foram vocês que me incentivaram e fizeram com que tudo fosse mais fácil. Consegui chegar até aqui porque tive vocês ao meu lado. Por isso agradeço de coração.

À minha querida aninha, a primeira a me receber no laboratório e que logo conquistou meu coração. Seu carinho e atenção fez com que os momentos mais tensos virassem os mais divertidos. Estar com você é sentir o coração aquecido, é recarregar as baterias, a gente não ri, a gente da gargalhada! Obrigado por todo ensinamento, por estar sempre disponível para tirar dúvidas. Você fez toda a diferença nesses anos de lab.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço pelo suporte financeiro (Número do Processo: 88882.328140/2019-01).

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” (Martin Luther King).

DOS SANTOS, W O. **Importância da sinalização do GH sobre neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos para o controle do balanço energético e homeostase glicêmica**, 2020. 75 f. Dissertação (mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Grande número de publicações tem focado na caracterização dos neurônios que regulam o balanço energético. Nesse contexto, foi identificado que neurônios que expressam determinados neurotransmissores peptidérgicos são importantes reguladores do balanço energético e alvos de hormônios, como a leptina. Contudo, pouca atenção tem sido dada na identificação dos neurônios que regulam o metabolismo e expressam neurotransmissores clássicos, incluindo o ácido gama-aminobutírico (GABA) e o glutamato. Nosso grupo de pesquisa publicou um estudo demonstrando que vários núcleos encefálicos são responsivos ao hormônio do crescimento (GH). Porém, pouco se sabe sobre a identidade neuroquímica destes neurônios. O presente trabalho tem o objetivo de identificar quais neurônios responsivos ao GH são glutamatérgicos ou GABAérgicos e qual a importância de cada uma dessas populações neurais para os efeitos centrais do GH sobre o controle do balanço energético, crescimento corporal e homeostase glicêmica. Usando camundongos que expressam GFP em neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos determinamos as populações neuronais que são responsivas ao GH, por meio da identificação da fosforilação do STAT5 após injeção i.p. de GH. Encontramos diversas áreas com grande densidade de neurônios GABAérgicos (septo lateral, núcleo intersticial da estria terminal divisão medial anterior, núcleo central da amígdala e núcleo arqueado do hipotálamo tuberal) e glutamatérgicos (núcleo pré-óptico medial, núcleo periventricular, núcleo paraventricular do hipotálamo, área hipotalâmica lateral, núcleo ventromedial do hipotálamo, núcleo pré-mamilar ventral e área tegmental ventral) que são responsivos ao GH. Então, produzimos camundongos nocautes (KO) para o receptor de GH (GHR) apenas em neurônios glutamatérgicos (VGLUT2 positivos) ou GABAérgicos (VGAT positivos). Foi observado que fêmeas e machos VGAT GHR KO tiveram aumento de peso corporal e massa magra em relação aos animais controle, enquanto que os animais VGLUT2 GHR KO apresentaram diminuição. Os machos VGAT GHR KO apresentaram menor massa gorda que os animais VGLUT2 GHR KO. Os animais VGLUT2 GHR KO machos apresentaram maior

gasto energético e consumo alimentar que os animais VGAT GHR KO. Os animais VGLUT2 GHR KO apresentaram melhor tolerância à glicose e maior sensibilidade à insulina em comparação aos outros grupos, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Os animais VGAT GHR KO e VGLUT2 GHR KO machos apresentaram menor glicemia em relação ao grupo controle após glicopenia induzida por 2-deoxi-D-glicose. Tanto machos como fêmeas VGLUT2 GHR KO apresentaram diminuição na resposta hiperfágica à injeção de 2-deoxi-D-glicose. Após desafiar os animais à restrição de 40% do seu consumo habitual, os animais VGAT GHR KO fêmeas perderam mais peso corporal e massa magra que os VGLUT2 GHR KO, enquanto os machos VGLUT2 GHR KO perderam menos peso corporal e massa magra que os animais VGAT GHR KO e controle. Esses resultados permitiram identificar as populações neuronais e as funções do GH mediadas pelos neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos. Esses neurônios parecem desempenhar função complementar nos efeitos induzidos pela ação central do GH.

Palavras chaves: Hipotálamo. Neuroendocrinologia. Hormônio do crescimento. Metabolismo. Neurotransmissor.

DOS SANTOS, W O. **Importance of GH signaling on GABAergic and glutamatergic neurons for the control of energy balance and glycemic homeostasis**, 2020. 75 p. Dissertation (MD in Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A large number of publications focus on the characterization of neurons that regulate energy balance. In this context, it was identified that neurons that express peptide neurotransmitters are important regulators of energy balance and hormones, such as leptin. However, little attention has been paid to identifying neurons that regulate or metabolize and express classic neurotransmitters, including gamma-aminobutyric acid (GABA) and glutamate. Our research group published a demonstrative study of several brain nuclei responsible for growth hormone (GH). However, little is known about the neurochemical identity of these neurons. The present work aims to identify which neurons responsible for GH are glutamatergic or GABAergic and what is the importance of each of these neural consequences for the effects of GH on the control of energy balance, body growth and chemical homeostasis. Using mice expressing GFP in GABAergic and glutamatergic neurons determined as statistics of neurons that are responsive to GH, by identifying STAT5 phosphorylation after i.p. of GH. Several areas with high density of GABAergic neurons (lateral septum, bed nucleus of the stria terminalis, medial division, central nucleus of the amygdala and arcuate nucleus of the hypothalamus tuberal) and glutamatergic (medial preoptic nucleus, periventricular nucleus, paraventricular nucleus of the hypothalamus, lateral hypothalamic area, ventromedial nucleus of the hypothalamus, ventral premammary nucleus and ventral tegmental area) that are responsible for GH. It then produces knockout mice (KO) for the GH receptor (GHR) only on glutamatergic (VGLUT2 positive) or GABAergic (VGAT positive) neurons. It was observed that the VGAT GHR KO females and males had increased body weight and lean mass in relation to the control animals, while the VGLUT2 GHR KO animals decreased. VGAT GHR KO males had lower fat mass than VGLUT2 GHR KO animals. The male VGLUT2 GHR KO animals showed higher energy expenditure and food consumption than the VGAT GHR KO animals. The VGLUT2 GHR KO animals showed better glucose tolerance and greater insulin sensitivity compared to other groups, both in males and females. The animals VGAT GHR KO and VGLUT2 GHR KO reduce blood glucose in relation to the control group after

glycopenia induced by 2-deoxy-D-glucose. Both males and females VGLUT2 GHR KO decreased in the hyperphagic response to the injection of 2-deoxy-D-glucose. After challenging animals with a restriction of 40% of their usual consumption, VGAT GHR KO animals lose more body weight and lean mass than VGLUT2 GHR KO, while VGLUT2 GHR KO males lose less body weight and lean mass than VGAT GHR animals KO and control. These results allow the identification of neuronal changes and GH functions mediated by GABAergic and glutamatergic neurons. These neurons appear to use complementary functions in the effects induced by the central action of GH.

Keywords: Hypothalamus. Neuroendocrinology. Growing hormone. Metabolism. Neurotransmitter.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Distribuição dos neurônios GABAérgicos ou glutamatérgicos que são responsivos ao GH | 35 |
| Figura 1. Áreas hipotalâmicas responsivas ao GH, que apresentam neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos.. | 26 |
| Figura 2. Distribuição dos neurônios responsivos ao GH que são GABAérgicos (VGAT) na região septal e amígdala..... | 36 |
| Figura 3. Distribuição dos neurônios responsivos ao GH que são GABAérgicos (VGAT) na região do hipotálamo | 37 |
| Figura 4. Distribuição dos neurônios responsivos ao GH que são GABAérgicos (VGAT) na região do tronco encefálico | 38 |
| Figura 5. Distribuição dos neurônios responsivos ao GH que são glutamatérgicos (VGLUT2) na região septal e amígdala..... | 39 |
| Figura 6. Distribuição dos neurônios responsivos ao GH que são glutamatérgicos (VGLUT2) na região do hipotálamo | 40 |
| Figura 7. Distribuição dos neurônios responsivos ao GH que são glutamatérgicos (VGLUT2) na região do tronco encefálico..... | 41 |
| Figura 8. Avaliação do crescimento somático de fêmeas..... | 43 |
| Figura 9. Avaliação do peso dos órgãos de fêmeas..... | 44 |
| Figura 10. Avaliação da homeostase energética em fêmeas | 45 |
| Figura 11. Avaliação do crescimento somático de machos | 46 |
| Figura 12. Avaliação do peso de órgãos de machos..... | 47 |
| Figura 13. Avaliação da homeostase energética em machos..... | 48 |
| Figura 14. Avaliação da homeostase glicêmica em fêmeas | 49 |
| Figura 15. Avaliação da homeostase glicêmica em machos | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 16. Avaliação da homeostase glicêmica e consumo alimentar, frente ao teste de 2-deoxi-D-glicose em fêmeas | 51 |
| Figura 17. Avaliação da homeostase glicêmica e consumo alimentar, frente ao teste de 2-deoxi-D-glicose em machos..... | 52 |
| Figura 18. Avaliação metabólica durante restrição alimentar de 5 dias em fêmeas.... | 54 |
| Figura 19. Avaliação da ingestão alimentar durante realimentação de fêmeas | 55 |
| Figura 20. Avaliação metabólica durante a restrição alimentar de 5 dias em machos | 56 |
| Figura 21. Avaliação da ingestão alimentar durante realimentação de machos | 57 |

LISTA DE ABREVIATURA

2DG - droga 2-deoxi-D-glicose

AGL - ácidos graxos livres

AgRP - peptídeo relacionado a agouti

AMPA - receptores de alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ARC - núcleo arqueado do hipotálamo, caudal

ARH - núcleo arqueado do hipotálamo, tuberal

BSTam - núcleo intersticial da estria terminal, divisão medial anterior

BSTav - núcleo intersticial da estria terminal, divisão medial ventral

BSTpr - núcleo intersticial da estria terminal, parte principal

CART - transcrito regulado por cocaína e anfetamina

CEA - núcleo Central da Amígdala

DA - área hipotalâmica dorsal

DAT - transportador de dopamina

DBH - dopamina beta-hidroxilase

DMH - núcleo dorsomedial do hipotálamo

DMX - núcleo motor dorsal do vago

DNA - ácido desoxirribonucleico

DR - núcleo dorsal da rafe

DREADD - receptores artificiais ativados exclusivamente por drogas artificiais

GABA - ácido gama-aminobutírico

GAD - enzima glutamato descarboxilase

GFP - proteína fluorescente verde

GH - hormônio do crescimento

GHR - receptor de GH

GHRH - hormônio liberador de GH

GTT - teste de tolerância a glicose

i.p. - intraperitoneal

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IR – receptores de insulina

ITT - teste de tolerância à insulina

JAK2 - enzima Janus kinase 2

KPBS – tampão de fosfato de potássio

LC - locus coeruleus

LepR – receptor de leptina

LHA - área hipotalâmica lateral

LS - septo lateral

MC4R - receptorer de melanocortina-4

MEAav - núcleo medial da amígdala, parte anterior

MEApd - núcleo medial da amígdala, parte posterodorsal

MEPO - núcleo pré-óptico mediano

mGluR - receptores metabotrópicos para glutamato

MPA - área pré-óptica medial

MPN - núcleo pré-óptico medial

NDB - núcleo da banda diagonal

NMDA - receptores de N-metil-D-aspartato

NPY - neuropeptídeo Y

NTS - núcleo do trato solitário

PBS - salina tamponada com sódio

PCR - reação em cadeia da polimerase

pGH - hormônio do crescimento de porco

PMV - núcleo pré-mamilar ventral

POMC - pró-opiomelanocortina

pSTAT5 - transdutor de sinal e ativador da transcrição 5 fosforizado

PV - núcleo periventricular

PVH - núcleo paraventricular do hipotálamo

RCR – resposta contra regulatória

RER - coeficiente respiratório

SF1 - fator esteroideogênico 1

SNC - sistema nervoso central

SST - somatostatina

TH - tirosina hidroxilase

TU - núcleo tuberal

VCO₂ – dióxido de carbono produzido

VGAT – vesícula transportadora de GABA

VGLUT - vesícula transportadora de glutamato

VGLUT2 - vesícula transportadora de glutamato do tipo 2

VMH - núcleo ventromedial do hipotálamo

VO₂ - consumo de oxigênio

VTA - área tegmental ventral

α-MSH - hormônio melanócito-estimulante-alfa

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 <i>Neurotransmissores glutamato e GABA</i> | 20 |
| 1.2 <i>Hormônio do Crescimento</i> | 23 |
| 1.3 <i>Ação do GH no sistema nervoso</i> | 24 |
| 2 OBJETIVOS | 27 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 3.1 <i>Animais</i> | 28 |
| 3.2 <i>Desmame e genotipagem</i> | 28 |
| 3.3 <i>Identificação dos neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos que são responsivos ao GH</i> | 29 |
| 3.3.1 <i>Perfusão, microtomia e armazenamento</i> | 29 |
| 3.3.2 <i>Imunofluorescência</i> | 30 |
| 3.3.3 <i>Análise das co-localizações</i> | 30 |
| 3.4 <i>Experimentos para elucidar a importância fisiológica da sinalização do GH em neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos</i> | 31 |
| 3.4.1 <i>Balço energético e composição corporal</i> | 31 |
| 3.4.2 <i>Homeostase glicêmica</i> | 31 |
| 3.4.3 <i>Forma de análise dos resultados</i> | 33 |
| 4 RESULTADOS | 34 |
| 4.1 <i>Distribuição dos neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos responsivos ao GH</i> | 34 |
| 4.2 <i>Avaliação das consequências da deleção do GHR em neurônios GABAérgicos ou glutamatérgicos</i> | 42 |
| 5 DISCUSSÃO | 58 |
| 6 CONCLUSÃO | 64 |
| 7 REFERÊNCIAS | 65 |

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas que garantem o equilíbrio entre a ingestão de calorias e o gasto energético, na maioria das vezes são tremendamente precisos. Eles asseguram um nível adequado de energia para executar as funções fisiológicas (Sandoval *et al.*, 2008). Houve muito progresso na identificação da importância do hipotálamo e do tronco encefálico nos diversos mecanismos neurais em que o cérebro é informado sobre a quantidade de nutrientes ingeridos e estocados (Daniel Damiani, 2011). O hipotálamo desempenha o papel mais importante no controle do apetite. Os sinais provenientes do intestino, do tronco encefálico e outros sinais periféricos que atuam no controle da ingestão alimentar são processados pelo hipotálamo. Os núcleos hipotalâmicos arqueado (ARH), paraventricular (PVN), ventromedial (VMH), bem como a área hipotalâmica lateral (LHA) possuem a função de integrar as informações periféricas acerca dos estoques energéticos a fim de modular a ingestão alimentar e o gasto energético (Abdalla, 2017).

O núcleo arqueado apresenta duas subpopulações de neurônios que agem como sensores de primeira ordem para os sinais que chegam da periferia. Os neurônios que co-expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado a agouti (AgRP), bem como aqueles que expressam a pró-opiomelanocortina (POMC), são os principais reguladores centrais da homeostase energética. Os neurônios POMC produzem e secretam o hormônio melanócito-estimulante-alfa (α -MSH) e o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), que apresentam efeito anorexígeno, enquanto que os peptídeos secretados pelos neuronios NPY/AgRP promovem o consumo alimentar (efeito orexígeno) em animais, mesmo depois de saciados (Myers, 2008; Krashes *et al.*, 2011). Enquanto o α -MSH ativa os receptores de melanocortina-4 (MC4R) para prevenir o ganho de peso corporal, o AgRP age como antagonista endógeno e inibe o MC4R para promover ganho de peso corporal.

O principal hormônio que atua na regulação dessas vias é a leptina que é produzida e secretada pelos adipócitos. Sua principal função é enviar sinais para o hipotálamo referentes aos níveis de gordura estocada ou mudanças no tecido adiposo (Pan and Myers, 2018). A secreção de insulina pelas células β -pancreáticas aumenta proporcionalmente à glicemia. A leptina e a insulina atuam no sistema nervoso central (SNC) para diminuir a ingestão alimentar e promover o gasto

energético. Esses hormônios suprimem a atividade dos neurônios produtores de NPY e aumentam a atividade dos neurônios produtores de POMC (Sáinz *et al.*, 2015).

Interessantemente, muito destaque se deu na identificação dos neurônios que regulam o balanço energético e que expressam neurotransmissores peptidérgicos. Contudo, menos atenção tem sido dada na expressão de neurotransmissores clássicos pelos neurônios que regulam o balanço energético, incluindo o ácido gama-aminobutírico (GABA) e o glutamato.

1.1 Neurotransmissores glutamato e GABA

O glutamato é um dos neurotransmissores mais abundantes no sistema nervoso central (SNC). Ele está envolvido na maior parte das funções normais encefálicas, incluindo cognição, memória e aprendizado. O glutamato também possui grande importância no desenvolvimento do SNC, incluindo indução e eliminação de sinapses, migração celular, diferenciação e morte celular (Golan, 2013; Costanzo, 2014). Ele é sintetizado tanto por glutaminases, presentes nas mitocôndrias de neurônios pré-sinápticos, como por transaminação do α -cetoglutarato, intermediário do ciclo de Krebs (Nelson, 2014). Assim, parte da glicose metabolizada pelos neurônios também pode ser usada para síntese de glutamato. Após sua síntese, o glutamato é armazenado em vesícula sináptica por um trocador de prótons (VGLUT), podendo ser da isoforma 1, 2 ou 3 (VGLUT1, VGLUT2 e VGLUT3, respectivamente). O VGLUT1 é expressado no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo. Já o VGLUT2 é expresso no córtex cerebral, tálamo e é a principal isoforma encontrada no hipotálamo. O VGLUT3 é encontrado tanto na substância negra, como no núcleo da rafe, núcleo accumbens e córtex cerebral (Bai *et al.*, 2001; Fremeau *et al.*, 2002; Gras *et al.*, 2002; Herzog *et al.*, 2004). Como o VGLUT2 é expresso em grande quantidade no hipotálamo, ele tem sido um bom marcador de neurônios glutamatérgicos nessa região (Borgius *et al.*, 2010; Vong *et al.*, 2011).

A maior parte dos receptores para glutamato geram respostas excitatórias, mas também existem receptores que podem desencadear respostas inibitórias, como é o caso dos receptores metabotrópicos para glutamato (mGluR) acoplados a

proteína G inibitória. Este estímulo inibitório impede que o glutamato seja liberado na fenda sináptica (*Smolders et al., 2004; Windisch and Czachowski, 2018*). Os receptores para glutamato são divididos em subgrupos ionotrópicos (AMPA, cainato e NMDA) e metabotrópicos (mGluR). Os receptores ionotrópicos são compostos por múltiplas subunidades que, ao serem ativadas, permitem a entrada de íons sódio, potássio e algumas vezes cálcio através da membrana plasmática, gerando respostas sinápticas predominantemente excitatórias (despolarização) e rápidas. Já os receptores metabotrópicos são ligados a proteína G e, quando estimulados, ativam segundos mensageiros que regulam os fluxos iônicos de outros canais, provocando despolarização da membrana, exercendo estímulo excitatório quando acoplado a proteína G excitatória ou inibitória quando acoplado a proteína G inibitória (*Rang et al., 2012; Windisch and Czachowski, 2018*).

O GABA é outro neurotransmissor amplamente presente no SNC. Possui receptores na maioria das membranas celulares de neurônios e astrócitos (*Costanzo, 2014*). A maioria desses receptores geram sinais inibitórios que diminuem a excitabilidade neuronal por meio de vários mecanismos, influenciando muitos circuitos e funções neurais. Fármacos que modulam esses receptores afetam a reatividade e a atenção, a formação de memória, a ansiedade, o sono e o tônus muscular. Contudo, os receptores de GABA também podem gerar estímulos excitatórios. No desenvolvimento neonatal, os receptores GABA_A geram estímulos excitatórios que são importantes para o desenvolvimento neonatal e a formação de redes neurais no início da vida. Com o passar dos estágios do desenvolvimento, esses estímulos passam a ser inibitórios (*Ben-Ari, 2002; Owens and Kriegstein, 2002; Marty and Llano, 2005*).

A síntese de GABA é mediada pela enzima glutamato descarboxilase (GAD), que converte o glutamato em GABA nas terminações nervosas GABAérgicas (*Golan, 2013*). O GABA é armazenado em vesículas pré-sinápticas por um transportador específico, conhecido como VGAT. Em resposta a um potencial de ação, o GABA é liberado na fenda sináptica para promover sua ação, predominantemente inibitória (*Nelson, 2014*). Existem duas classes de receptores de GABA. Os receptores de GABA ionotrópicos (GABA_A e GABA_C) são proteínas de membrana com múltiplas subunidades que agem como canal iônico de cloreto. Assim, o neurotransmissor GABA se liga em seus receptores pós-sinápticos,

gerando influxo de cloreto e conseqüentemente hiperpolarização, reduzindo a probabilidade de que estímulos excitatórios possam iniciar potenciais de ação (*Rang et al., 2012*). Já os receptores de GABA metabotrópicos (GABA_b) são receptores acoplados a proteína G que interferem nas correntes iônicas neurais por meio de segundos mensageiros.

Apesar de ser muito melhor descrito o papel de neurotransmissores peptidérgicos no controle do balanço energético e ingestão alimentar, incluindo o α -MSH, NPY e AgRP, hoje em dia se reconhece a importância dos neurotransmissores clássicos na regulação dessas funções metabólicas. Nesse sentido, um estudo que teve grande repercussão na área do controle central do metabolismo induziu inativação do receptor de leptina em neurônios GABAérgicos ou glutamatérgicos, a fim de identificar quais dessas populações neuronais são importantes para os efeitos da leptina (*Vong et al., 2011*). Os pesquisadores encontraram que o efeito antiobesogênico da leptina é mediado predominantemente pelos neurônios GABAérgicos e que os neurônios glutamatérgicos possuem papel pouco relevante nesse processo. Enquanto que a falta do receptor de leptina nos neurônios GABAérgicos leva à obesidade mórbida e hiperfagia, a deleção do receptor de leptina nos neurônios glutamatérgicos teve poucos efeitos metabólicos (*Vong et al., 2011*).

Outro trabalho utilizou a estimulação aguda de neurônios AgRP por meio de receptores artificiais ativados exclusivamente por drogas artificiais (DREADD) para demonstrar que o neurotransmissor GABA é importante para induzir fome agudamente (*Krashes et al., 2013*). A leptina age em conjunto com o neurotransmissor GABA modulando a fome. Ela atua no aumento da liberação de GABA por neurônios pré-sinápticos, inibindo neurônios AgRP e suprimindo a fome. Após deleção de receptores GABA_a em neurônios AgRP, foi constatado aumento transitório na ingestão alimentar e peso corporal de camundongos, mas após 4 semanas esses sintomas desapareceram. Talvez aferências inibitórias e excitatórias estejam trabalhando juntas para modular as atividades dos neurônios AgRP (*Ghamari-Langroudi et al., 2018; Xu et al., 2018*). A administração de agonista de receptores GABA_a no núcleo dorsal da Rafe (DR) gera maior consumo alimentar, sugerindo que o aumento do tônus GABAérgico no DR pode induzir fome (*Nectow et al., 2017*).

Estudos recentes têm mostrado o papel dos neurônios glutamatérgicos na modulação do consumo alimentar, sugerindo que eles atuam regulando mecanismos que promovem a inibição do consumo alimentar. Parece que esses neurônios estimulam células anorexígenas do núcleo ARH e paraventricular (PVN). Também estimulam a liberação de α -MSH por neurônios POMC do ARH além de aumentar a liberação de α -MSH e promover sua ação em receptores MC4R do PVN (*Fenselau et al., 2017; Van Den Pol et al., 2019*).

1.2 Hormônio do Crescimento

O GH é produzido pela glândula hipófise anterior e quando liberado na circulação atua em seus tecidos alvos. A secreção do GH é regulada por dois hormônios hipotalâmicos: o hormônio liberador de GH (GHRH) com ação estimulatória e a somatostatina (SST) com ação inibitória na secreção de GH pela hipófise. Outros fatores que podem influenciar a secreção de GH são a grelina, estresse, hipoglicemia e alta concentração de aminoácidos circulantes agindo na estimulação e a glicose e ácidos graxos livres na inibição de sua secreção (*Hataya et al., 2001*).

O receptor de GH (GHR) é um receptor específico e faz parte da família dos receptores de citocinas. A transmissão do sinal do GHR ocorre mediante a ativação e fosforilação da enzima Janus kinase 2 (JAK2) e de resíduos do domínio intracelular do GHR, o que resulta em engajamento de diversas proteínas de sinalização intracelular, incluindo os transdutores de sinal e ativadores de transcrição - 5 (STAT-5) (*Herrington et al., 2000*). A JAK2 fosforila o STAT-5 que se dimeriza e migra para o núcleo, atuando como importante regulador da transcrição de múltiplos genes influenciados pelo GH, incluindo a regulação da expressão de fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1). O GH é o principal determinante no crescimento pós-natal. No fígado, o GH estimula a produção do IGF-1, que medeia importantes efeitos do GH em vários tecidos, inclusive sobre o crescimento (*Darnell et al., 1994; Liu et al., 1997; Aires, 2012*). No entanto, também é responsável pela mobilização de glicose e ácidos graxos como fontes de energia em períodos de jejum. Essa mobilização protege o organismo contra o catabolismo proteico (aminoácidos que serviriam de substrato na gliconeogênese para a produção de glicose) e também

disponibiliza glicose para ser usada pelo cérebro. Por meio do aumento da lipólise no jejum e da liberação de insulina e IGF-1 no período pós-prandial, o GH é capaz de aumentar a massa muscular por disponibilizar aminoácidos para o músculo (Møller and Jørgensen, 2009). O GH estimula a lipólise através da ativação da enzima lipase hormônio sensível, responsável pela quebra de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos, que resulta no influxo de ácidos graxos livres (AGL) para a circulação. O aumento de AGL pode induzir resistência à insulina e aumentar o nível de glicose circulante pôr meio da oxidação hepática de ácidos graxos (Kim and Park, 2017).

1.3 Ação do GH no sistema nervoso

Estudos anteriores já vêm estudando a potencial importância do GH no sistema nervoso central. Indivíduos com produção prejudicada de GH apresentam diversos sintomas neurológicos como depressão, problemas de percepção e alerta, problemas de interação social, diminuição do bem-estar e perda de memória e capacidades cognitivas (Bengtsson *et al.*, 1993; Nyberg, 2000; Sathivageeswaran *et al.*, 2007; Van Nieuwpoort and Drent, 2008). Além disso, a redução de secreção de GH que ocorre com a idade parece ser um fator que contribui para o declínio das funções cognitivas (Aberg *et al.*, 2006; Ashpole *et al.*, 2015). Estudos em humanos e ratos mostraram presença de GHR em áreas específicas do encéfalo, representando forte indício da atuação desse hormônio no SNC (Lai *et al.*, 1991; Zhai *et al.*, 1994; Le Grevès *et al.*, 2006).

Apesar dos estudos anteriores, ainda pouco se sabe sobre a importância da sinalização do GH sobre o sistema nervoso. Contudo, nosso grupo de pesquisa recentemente publicou um trabalho descrevendo os núcleos encefálicos que são responsivos ao GH (Furigo *et al.*, 2017). Nesse trabalho, camundongos receberam injeção sistêmica de GH, via injeção intraperitoneal, e os animais foram perfundidos 90 minutos depois. Posteriormente o encéfalo foi processado para identificação dos neurônios que expressavam a proteína STAT5 fosforilada, um indicador da ativação do GH. Assim, por meio da fosforilação do STAT5 (pSTAT5) foi possível identificar quais regiões eram responsivas ao GH. Notavelmente, foi encontrado grande número de núcleos hipotalâmicos envolvidos com a regulação do balanço energético que apresentavam células responsivas ao GH, incluindo o PVN (Figura 1A), o ARH

(Figura 1D), o VMH (Figuras 1A, D) e a LHA (Figura 1D). Neurônios que expressam receptores de leptina (LepRb) atuam na regulação da homeostase glicêmica e co-expressam GHR nos núcleos ARH, DMH e LHA (Cady *et al.*, 2017; Furigo *et al.*, 2017). A deleção do GHR nesses neurônios prejudica a capacidade da insulina em regular a produção de glicose hepática, suprimindo a produção de glicose independente da mudança dos níveis de IGF-1 ou GH circulantes. Porém, esses neurônios não interferem na regulação do consumo alimentar ou homeostase energética tanto em condições normais ou com administração de dieta hiperlipídica. Pode ser que nessas áreas o GH atua direta ou indiretamente facilitando a sinalização da insulina (Cady *et al.*, 2017). Recentemente foi descoberto uma nova função para o GH. Frente a uma situação de privação alimentar extrema, há aumento na concentração plasmática de GH, que por sua vez, age no cérebro, via neurônios AgRP, sinalizando a deficiência de energia, desencadeando respostas adaptativas para conservar energia (Furigo, Teixeira, *et al.*, 2019). Outro trabalho sugere que o GH age em conjunto com "hormônios gestacionais", regulando a homeostase energética e glicêmica durante a gravidez, assim, preparando o organismo materno para as demandas metabólicas da prole (Teixeira *et al.*, 2019). A inativação de STAT5 em neurônios AgRP levou ao aumento da adiposidade em camundongos fêmeas e parece ter papel parcial na regulação adaptativa do sistema neuroendócrino frente a restrição alimentar (Furigo *et al.*, 2020). A expressão de GHR em células que apresentam fator esteroideogênico 1 (SF1) é necessária para a regulação da resposta contra regulatória à hipoglicemia, possivelmente por meio da regulação do sistema parassimpático (Furigo, Teixeira, *et al.*, 2019). Ainda, existe evidências de uma possível ação do GH regulando a atividade dos neurônios do núcleo pré-mamilar ventral (PMv) e dos neurônios que expressam kisspeptina no núcleo periventricular anteroventral (Silveira *et al.*, 2019). O GH também age em neurônios POMC para regular o metabolismo, em particular a hiperfagia causada em situações de privação de glicose e também na regulação do nível de glicose sanguínea durante a restrição alimentar prolongada (Quaresma *et al.*, 2019). Em um trabalho recente, foi observado que interneurônios catecolaminérgicos são responsáveis por sentir mudanças nos níveis de GH e regular o eixo somatotrófico em camundongos. Esses neuronios são responsivos ao GH e expressam a enzima tirosina hidroxilase (TH), mas não expressam transportador de dopamina (DAT) ou dopamina beta-hidroxilase (DBH) (Wasinski *et al.*, 2020).

Porém, não se sabe se as células responsivas ao GH são glutamatérgicas (Figuras 1B, E) ou GABAérgicas (Figuras 1C, F). Nesse contexto, alguns dos núcleos que regulam o balanço energético e possuem células responsivas ao GH apresentam expressão predominante de glutamato (PVH e VMH), GABA (ARH) ou mista (LHA). Assim, o presente trabalho tem o objetivo de identificar quais neurônios responsivos ao GH são glutamatérgicos ou GABAérgicos e qual importância de cada uma dessas populações neurais para os efeitos centrais do GH sobre o controle do balanço energético e homeostase glicêmica.

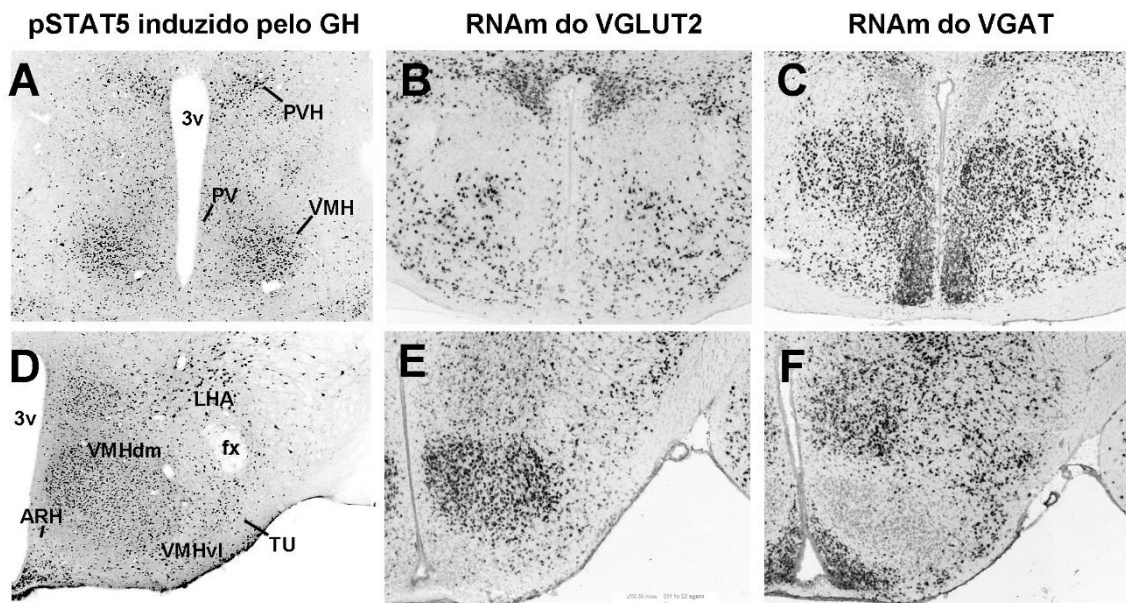


Figura 1. Áreas hipotalâmicas responsivas ao GH, que apresentam neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos. Fotomicrografias que mostram os neurônios responsivos ao GH (painéis A e D), a expressão do RNAm do VGLUT2 que indicam os neurônios glutamatérgicos (painéis B e E) e a expressão do RNAm do VGAT que indicam os neurônios GABAérgicos (painéis C e F). As fotomicrografias da distribuição dos neurônios responsivos ao GH foram extraídas do manuscrito Furigo et al. (2017), enquanto que as fotomicrografias que descrevem as áreas glutamatérgicas e GABAérgicas foram obtidas pelo site do Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org/>).

2 OBJETIVOS

Identificar quais populações neurais responsivas ao GH são compostas por células glutamatérgicas ou GABAérgicas e induzir inativação gênica do GHR nesses neurônios para investigar a importância dos neurônios glutamatérgicos ou GABAérgicos para os efeitos centrais do GH sobre o controle do crescimento corporal, balanço energético e homeostase glicêmica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo nº: 73/2017). Foi realizado o cruzamento de 4 diferentes linhagens de camundongos geneticamente modificados, a fim de conduzir os experimentos de interesse. Para estudar os neurônios que produzem o neurotransmissor GABA, foi utilizado o camundongo que expressa a enzima Cre, condicionada à expressão da vesícula sináptica que transporta GABA (VGAT). Visto que a vesícula sináptica de glutamato do tipo 2 (VGLUT2) tem sido utilizada como um marcador genético dos neurônios glutamatérgicos no hipotálamo (Vong *et al.*, 2011), foi utilizado o camundongo VGLUT2-Cre para estudar especificamente os neurônios glutamatérgicos. Ambos os modelos foram cruzados com o camundongo conhecido como GHR-flox, cujo gene do receptor do GH foi modificado e apresenta um par de sítios LoxP flanqueando o exon 4. Assim, pudemos inativar o GHR, tanto em neurônios GABAérgicos (VGAT-Cre/GHR^{flox/flox}), como em neurônios glutamatérgicos (VGLUT2-Cre/GHR^{flox/flox}). Os animais do grupo controle são os filhotes nascidos da mesma ninhada, mas que não apresentam expressão da Cre e apresentam o genótipo GHR^{flox/flox}. Ainda, nos estudos histológicos, os camundongos VGAT-Cre e VGLUT2-Cre foram cruzados com o camundongo que expressa um bloqueador de transcrição que impede a expressão da proteína GFP, mas cujo bloqueador pode ser removido a partir da atividade da enzima Cre recombinase. Assim, apenas os neurônios que expressam Cre irão apresentar a expressão de fluorescência verde em neurônios GABAérgicos ou glutamatérgicos, dependendo da linhagem utilizada. Os animais foram mantidos no biotério em condições ambientais padrão, com ciclo claro/escuro de 12h/12h, a temperatura de 21-23°C, com acesso *ad libitum* à água e ração de roedor padrão, exceto quando descrito.

3.2 Desmame e genotipagem

Os camundongos foram separados de suas progenitoras (desmamados) com aproximadamente 28 dias de vida e nesse momento tiveram um pedaço da cauda

coletado para análise genética, além de receberem uma marca na orelha para identificação permanente. Desse material, foi extraído o DNA, com o qual foram feitos ciclos de PCR utilizando-se primers específicos para a identificação das mutações GHR-flox, VGAT-Cre, VGLUT2-Cre ou GFP. Os produtos do PCR passaram por eletroforese em gel de agarose e o peso molecular das bandas de DNA geradas foi utilizado para determinar se o animal apresenta ou não a mutação.

3.3 Identificação dos neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos que são responsivos ao GH

Nesse experimento, adotamos uma estratégia já bem estabelecida em nosso laboratório (Furigo *et al.*, 2017), na qual injetamos por via intraperitoneal, GH extraído da hipófise de porcos (20 µg/g peso corporal), que é um agonista seletivo do GHR. Após 90 minutos, os animais foram perfundidos para análise histológica do encéfalo ($n = 3-4$ para cada linhagem). Avaliamos a capacidade da injeção com pGH de induzir fosforilação do STAT5 (pSTAT5) no encéfalo. Com o uso do camundongo repórter GFP, co-localizamos o pSTAT5 com GFP e assim determinamos quais neurônios responsivos ao GH são glutamatérgicos ou GABAérgicos. Para a realização deste experimento, utilizamos animais machos.

3.3.1 Perfusão, microtomia e armazenamento

Após a injeção de pGH, o camundongo foi anestesiado com isoflurano e perfundido transcardialmente com salina seguido por solução de formaldeído à 10% (150 a 200mL por camundongo). O encéfalo foi coletado e mantido no mesmo fixador por 45 minutos e depois colocado em solução de PBS contendo 20% de sacarose em pH 7,4 durante toda noite. Os encéfalos foram cortados (secções de 30 µm de espessura) em plano frontal usando micrótomo de congelamento. Foram coletadas 4 séries de tecido e armazenadas em solução anti-congelante à -20 °C.

3.3.2 Imunofluorescência

Os cortes encefálicos foram lavados em PBS de potássio a 0,02 M, pH 7,4 (KPBS), seguido de pré-tratamento em uma solução alcalina (pH > 13) contendo 1% de peróxido de hidrogênio e 1% de hidróxido de sódio durante 20 minutos. Após as lavagens em KPBS, os cortes foram incubados em solução a 0,3% de glicina e 0,03% de laurel sulfato durante 10 minutos. Em seguida, os cortes foram bloqueados em soro normal de burro a 3% durante 1 hora, seguido de incubação em anticorpos primários anti-pSTAT5^{tyr694} feito em coelho (1:1000; Cell Signaling; #9351) e anti-GFP feito em galinha (1:5000; Aves Laboratories) por 48 horas. Posteriormente, os cortes foram incubados em KPBS-T com os anticorpos secundários conjugados com AlexaFluor⁵⁹⁴ anti-IgG de coelho e AlexaFluor⁴⁸⁸ anti-IgG de galinha (1:500; Jackson Immunoresearch) por 90 minutos, seguido de lavagens em KPBS. Os cortes foram montados em lâminas revestidas com gelatina e cobertas com meio de montagem para fluorescência (Fluoromount G). As fotomicrografias foram tiradas com uma câmera Zeiss AxioCam HRc acoplada a um microscópio Zeiss AxioImager A1 (Zeiss, Munique, Alemanha).

3.3.3 Análise das co-localizações

Os núcleos foram analisados seguindo um critério qualitativo, conforme descrito em publicações de nosso grupo (*Furigo et al., 2014; Furigo et al., 2017*). Foram avaliados os núcleos que apresentaram co-localização de GFP e pSTAT5, ou seja, que possuíam células GABAérgicas ou glutamatérgicas e os que tinham neurônios responsivos ao GH. Essa classificação foi realizada por meio dos símbolos, onde ++++ significa muito alta densidade de células cobrindo toda a extensão do núcleo; +++ alta densidade de células cobrindo a maior parte do núcleo; ++ densidade moderada de células cobrindo apenas partes do núcleo; + baixa densidade de células cobrindo apenas partes do núcleo; - expressão muito baixa ou praticamente ausente.

3.4 Experimentos para elucidar a importância fisiológica da sinalização do GH em neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos.

3.4.1 Balanço energético e composição corporal

Tanto camundongos machos como fêmeas foram pesados uma vez por semana durante 20 semanas, para que definíssemos qual é a curva de crescimento desses animais. Também foi realizada a análise da composição corporal (massa magra e massa de gordura) nas semanas 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 de vida por meio de ressonância magnética, através da utilização do aparelho Minispec (Bruker). Ao completarem 20 semanas de vida, os animais foram individualizados e o consumo alimentar foi acompanhado diariamente durante 5 dias.

Calorimetria indireta

Utilizamos o aparelho de calorimetria indireta OXYMAX/CLAMS (Columbus Instruments) para avaliar o gasto energético dos animais. Esse é um aparelho que consiste em 8 caixas individuais de acrílico. Através de um sistema de sensores de gases, esse aparelho é capaz de medir o consumo de oxigênio (VO_2), produção de dióxido de carbono (VCO_2), e o coeficiente respiratório (RER; VCO_2/VO_2) de cada caixa do aparelho, em intervalos de 120 segundos de uma caixa para a outra, o que possibilita mensurar o gasto energético dos animais. Também, as caixas apresentam sensores que detectam o movimento dos animais por infravermelho, possibilitando assim a mensuração da atividade locomotora voluntária no período da experimentação. O Software de Coleta de Dados, controla todos os subsistemas e integra os dados em formato CSV para fácil avaliação e apresentação em tempo real. O arquivo de dados primário separa cada medida em tempo de resposta de leituras calorimétricas.

3.4.2 Homeostase glicêmica

Teste de tolerância a glicose (GTT)

Após jejum prévio de 4h, os animais sofreram uma incisão na cauda, onde a mesma foi pressionada até a saída de uma gota de sangue. Utilizando um glicosímetro, foi coletada a gota de sangue afim de avaliar a concentração de glicose

sanguínea (mg/dL) no ponto 0 (antes de começar o experimento). Logo após, os animais receberam injeção intraperitoneal de glicose (2g de glicose/kg de peso) e a glicemia dos animais foi aferida nos seguintes pontos: 20, 40, 60, 120 minutos, utilizando-se o glicosímetro.

Teste de tolerância a insulina (ITT)

O teste foi realizado da mesma maneira que o GTT, exceto que os animais receberam injeção intraperitoneal de insulina (1UI de insulina/kg de peso).

Teste de resposta contra regulatória após injeção de 2-deoxi-D-glicose

A resposta contra regulatória induzida por glicopenia foi determinada em animais que receberam injeção da droga 2-deoxi D-glicose (2DG). Esse teste consiste na injeção intraperitoneal (i.p.) de 2DG, na dose de 500 mg por quilo do animal. Os animais estavam de jejum prévio de 4 horas. A 2DG é um análogo da glicose e inibe competitivamente sua utilização pela célula. Dessa forma, como a sinalização da glicose fica prejudicada, o SNC reage como se o animal estivesse hipoglicêmico, produzindo uma resposta contra regulatória, a qual pode ser mensurada pelo aumento da glicemia do animal. Para tanto, foram feitas medições da glicemia utilizando um glicosímetro, ao qual foi fornecido uma gota de sangue da porção da cauda do animal nos tempos 0 (anterior à injeção de 2DG), 20, 40, 60, 90, 120 e 180 minutos após a injeção.

Teste do consumo alimentar induzido por 2-deoxi-D-glicose

Para avaliar se a administração de 2DG altera o comportamento alimentar, os camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de 2DG ou PBS (salina tamponada com sódio). Então oferecemos um *pellet* de ração previamente pesado. A seguir, esse mesmo *pellet* foi pesado após 4 horas, afim de identificar quanta ração os animais ingeriram no decorrer do experimento.

Restrição e realimentação

Camundongos, tanto nocautes quanto controles, foram desafiados a testes de restrição alimentar, onde foi fornecida durante 5 dias quantidade de ração equivalente a 40% do consumo alimentar normal dos animais, conforme protocolo presente na literatura (Zhao *et al.*, 2010; Furigo, Teixeira, *et al.*, 2019; Furigo *et al.*, 2020). A cada dia de experimento foi avaliado a composição corporal (massa gorda e massa magra), glicemia (com um glicosímetro) e o peso dos animais. Ao final do quinto dia de restrição, os animais receberam ração ad libitum previamente pesada e após 3 dias foram avaliados os seguintes parâmetros: consumo alimentar, composição corporal, peso e glicemia. Para o cálculo do consumo alimentar, foi feita a média dos 3 dias e normalizado pelo peso do animal.

Eutanásia dos animais

Os animais foram anestesiados com isoflurano e foi medido o comprimento naso-anal. Os animais foram então eutanasiados por decaptação. Foi coletado o sangue para obtenção do soro, afim de determinar a concentração sérica de GH, IGF-1, leptina e insulina (experimentos que serão realizados posteriormente para publicação dos resultados). Houve coleta de alguns órgãos (tecido adiposo perigonadal, fígado, músculo gastrocnêmio e hipotálamo). O fígado, rim e coração foram pesados com o suporte de uma balança de precisão (Dender instrument – APX 200) e os demais órgãos armazenados para posterior análises.

3.4.3 Forma de análise dos resultados

Para a análise estatística dos dados e preparação das figuras, utilizamos o programa GraphPad Prism. Os dados foram inicialmente avaliados conforme sua homogeneidade e distribuição normal, a partir dos testes de Bartlett e Brown-Forsythe. Nos casos onde os dados não apresentavam distribuição normal, foi utilizado os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunn. Para os dados paramétricos foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-hoc teste de Tukey ou do teste de ANOVA de duas vias, seguido do pós-hoc teste Newman-Keuls (ex: peso corporal, GTT e ITT) ou Bonferroni (ingestão

alimentar após injeção de 2DG) para comparação entre os dados dos animais deficientes do GHR em neurônios VGAT e VGLUT2 e o grupo controle. Os dados serão apresentados como média \pm erro padrão médio.

4 RESULTADOS

4.1 Distribuição dos neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos responsivos ao GH

A fim de identificarmos se os neurônios GABAérgicos são responsivos ao GH e quais áreas esses neurônios estão localizados, submetemos camundongos VGAT/GFP à injeção de GH, para induzir a via de sinalização do STAT5. Os neurônios marcados em verde são GABAérgicos, enquanto que a marcação em magenta indica a imunoreatividade ao STAT5 fosforilado (pSTAT5), um marcador que tem sido utilizado para detectar células responsivas ao GH, após injeção aguda desse hormônio (*Furigo, Teixeira, et al., 2019*). Possíveis sobreposições podem ser vistas em branco, muito embora a expressão de GFP se concentre no citoplasma, enquanto que a marcação do pSTAT5 é nuclear (Figuras 2-4). Conforme resumido na Tabela 1, na região septal e na amígdala a maioria dos neurônios GABAérgicos são responsivos ao GH, incluindo os núcleos do septo lateral (LS), o núcleo intersticial da estria terminal, divisão medial anterior (BSTam) e o núcleo central da amígdala (CEA) (Figura 2A, C e F). Já no núcleo da banda diagonal (NDB) e no núcleo intersticial da estria terminal, divisão medial ventral (BSTav), os neurônios GABAérgicos responsivos ao GH estão em menor quantidade (Figura 2B). O núcleo intersticial da estria terminal, parte principal (BSTpr) apresenta grande quantidade de neurônios responsivos ao GH, mas nem todas as células são GABAérgicas (Figura 2E). Tanto a parte pósterodorsal (MEApd) quanto a parte anterior (MEAav) do núcleo medial da amígdala apresentam muitas células GABAérgicas, mas poucas células são responsivas ao hormônio GH (Figura 2G-H).

Tabela 1. Distribuição dos neurônios GABAérgicos ou glutamatérgicos que são responsivos ao GH.

| Estrutura cerebral | Neurônios responsivos ao GH | Neurônios GABAérgicos | Co-localização de pSTAT5 e GFP | Neurônios Glutamatérgicos | Co-localização de pSTAT5 e GFP |
|---|-----------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Septo e amígdala | | | | | |
| Septo lateral (LS) | ++++ | ++++ | ++++ | - | - |
| Núcleo da banda diagonal (NDB) | ++++ | +++ | ++ | + | - |
| Núcleo intersticial da <i>estria terminal</i> , divisão medial anterior (BSTam) | ++++ | ++++ | ++++ | - | - |
| Núcleo intersticial da <i>estria terminal</i> , divisão medial ventral (BSTav) | ++++ | +++ | ++ | | |
| Núcleo intersticial da <i>estria terminal</i> , parte principal (BSTpr) | ++++ | +++ | +++ | - | - |
| Núcleo Central da Amígdala (CEA) | ++++ | ++++ | ++++ | - | - |
| Núcleo medial da amígdala, parte anterior (MEAav) | ++++ | +++ | - | ++ | - |
| Núcleo medial da amígdala, parte posterodorsal (MEApd) | +++ | ++++ | - | ++ | ++ |
| Hipotálamo | | | | | |
| Área pré-óptica medial (MPA) | +++ | +++ | ++ | ++ | - |
| Núcleo pré-óptico mediano (MEPO) | +++ | + | + | | |
| Núcleo pré-óptico medial (MPN) | +++ | ++ | + | +++ | +++ |
| Núcleo periventricular (PV) | ++++ | + | - | +++ | +++ |
| Núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH) | ++++ | - | - | ++++ | ++++ |
| Área hipotalâmica lateral (LHA) | +++ | +++ | - | +++ | +++ |
| Núcleo arqueado do hipotálamo, tuberal (ARH) | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | - |
| Núcleo arqueado do hipotálamo, caudal (ARC) | +++ | ++++ | +++ | | |
| Núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) | ++++ | - | - | ++++ | ++++ |
| Núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) | ++++ | +++ | +++ | +++ | + |
| Área hipotalâmica dorsal (DA) | +++ | ++ | + | | |
| Núcleo tuberal (TU) | ++++ | +++ | + | | |
| Núcleo pré-mamilar ventral (PMV) | ++++ | - | - | ++++ | ++++ |
| Mesencéfalo, ponte e bulbo | | | | | |
| Área tegmental ventral (VTA) | ++++ | - | - | +++ | +++ |
| Núcleo dorsal da rafe (DR) | +++ | ++ | + | ++ | + |
| Locus coeruleus (LC) | ++++ | - | - | - | - |
| Núcleo do trato solitário (NTS) | +++ | + | - | +++ | ++ |
| Núcleo motor dorsal do vago (DMX) | +++ | - | - | - | - |

++++, alta densidade de células cobrindo toda a extensão do núcleo; +++, alta densidade de células cobrindo a maior parte do núcleo; ++, densidade moderada de células cobrindo apenas partes do núcleo; +, baixa densidade de células cobrindo apenas partes do núcleo; -, expressão muito baixa ou praticamente ausente.

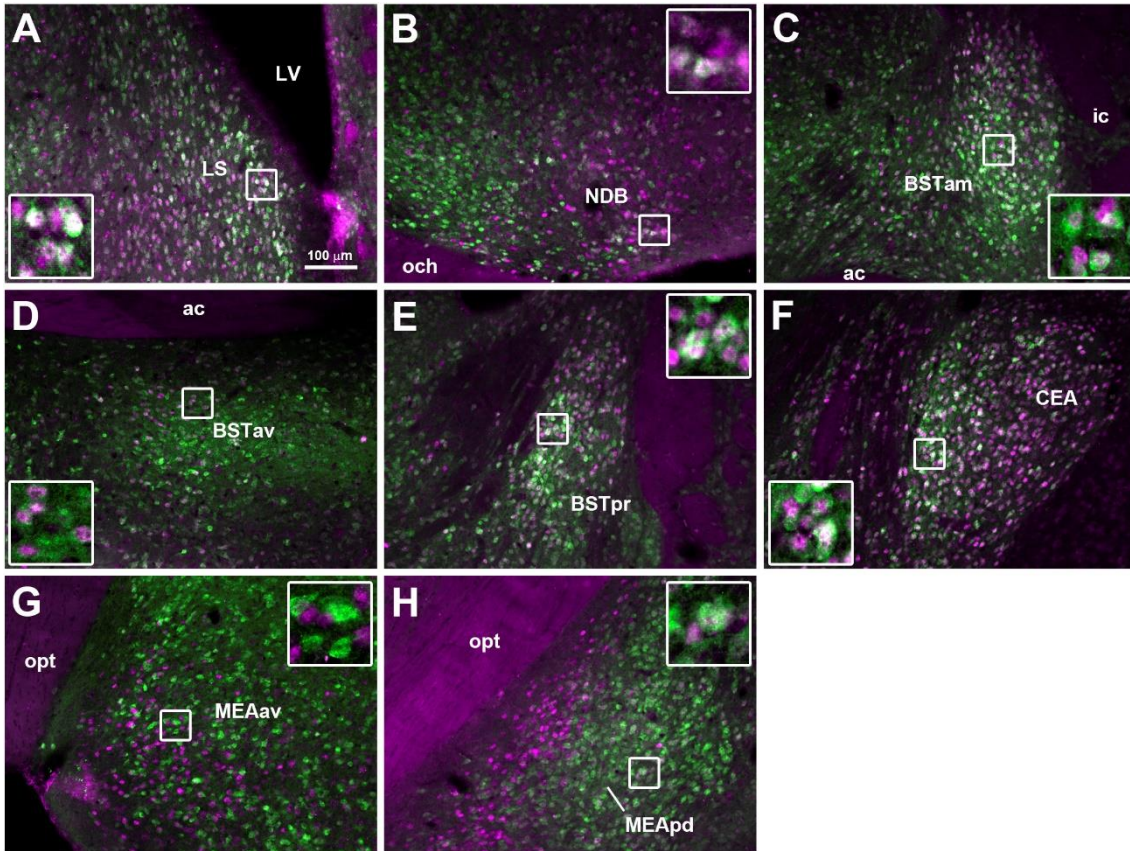


Figura 2. Distribuição dos neurônios responsivos ao GH que são GABAérgicos (VGAT) na região septal e amígdala. Distribuição dos neurônios responsivos ao GH que são GABAérgicos (VGAT) na região septal e amígdala. **A-H** Fotomicrografias de fluorescência ilustrando a co-expressão de pSTAT5 induzido por injeção de GH (marcação em magenta) em neurônios GABAérgicos (marcação em verde). Possíveis co-localizações podem ser visualizadas em branco, embora as marcações concentram-se em compartimentos celulares distintos.

Abrev.: **ac** comissura anterior, **BSTam** núcleo intersticial da estria terminal divisão medial anterior, **BSTav** núcleo intersticial da estria terminal divisão medial ventral, **BSTpr** núcleo intersticial da estria terminal, parte principal, **CEA** núcleo central da amígdala, **ic** colículo inferior, **LS** septo lateral parte ventral, **LV** ventrículo lateral, **MEAav** núcleo medial da amígdala parte anterior, **MEApd** núcleo medial da amígdala parte posterodorsal, **NDB** núcleo da banda diagonal, **och** quiasma óptico, **opt** trato óptico.

Em relação ao hipotálamo, onde concentra-se a maior parte das células responsivas ao GH no sistema nervoso, na área pré-óptica medial (MPA) boa parte dos neurônios são GABAérgicos, mas poucos responsivos ao GH, muito embora existam muitas células responsivas ao GH que não são GABAérgicas (Figura 3A). Grande parte dos neurônios do núcleo pré-óptico mediano (MEPO) e do núcleo pré-óptico medial (MPN) são responsivos ao GH, porém poucos são GABAérgicos (Figura 3B-C). Os núcleos paraventricular do hipotálamo (PVH), ventromedial (VMH) e pré-mamilar ventral (PMV) apresentam muitos neurônios responsivos ao GH, mas seus neurônios não são GABAérgicos (Figura 3E, G-I). O núcleo periventricular (PV) apresentou poucos neurônios GABAérgicos e muitas células responsivas ao GH

(Figura 3D). Os núcleos arqueado (ARH) e dorsomedial do hipotálamo (DMH) apresentam grande quantidade de neurônios GABAérgicos, dentre eles vários são responsivos ao GH, mas também apresentam neurônios responsivos ao GH que não são GABAérgicos (Figura 3G-H). A área hipotalâmica lateral (LHA) apresenta muitos neurônios responsivos ao GH e muitos neurônios GABAérgicos, mas nenhum deles se co-localizam (Figura 3F).

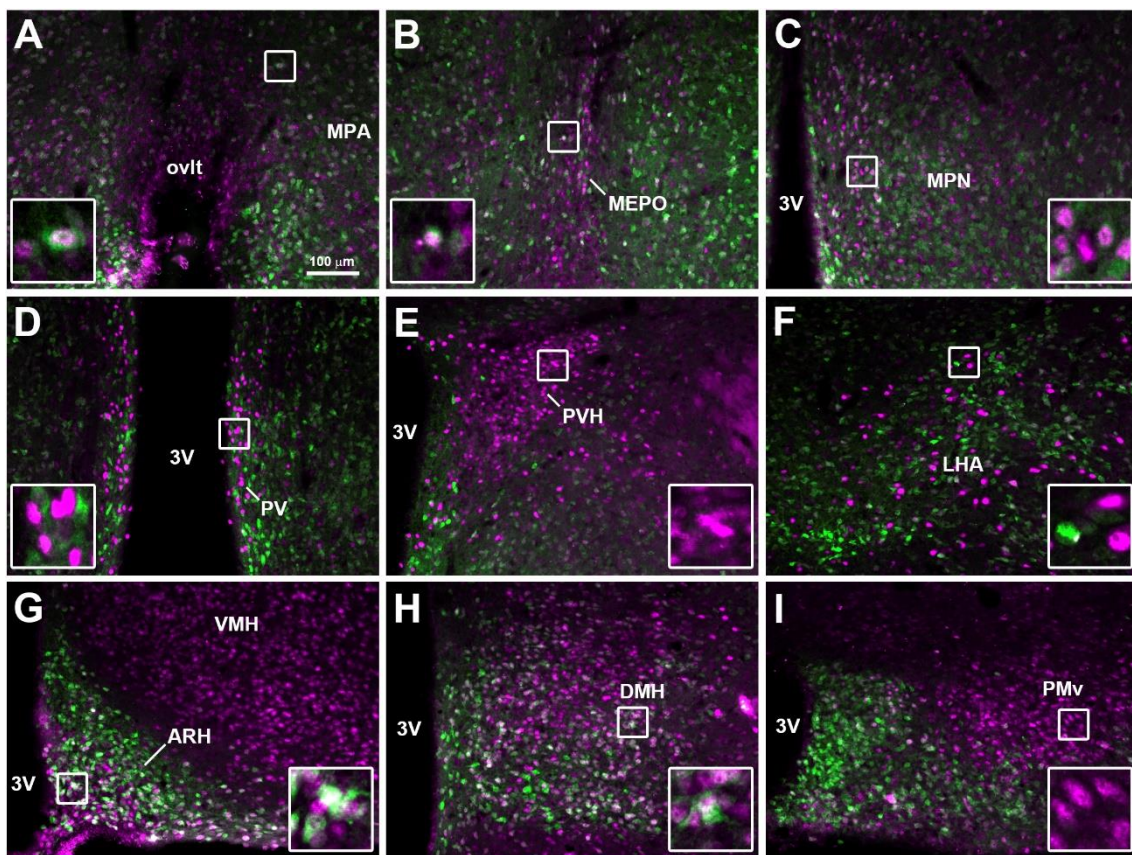


Figura 3. Distribuição dos neurônios responsivos ao GH que são GABAérgicos (VGAT) na região do hipotálamo. **A-I** Fotomicrografias de fluorescência ilustrando a co-expressão de pSTAT5 induzido por injeção de GH (marcação em magenta) em neurônios GABAérgicos (marcação em verde). Possíveis co-localizações podem ser visualizadas em branco, embora as marcações concentram-se em compartimentos celulares distintos.

Abrev.: **3V** terceiro ventrículo, **ARH** núcleo arqueado do hipotálamo tuberal, **DMH** núcleo dorsomedial do hipotálamo, **LHA** área hipotalâmica lateral, **MEPO** núcleo pré-óptico mediano, **MPA** área pré-óptica medial, **ovlt** órgão vascular da lâmina terminal, **PMv** núcleo pré-mamilar ventral, **PV** núcleo periventricular, **PVH** núcleo paraventricular do hipotálamo, **VMH** núcleo ventromedial do hipotálamo.

Em relação ao tronco encefálico, a área tegmental ventral (VTA) e o locus coeruleus (LC) apresentam grande quantidade de células expressando o pSTAT5, mas nenhuma delas é GABAérgica (Figuras 4A e C). Já o núcleo dorsal da rafe (DR) apresenta células GABAérgicas, sendo poucas delas responsivas ao hormônio GH (Figura 4B). O núcleo do trato solitário (NTS) apresenta poucas células GABAérgicas

e nenhuma coexpressando pSTAT5, mas muitos neurônios não GABAérgicos respondivos ao GH (Figura 4D). Não há células GABAérgicas no núcleo motor dorsal do vago (DMX), mas muitas células nesse núcleo são respondivas ao GH (Figura 4).

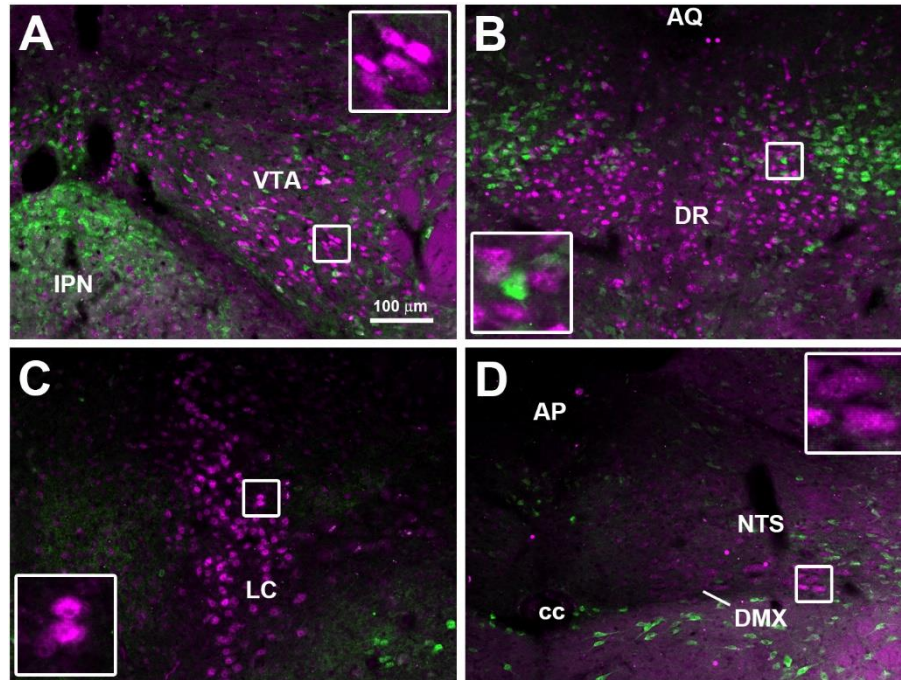


Figura 4. Distribuição dos neurônios respondivos ao GH que são GABAérgicos (VGAT) na região do tronco encefálico. **A-D** Fotomicrografias de fluorescência ilustrando a co-expressão de pSTAT5 induzido por injeção de GH (marcação em magenta) em neurônios GABAérgicos (marcação em verde). Possíveis co-localizações podem ser visualizadas em branco, embora as marcações concentram-se em compartimentos celulares distintos.

Abrev.: **AQ** aqueduto cerebral, **AP** área postrema, **cc** canal central, **DMX** núcleo motor dorsal do vago, **DR** núcleo dorsal da rafe, **IPN** núcleo interpeduncular, **LC** locus coeruleus, **NTS** núcleo do trato solitário, **VTA** área tegmental ventral.

Para identificarmos se os neurônios glutamatérgicos são respondivos ao GH e quais áreas esses neurônios estão localizados, também submetemos camundongos VGLUT2/GFP à injeção de GH para induzir a via de sinalização do STAT5. Os neurônios marcados em verde são glutamatérgicos, enquanto que a marcação em magenta indica a imunorreatividade ao pSTAT5. Possíveis sobreposições podem ser vistas em branco (Figuras 5-7). Conforme sumarizado na Tabela 1, na região septal e amígdala, o LS, BSTam, BSTpr e o CEA possuem células fortemente respondivas ao GH mas apresentam expressão muito baixa ou praticamente ausente de neurônios glutamatérgicos (Figura 5A, C-E). Os núcleos NDB e MEAv também apresentam grande respondividade ao GH e apresentam densidade moderada de

células glutamatérgicas, mas elas não se co-localizam (Figura 5B e F). Já o núcleo MEApd apresenta moderada co-localização de células glutamatérgicas responsivas ao GH (Figura 5G).

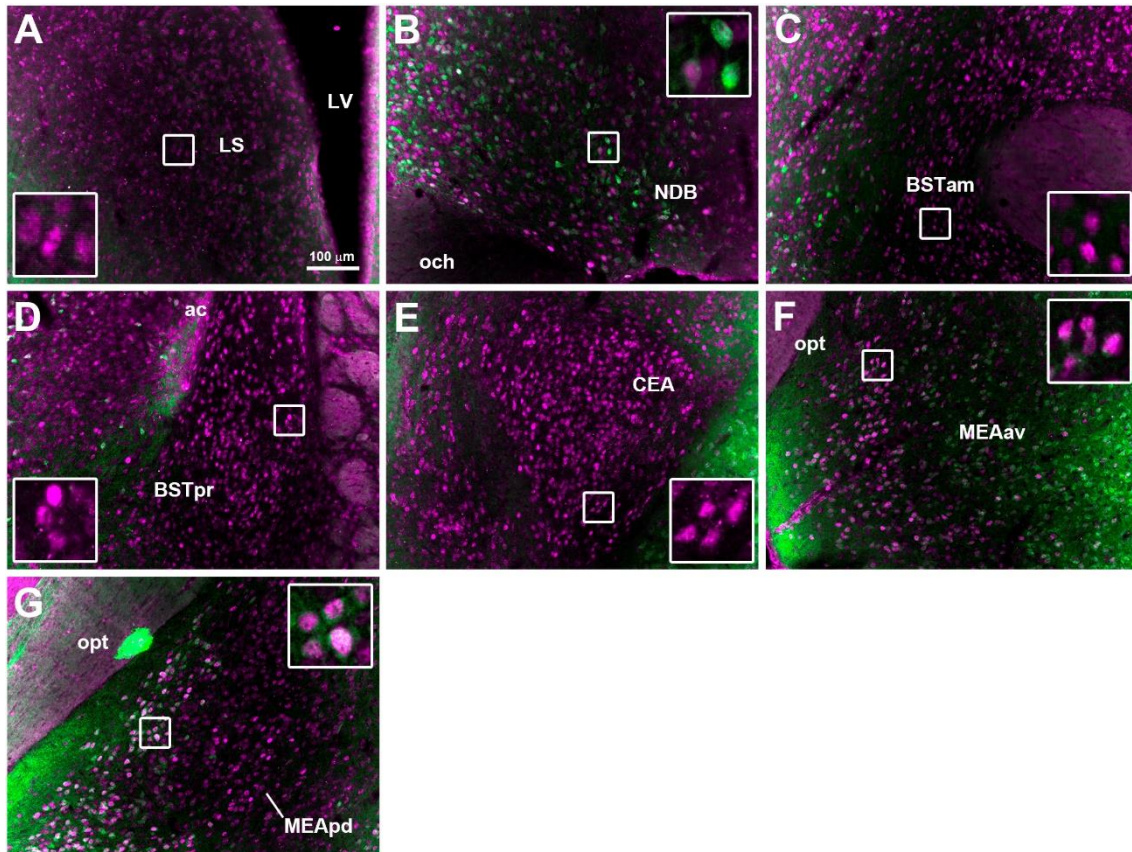


Figura 5. Distribuição dos neurônios responsivos ao GH que são glutamatérgicos (VGLUT2) na região septal e amígdala. **A-G** Fotomicrografias de fluorescência ilustrando a co-expressão de pSTAT5 induzido por injeção de GH (marcação em magenta) em neurônios glutamatérgicos (marcação em verde). Possíveis co-localizações podem ser visualizadas em branco, embora as marcações concentram-se em compartimentos celulares distintos.

Abrev.: **ac** comissura anterior, **BSTam** núcleo intersticial da estria terminal divisão medial anterior, **BSTpr** núcleo intersticial da estria terminal, parte principal, **CEA** núcleo central da amígdala, **LS** septo lateral parte ventral, **LV** ventrículo lateral, **MEAav** núcleo medial da amígdala parte anterior, **MEApd** núcleo medial da amígdala parte posterodorsal, **och** quiasma óptico, **opt** trato óptico.

Na região do hipotálamo, a MPA e o ARH são áreas com muita expressão de pSTAT5 mas apresentam moderada quantidade de células glutamatérgicas e pouca ou nenhuma co-localização com neurônios responsivos ao GH (Figura 6A e F). Já os núcleos MPN, PV, PVH, LHA, VMH, DMH e PMv apresentam grande quantidade de células glutamatérgicas, onde grande quantidade colocalizou com o pSTAT5. Apenas o DMH apresentou uma quantidade menor de co-localização entre neurônios glutamatérgicos e a expressão de pSTAT5 (Figura 6B-H).

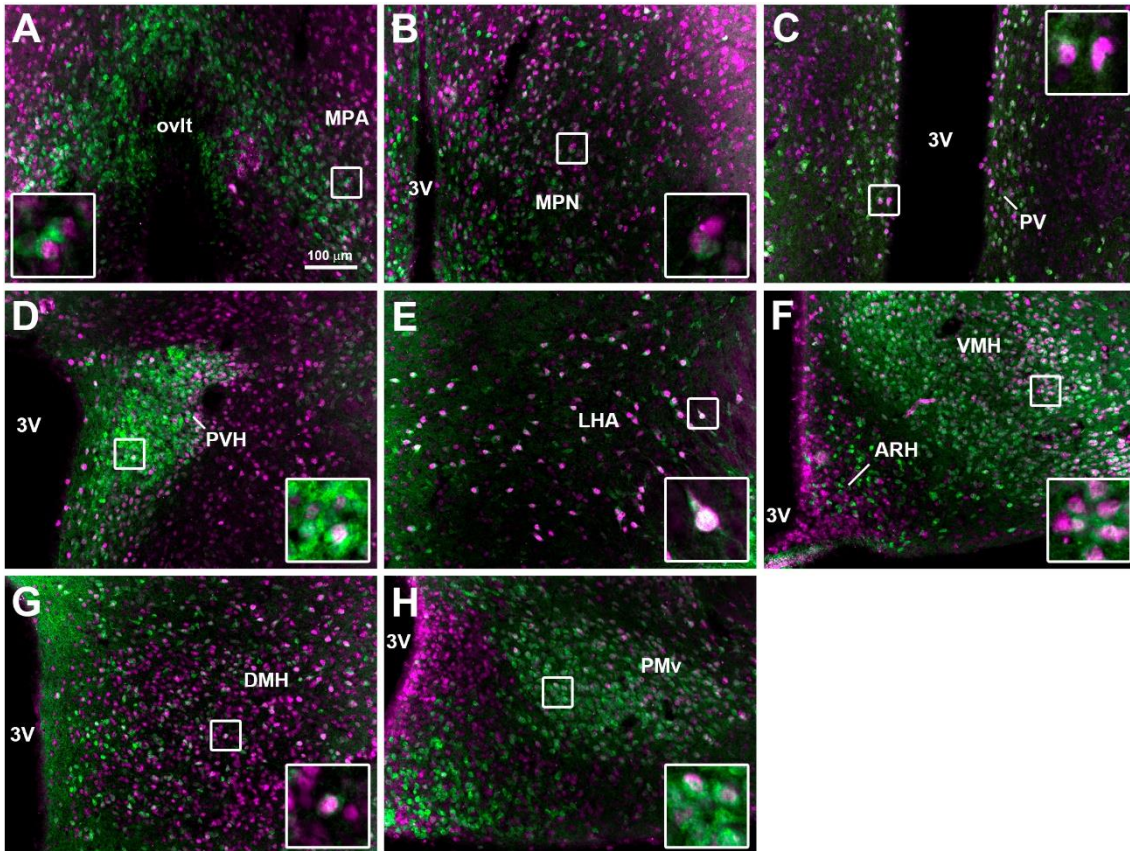


Figura 6. Distribuição dos neurônios responsivos ao GH que são glutamatérgicos (VGLUT2) na região do hipotálamo. **A-H** Fotomicrografias de fluorescência ilustrando a co-expressão de pSTAT5 induzido por injeção de GH (marcação em magenta) em neurônios glutamatérgicos (marcação em verde). Possíveis co-localizações podem ser visualizadas em branco, embora as marcações concentram-se em compartimentos celulares distintos.

Abrev.: **3V** terceiro ventrículo, **ARH** núcleo arqueado do hipotálamo tuberal, **DMH** núcleo dorsomedial do hipotálamo, **LHA** área hipotalâmica lateral, **MPA** área pré-óptica medial, **ovlt** órgão vascular da lâmina terminal, **PMv** núcleo pré-mamilar ventral, **PV** núcleo paraventricular do hipotálamo, **VMH** núcleo ventromedial do hipotálamo.

Na VTA, existem várias células glutamatérgicas que são responsivas ao GH, muito embora existam muitas células responsivas ao GH que não glutamatérgicas (Figura 7A). O núcleo DR apresenta grande densidade de células responsivas ao GH, sendo algumas glutamatérgicas (Figura 7B). Já o LC e o DMX apresentam diversas células que expressam pSTAT5 mas nenhuma delas glutamatérgicas (Figura 7C-D). O NTS apresenta muitos neurônios glutamatérgicos sendo muito deles responsivos ao GH e outras células responsivas ao GH que não glutamatérgicas (Figura 7D).

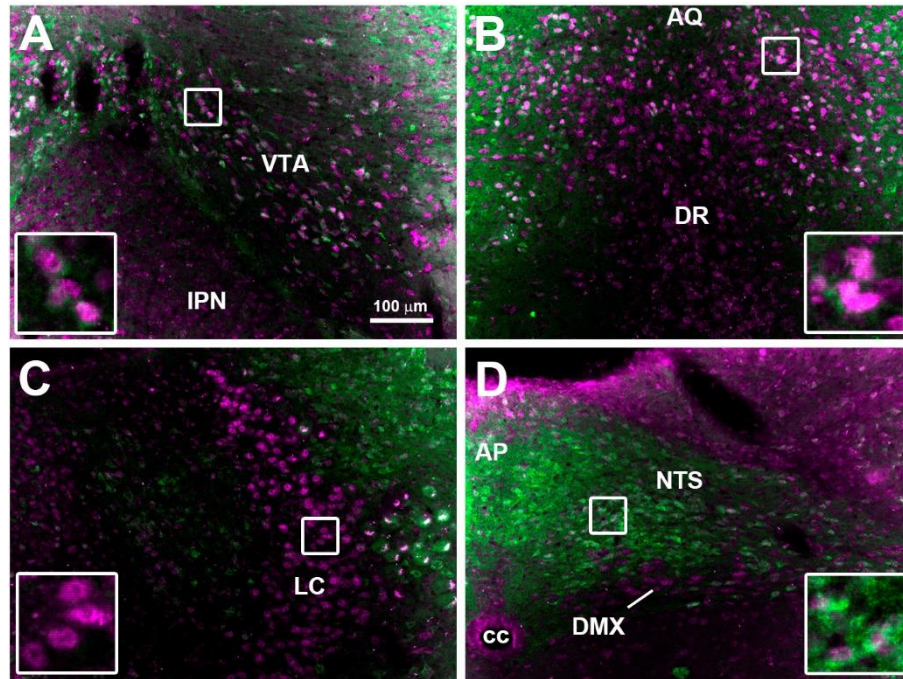


Figura 7. Distribuição dos neurônios responsivos ao GH que são glutamatérgicos (VGLUT2) na região do tronco encefálico. **A-D** Fotomicrografias de fluorescência ilustrando a co-expressão de pSTAT5 induzido por injeção de GH (marcação em magenta) em neurônios glutamatérgicos (marcação em verde). Possíveis co-localizações podem ser visualizadas em branco, embora as marcações concentram-se em compartimentos celulares distintos.

Abrev.: **AQ** aqueduto cerebral, **AP** área postrema, **cc** canal central, **DMX** núcleo motor dorsal do vago, **DR** núcleo dorsal da rafe, **IPN** núcleo interpeduncular, **LC** locus coeruleus, **NTS** núcleo do trato solitário, **VTA** área tegmental ventral.

4.2 Avaliação das consequências da deleção do GHR em neurônios GABAérgicos ou glutamatérgicos

4.2.1 Avaliação do crescimento somático e homeostase energética

Para determinar o ganho de peso corporal de camundongos que carregam ablação do GHR especificamente em neurônios GABAérgicos (VGAT GHR KO) ou glutamatérgicos (VGLUT2 GHR KO), avaliamos, semanalmente, o peso corporal a partir da quarta semana até a vigésima semana de vida. O peso das fêmeas VGAT GHR KO foi maior em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO da quarta à vigésima semana de vida. Já em relação ao grupo controle, as fêmeas VGAT GHR KO apresentaram peso maior da quinta à vigésima semana, enquanto que as fêmeas VGLUT2 GHR KO apresentaram peso menor que o grupo controle na quarta semana e da décima segunda à última semana de vida (Figura 8A).

A composição corporal também foi analisada da quarta até a vigésima semana de vida. Observamos que as fêmeas VGAT GHR KO, VGLUT2 GHR KO e as controle apresentaram quantidade de massa adiposa semelhante (Figura 8B). Já em relação a quantidade de massa magra, houve maior ganho de massa magra nas fêmeas VGAT GHR KO em relação os animais VGLUT2 GHR KO e controle da sexta até a vigésima semana analisada. O grupo VGLUT2 GHR KO apresentou ganho de massa magra menor em relação ao grupo controle da décima até a vigésima semana (Figura 8C).

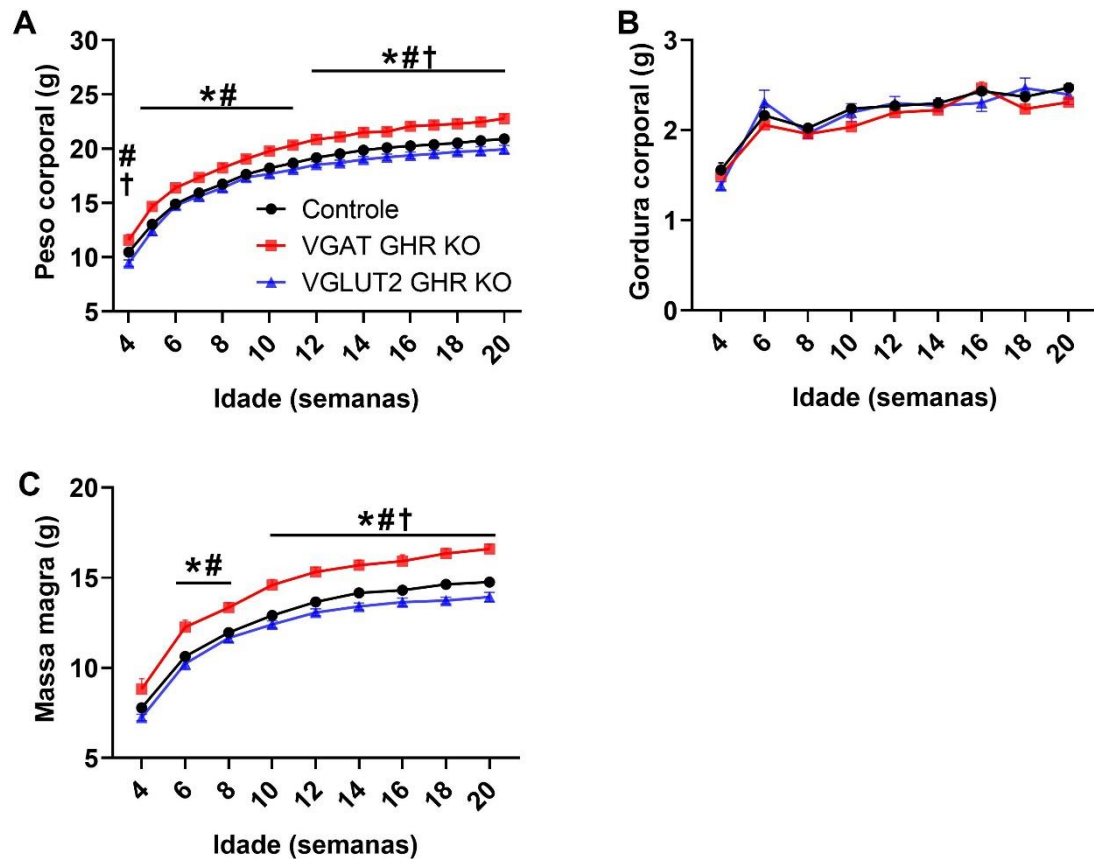


Figura 8. Avaliação do crescimento somático de fêmeas. Acompanhamento de peso corporal (A), massa gorda (B) e massa magra (C) de animais controle (n=43), VGAT GHR KO (n=16) e VGLUT2 GHR KO (n=15). * animais VGAT GHR KO diferentes dos animais controle ($p < 0,05$); # animais VGAT GHR KO em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO; † animais VGLUT2 GHR KO em comparação ao grupo controle.

Afim de analisar a diferença de crescimento entre os grupos, pesamos alguns órgãos no dia da eutanásia (31 semanas de vida aproximadamente). O peso dos órgãos dos animais VGAT GHR KO foram maiores que os do grupo VGLUT2 GHR KO e controle, incluindo o coração, fígado e rim. Já o peso dos órgãos dos grupos VGLUT2 GHR KO e controle foram semelhantes entre si (Figura 9A-C).

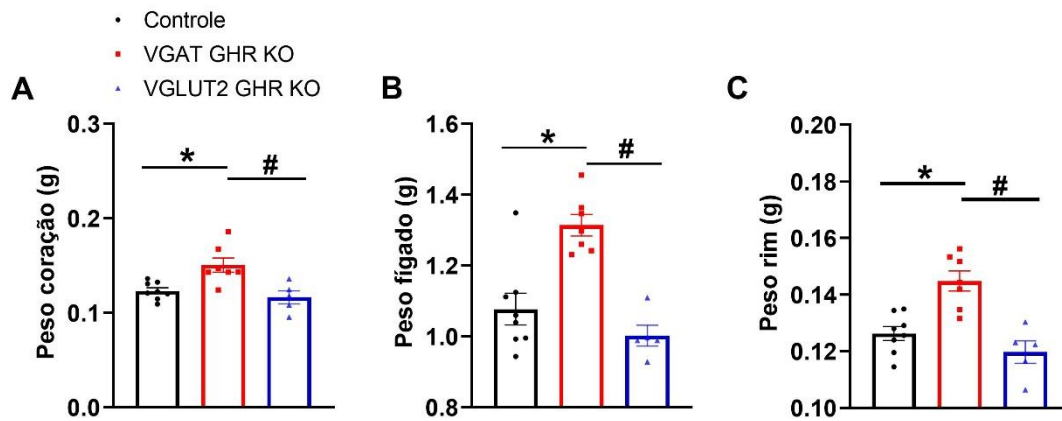


Figura 9. Avaliação do peso dos órgãos de fêmeas. Peso do coração (A), peso do fígado (B), peso do rim (C) de animais controle (n=8), VGAT GHR KO (n=7) e VGLUT2 GHR KO (n=5). * animais VGAT GHR KO diferentes dos animais controle ($p < 0,05$); # animais VGAT GHR KO em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO.

As fêmeas apresentaram consumo alimentar semelhante entre os grupos experimentais (Figura 10A). Para determinar o gasto energético e o substrato preferencialmente utilizado para oxidação, as fêmeas foram avaliadas em um equipamento de calorimetria indireta. Foi observado que o consumo de oxigênio (VO_2), o coeficiente respiratório e a atividade locomotora foram semelhantes entre os grupos experimentais, tanto na fase escura, na fase clara e no período de 24 horas (Figura 10B-D).

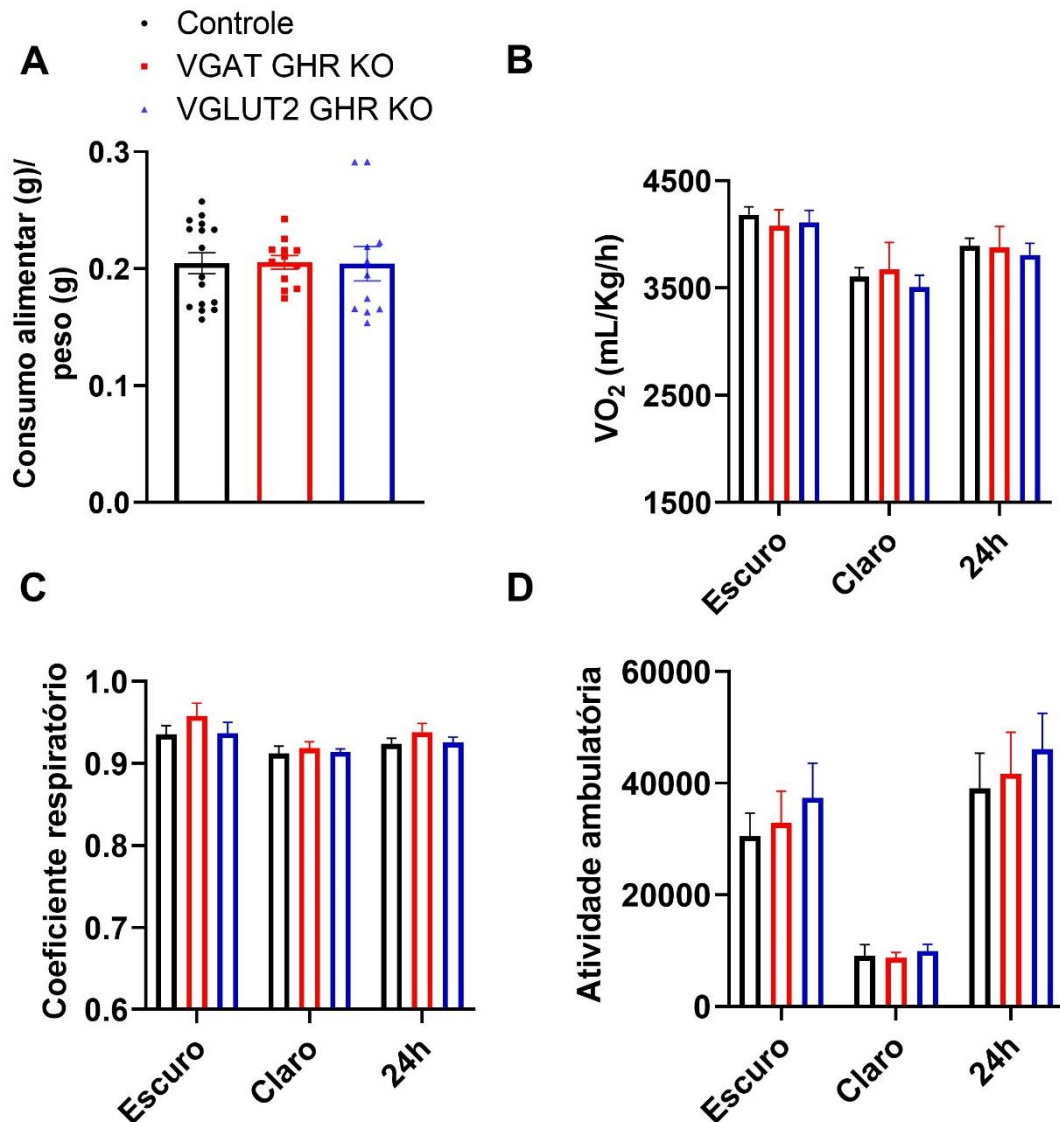


Figura 10. Avaliação da homeostase energética em fêmeas. A. Consumo alimentar em animais controle (n=16), VGAT GHR KO (n=12), VGLUT2 GHR KO (n=11). B-D. Consumo de oxigênio (B), coeficiente respiratório (C) e atividade ambulatória (D) em animais controle (n=8), VGAT GHR KO (n=6) e VGLUT2 GHR KO (n=6).

Em relação aos machos, os animais VGAT GHR KO apresentaram ganho de peso corporal maior que os animais VGLUT2 GHR KO e controle em todas as semanas analisadas. Similarmente ao observado nas fêmeas, os machos VGLUT2 GHR KO apresentaram peso menor que os animais do grupo controle (Figura 11A).

Os machos VGLUT2 GHR KO apresentaram maior massa gorda em comparação aos animais VGAT GHR KO da décima segunda à décima sexta semana e em comparação aos controles na décima segunda e décima sexta

semana de vida (Figura 11B). A massa magra dos animais VGAT GHR KO foi maior que os do grupo controle em todas as semanas analisadas. Já em relação aos animais VGLUT2 GHR KO, a massa magra dos animais VGAT GHR KO foi maior da sexta semana em diante. Os machos VGLUT2 GHR KO apresentaram massa magra menor que os controle da oitava à vigésima semana de vida em diante (Figura 11C).

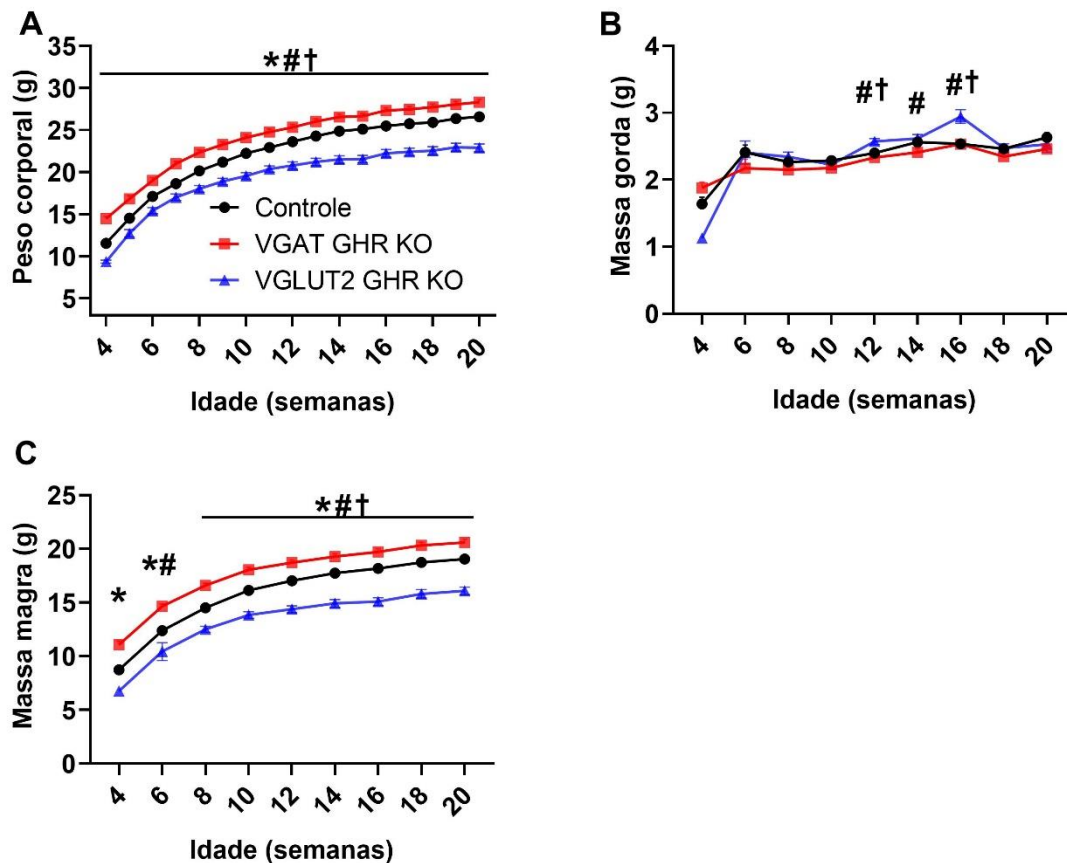


Figura 11. Avaliação do crescimento somático de machos. Acompanhamento de peso corporal (A), massa gorda (B) e massa magra (C) de animais controle (n=41), VGAT GHR KO (n=42) e VGLUT2 GHR KO (n=15). * animais VGAT GHR KO diferentes dos animais controle ($p < 0,05$); # animais VGAT GHR KO em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO; † animais VGLUT2 GHR KO em comparação ao grupo controle.

O peso dos órgãos dos machos VGLUT2 GHR KO foi menor que os pesos observados nos grupos controle e VGAT GHR KO (Figura 12A-C).

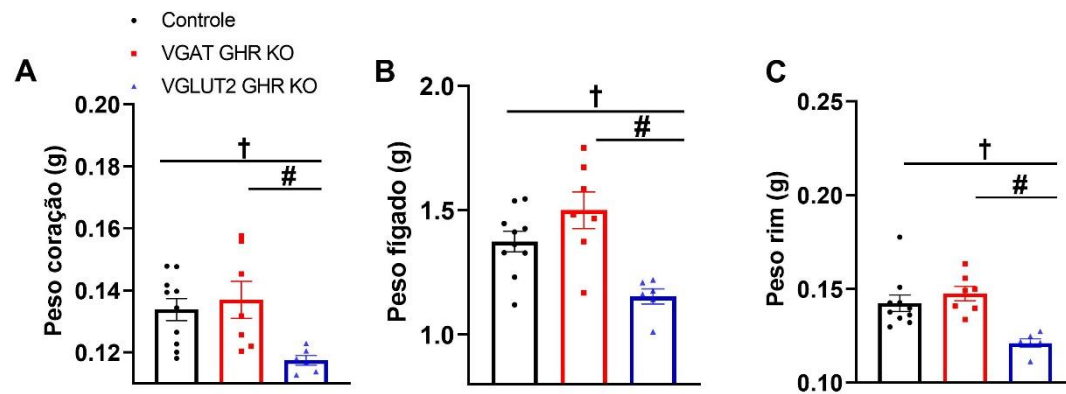


Figura 12. Avaliação do peso de órgãos de machos. Peso do coração (A), peso do fígado (B), peso do rim (C) de animais controle (n=10), VGAT GHR KO (n=7) e VGLUT2 GHR KO (n=6). # animais VGAT GHR KO em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO ($p < 0,05$); † animais VGLUT2 GHR KO em comparação ao grupo controle.

Em relação aos machos, o consumo alimentar dos animais VGLUT2 GHR KO foi maior que a dos animais VGAT GHR KO e controle (Figura 13A). Diferentemente das fêmeas, os machos VGLUT2 GHR KO apresentaram VO_2 maior que os animais VGAT GHR KO no período escuro e 24h. Todavia, o coeficiente respiratório e a atividade locomotora foram semelhantes entre os grupos tanto nos períodos claro e escuro, como em 24h (Figura 13B-D).

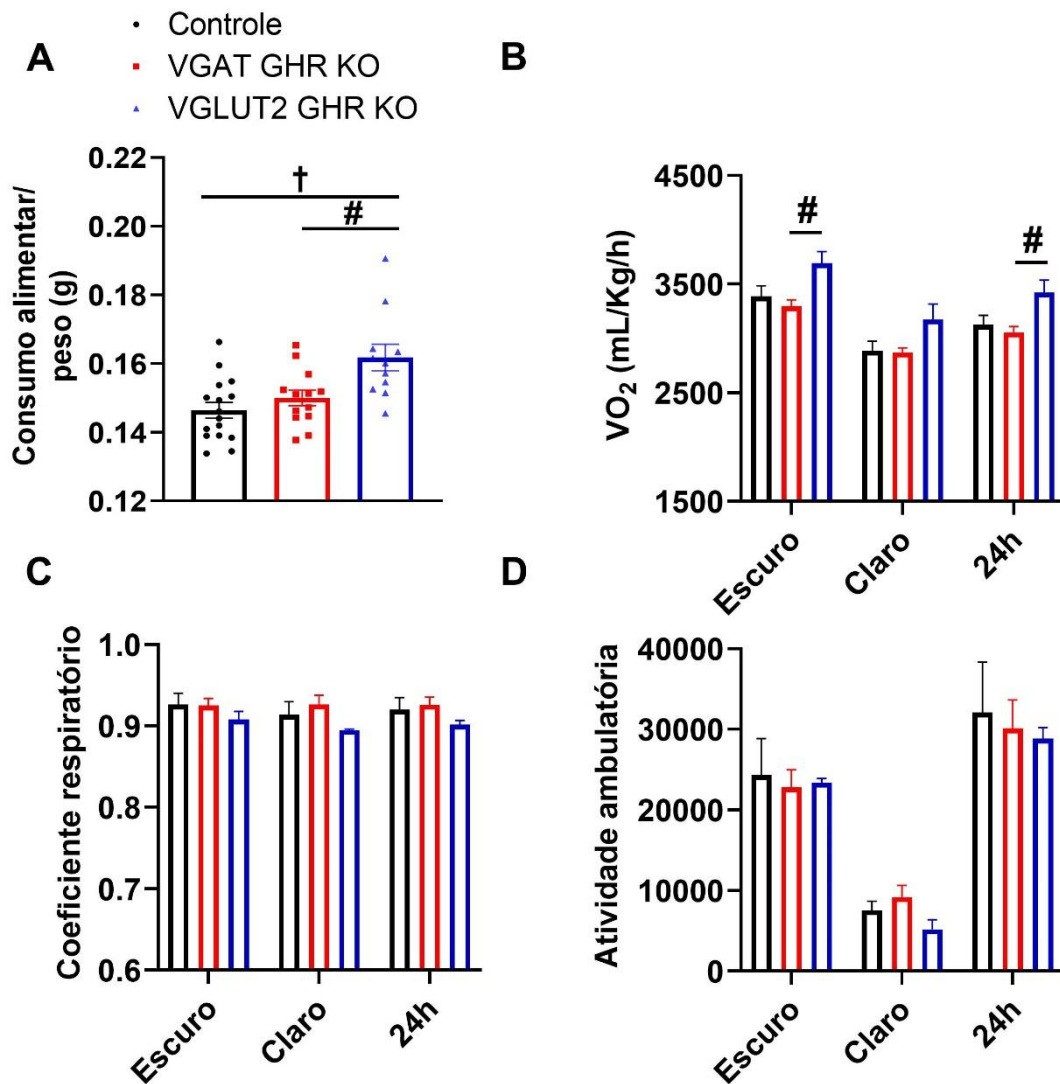


Figura 13. Avaliação da homeostase energética em machos. A. Consumo alimentar em animais controle (n=16), VGAT GHR KO (n=13) e VGLUT2 GHR KO (n=11). B-D. Consumo de oxigênio (B), coeficiente respiratório (C) e atividade ambulatória (D) em animais controle (n=7), VGAT GHR KO (n=6) e VGLUT2 GHR KO (n=3). # animais VGAT GHR KO em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO ($p < 0,05$); † animais VGLUT2 GHR KO em comparação ao grupo controle.

4.2.2 Avaliação da homeostase glicêmica

Inicialmente serão apresentados os dados de homeostase glicêmica das fêmeas. No GTT, foi observado que os animais VGLUT2 GHR KO apresentaram aumento da tolerância à glicose em comparação com os animais controle e o grupo VGAT GHR KO (Figura 14A-B). Similarmente ao observado no GTT, as fêmeas VGLUT2 GHR KO apresentaram maior sensibilidade à insulina, observada no ITT (Figura 14C-D).

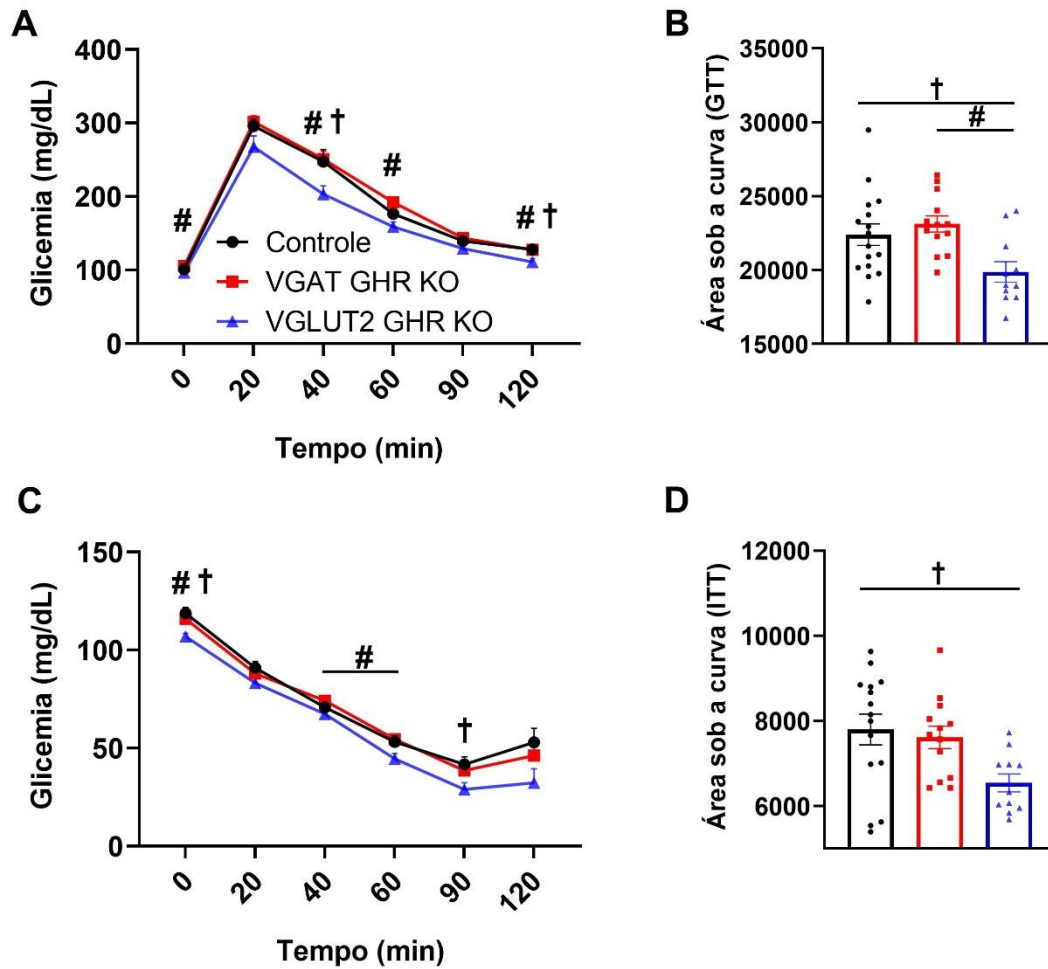


Figura 14. Avaliação da homeostase glicêmica em fêmeas. Teste de tolerância a glicose (GTT) (A), área sob a curva (GTT) (B), teste de tolerância a insulina (ITT) (C), área sob a curva (ITT) (D), de animais controle (n=16), VGAT GHR KO (n=13) e VGLUT2 GHR KO (n=11). # animais VGAT GHR KO em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO ($p < 0,05$); † animais VGLUT2 GHR KO em comparação ao grupo controle;

Resultados similares aos das fêmeas foram observados nos testes que avaliaram a homeostase glicêmica dos machos. Nesse sentido, os machos VGLUT2 GHR KO apresentaram aumento da tolerância à glicose e maior sensibilidade à insulina no GTT e ITT, respectivamente, comparados aos grupos controle e VGAT GHR KO (Figura 15A-D).

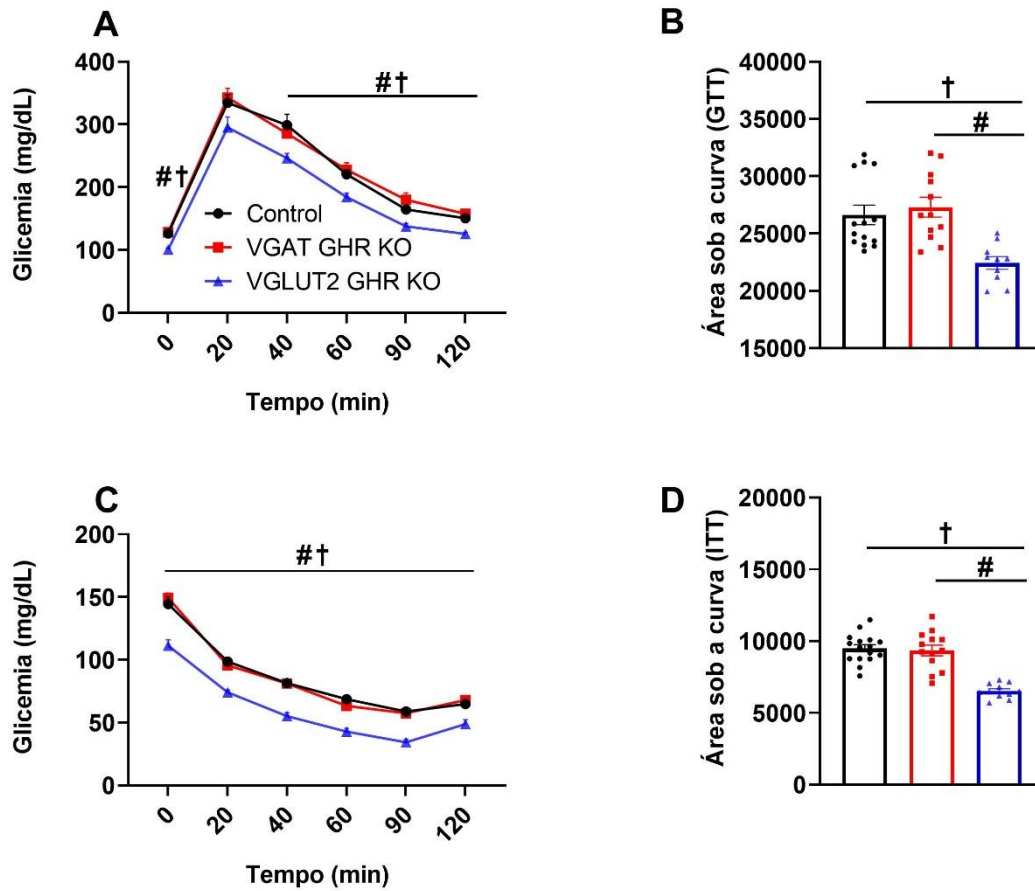


Figura 15. Avaliação da homeostase glicêmica em machos. Teste de tolerância a glicose (GTT) (A), área sob a curva (GTT) (B), teste de tolerância a insulina (ITT) (C), área sob a curva (ITT) (D), de machos controle (n=14), VGAT GHR KO (n=12) e VGLUT2 GHR KO (n=10). # animais VGAT GHR KO em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO ($p < 0,05$); † animais VGLUT2 GHR KO em comparação ao grupo controle.

4.2.3 Avaliação da resposta contra regulatória frente ao desafio de 2DG

Para avaliar a resposta dos animais a condições de glicopenia (que simulam hipoglicemia), os animais receberam injeção de 2DG e foi analisado a resposta na glicemia e na hiperfagia induzida pela glicoprivação (Quaresma *et al.*, 2019). Como observado nos testes de GTT e ITT, as fêmeas VGLUT2 GHR KO apresentaram glicemia reduzida no ponto basal. Contudo, a resposta contra regulatória induzida pela administração de 2DG foi similar entre os grupos experimentais (Figura 16A-B). Ao medir o consumo alimentar dos grupos após 4h da injeção de 2DG ou PBS, verificamos que os grupos VGAT GHR KO e controle tiveram um consumo alimentar maior após injeção de 2DG em comparação à injeção de PBS, o que está de acordo

com os dados na literatura (Furigo, Teixeira, et al., 2019). Contudo, as fêmeas VGLUT2 GHR KO não apresentaram aumento do consumo alimentar após injeção de 2DG (Figura 16C).

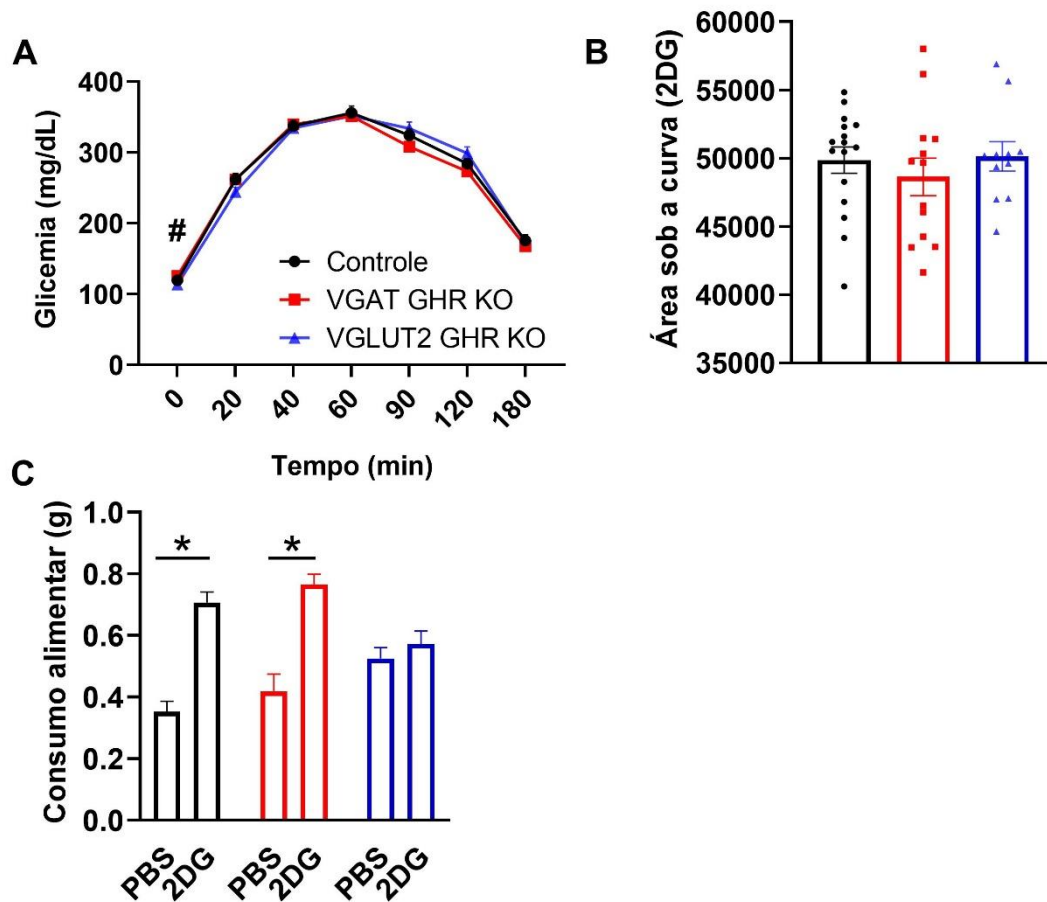


Figura 16. Avaliação da homeostase glicêmica e consumo alimentar, frente ao teste de 2-deoxi-D-glicose em fêmeas. Resposta contra regulatória a hipoglicemia evocada pela infusão de 2DG (A), área sob a curva (2DG) (B), consumo alimentar após 4h da injeção de 2DG ou PBS (C) em animais controle (n=16), VGAT GHR KO (n=13) e VGLUT2 GHR KO (n=11). * diferente do PBS; # animais VGAT GHR KO em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO ($p < 0,05$).

Os machos VGAT GHR KO e VGLUT2 GHR KO apresentaram menor glicemia em relação ao grupo controle após injeção de 2DG (Figura 17A-B). Ao medir o consumo alimentar dos grupos após 4h da injeção de 2DG ou PBS, como visto nos dados das fêmeas, verificamos que os grupos controle e VGAT GHR KO tiveram um consumo alimentar maior após injeção de 2DG em comparação à injeção de PBS, enquanto o grupo VGLUT2 GHR KO não apresentou aumento do consumo alimentar após injeção de 2DG (Figura 17C).

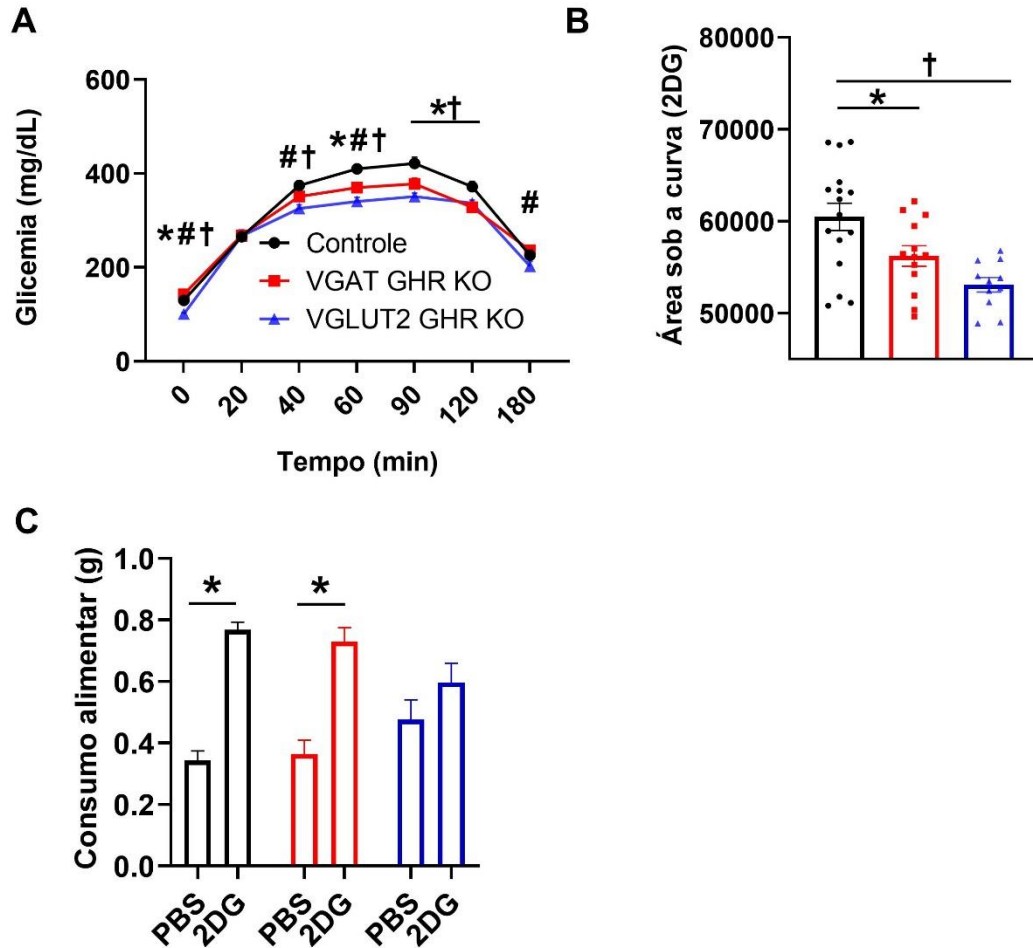


Figura 17. Avaliação da homeostase glicêmica e consumo alimentar, frente ao teste de 2-deoxi-D-glicose em machos. Resposta contra regulatória a hipoglicemia evocada pela infusão de 2DG (A), área sob a curva (2DG) (B) em machos controle (n=16), VGAT GHR KO (n=13) e VGLUT2 GHR KO (n=11). * animais VGAT GHR KO diferentes dos animais controle ($p < 0,05$); # animais VGAT GHR KO em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO; † animais VGLUT2 GHR KO em comparação ao grupo controle. Consumo alimentar após 4h da injeção de 2DG ou PBS (C). * diferente do PBS.

4.2.4 Avaliação da variação ponderal, homeostase glicêmica e composição corporal durante restrição alimentar

Nesse desafio metabólico, os animais foram submetidos à restrição alimentar de 40%, ou seja, foi oferecido 60% do consumo alimentar individual durante 5 dias. As fêmeas VGAT GHR KO perderam mais peso corporal em relação aos animais VGLUT2 GHR KO no segundo, quarto e quinto dia de restrição (Figura 18A). A variação de gordura corporal foi semelhante entre os grupos durante os 5 dias de restrição alimentar (Figura 18B). A perda de massa magra foi semelhante entre os grupos nos dois primeiros dias, ao passo que do terceiro dia em diante os animais VGAT GHR KO perderam mais massa magra em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO (Figura 18C). Durante os 5 dias de restrição, a variação na glicemia dos grupos não foi significativamente diferente, embora a glicemia tendeu a ser menor no grupo VGAT GHR KO (Figura 18D).

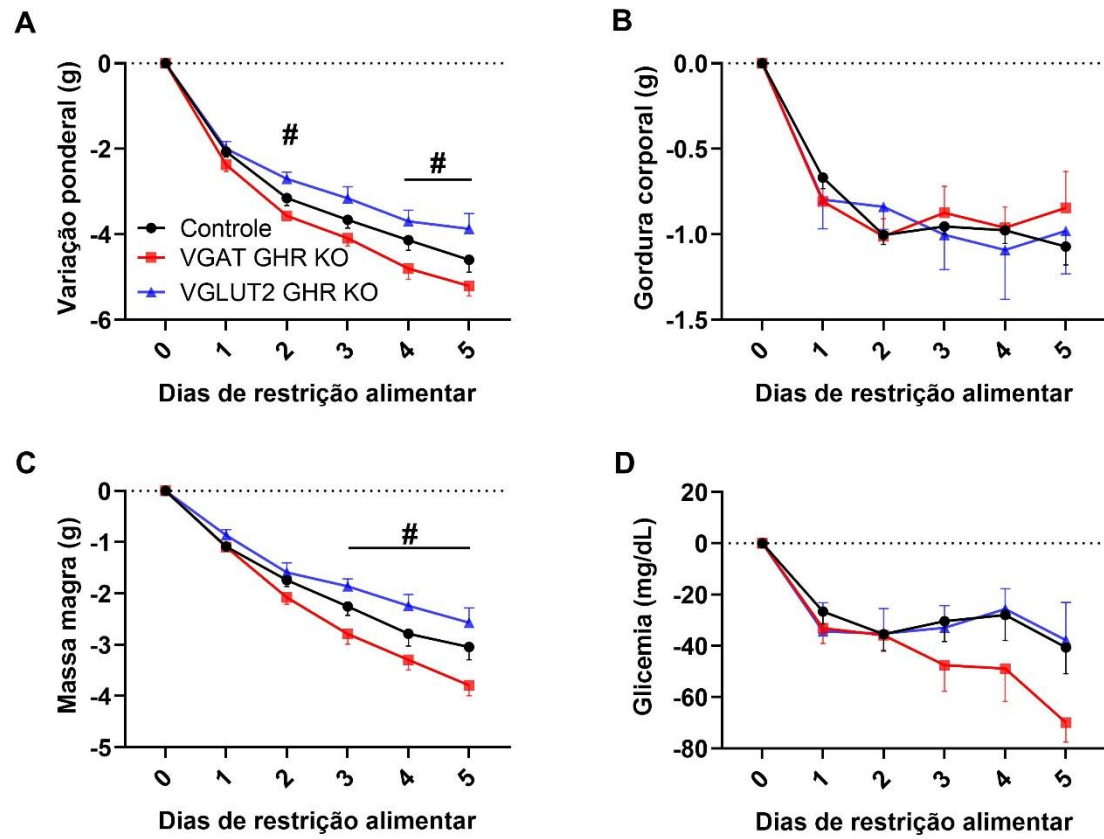


Figura 18. Avaliação metabólica durante restrição alimentar de 5 dias em fêmeas. Variações no peso (A), gordura corporal (B), massa magra (C) e glicemia (D) em animais controle (n=8), VGAT GHR KO (n=7) e VGLUT2 GHR KO (n=5). # animais VGAT GHR KO em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO ($p < 0,05$).

Depois da restrição alimentar, foi oferecido ração a vontade para todos os grupos. Foi observado que os animais VGLUT2 GHR KO consumiram mais ração que os animais VGAT GHR KO (Figura 19).

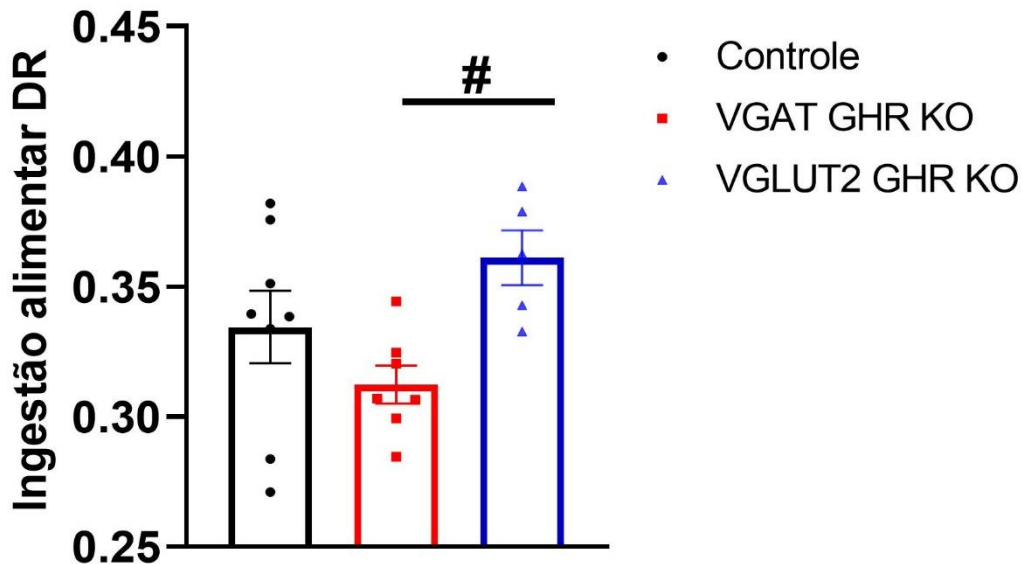


Figura 19. Avaliação da ingestão alimentar durante a realimentação e o consumo normalizado pelo peso e média de 3 dias. Animais fêmeas controle (n=8), VGAT GHR KO (n=7) e VGLUT2 GHR KO (n=5). # animais VGAT GHR KO em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO ($p < 0,05$). Abrev.: DR depois da restrição.

Em relação aos machos durante a restrição alimentar, os animais VGLUT2 GHR KO machos perderam menos peso em comparação aos grupos VGAT GHR KO e controle no segundo, terceiro, quarto e quinto dia de restrição. Por outro lado, os machos VGAT GHR KO perderam mais peso que os controle no segundo, quarto e quinto dia de restrição (Figura 20A). A variação de gordura corporal foi similar entre os grupos experimentais (Figura 20B). Com relação à perda de massa magra, do segundo dia em diante os animais VGLUT2 GHR KO perderam menos massa magra que os outros grupos. Já os animais VGAT GHR KO perderam mais massa magra que o grupo controle do terceiro dia em diante (Figura 20C). Os níveis de glicose no sangue foram significativamente menores no grupo VGAT GHT KO, em relação ao grupo controle, a partir do terceiro dia de restrição alimentar. Em contraste, a glicemia dos machos VGLUT2 GHR KO se manteve mais elevada que o grupo controle na maior parte do período de restrição alimentar (Figura 20D).

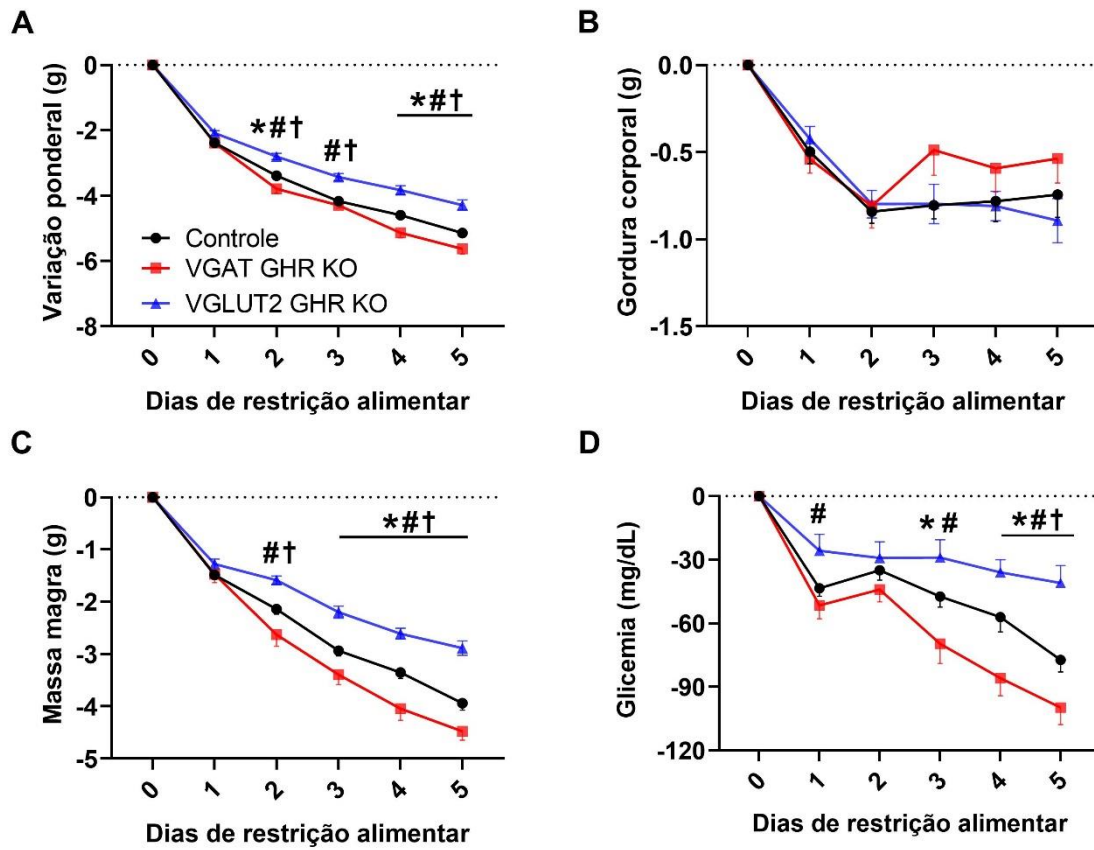


Figura 20. Avaliação metabólica durante a restrição alimentar de 5 dias em machos. Variações no peso (A), gordura corporal (B), massa magra (C) e glicemia (D) em animais controle (n=16), VGAT GHR KO (n=13) e VGLUT2 GHR KO (n=11). * animais VGAT GHR KO diferentes dos animais controle ($p < 0,05$); # animais VGAT GHR KO em comparação aos animais VGLUT2 GHR KO; † animais VGLUT2 GHR KO em comparação ao grupo controle.

Após a restrição alimentar, o consumo dos animais VGLUT2 GHR KO foi menor que o consumo dos animais controle (Figura 21).

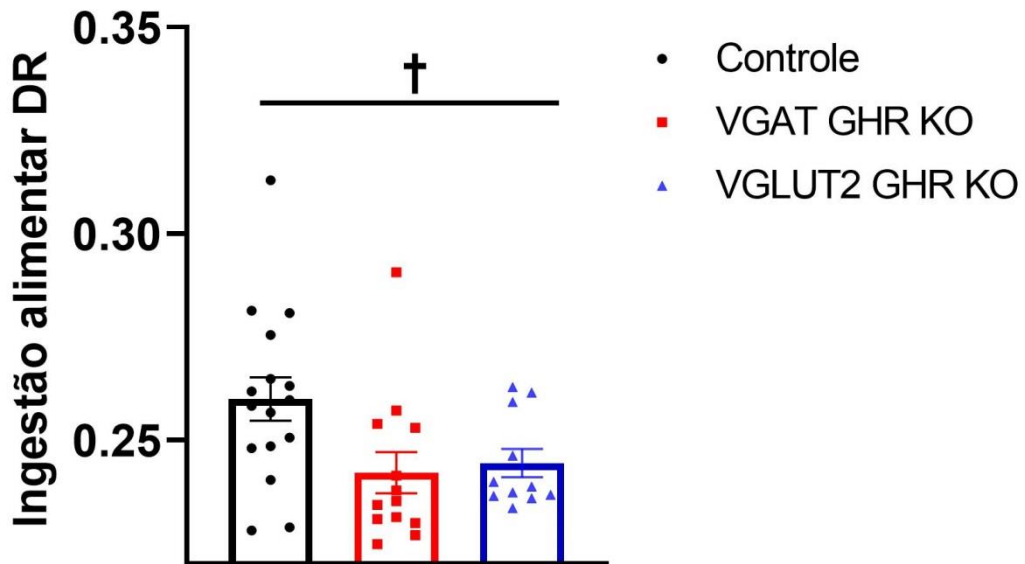


Figura 21. Avaliação da ingestão alimentar durante a realimentação e o consumo normalizado pelo peso e média de 3 dias. Animais machos controle (n=16), VGAT GHR KO (n=13) e VGLUT2 GHR KO (n=11) machos. † animais VGLUT2 GHR KO em comparação ao grupo controle. Abrev.: DR depois da restrição.

5 DISCUSSÃO

O papel do GH no sistema nervoso central ainda é pouco conhecido, porém estudos recentes vêm mostrando a sua importância na manutenção do gasto energético e homeostase glicêmica (Cady *et al.*, 2017; Furigo, Teixeira, *et al.*, 2019). Este hormônio age em diversas regiões hipotalâmicas, dentre elas algumas responsáveis pela fome, saciedade e regulação da glicemia (Furigo *et al.*, 2017). Contudo, pouca atenção tem sido dada na identificação dos neurônios que regulam o metabolismo e expressam neurotransmissores clássicos, incluindo o GABA e o glutamato. Por isso, buscamos mapear quais regiões são glutamatérgicas ou GABAérgicas, além de investigar possíveis impactos da falta do GHR nessas populações neuronais específicas. Encontramos diversos agrupamentos neuronais que expressaram VGAT/GFP (neurônios GABAérgicos) ou VGLUT2/GFP (neurônios glutamatérgicos) e são responsivos ao GH. Sendo as estruturas septo e amígdala predominantemente GABAérgicas, enquanto as estruturas do mesencéfalo, ponte e bulbo glutamatérgicas. Entretanto, as estruturas hipotalâmicas apresentaram grande densidade, tanto de neurônios GABAérgicos, como glutamatérgicos. Encontramos maior densidade de neurônios GABAérgicos nas regiões do LS, BSTam, CEA, MEApd, ARH, DMH e TU, semelhante ao encontrado na literatura (Brashear *et al.*, 1986; Hrabovszky *et al.*, 2012; Kalló *et al.*, 2015). Nas regiões MPN, PV, PVH, VMH, PMV, VTA e NTS encontramos maior densidade de neurônios glutamatérgicos (Lin *et al.*, 2003; Eyigor *et al.*, 2004; Root *et al.*, 2014; Kalló *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Também encontramos neurônios GABAérgicos ou glutamatérgicos em grande quantidade tanto na LHA como no DMH (Lin *et al.*, 2003; Vong *et al.*, 2011; Hrabovszky *et al.*, 2012; Kalló *et al.*, 2015). Na VTA encontramos somente neurônios glutamatérgicos, mas estudos anteriores mostraram a presença tanto de neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos nesta região, mostrando até mesmo co-expressão de GABA e glutamato pelo mesmo neurônio (Root *et al.*, 2014; Root *et al.*, 2018). Na região do LC e DMX, não encontramos neurônios GABAérgicos, nem glutamatérgicos. O LC é uma região predominantemente de neurônios noradrenérgicos (NE), mas existem estudos que mostram que o LC possui aferências GABAérgicas, podendo até apresentar populações GABAérgicas no próprio LC (Mallick *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2013; Toussay *et al.*, 2013; Plummer *et al.*, 2017; Breton-Provencher and Sur, 2019). Já no DMX podemos encontrar

populações neuronais colinérgicas e dopaminérgicas (Armstrong *et al.*, 1990; Hayakawa *et al.*, 2004). As áreas que apresentaram maior responsividade ao GH em neurônios GABAérgicos foram o LS, BSTam, CEA e ARH, enquanto que em neurônios glutamatérgicos foram o MPN, PV, PVH, LHA, VMH, PMV e VTA (Furigo *et al.*, 2017).

Observamos que os animais com inativação do GHR em neurônios GABAérgicos apresentaram maior peso em comparação aos outros grupos. A liberação do GH no plasma acontece de forma pulsátil, devido à presença antagonista de dois neuropeptídeos, na qual a somatostatina atua inibindo a liberação de GH, ao passo que o GHRH estimula a secreção (Fodor *et al.*, 2006). Neurônios GABAérgicos também podem co-expressar somatostatina (Rudy *et al.*, 2011; Urban-Ciecko and Barth, 2016). Há evidências de que neurônios TH do núcleo arqueado podem co-expressar o neurotransmissor GABA (Zhang and Van Den Pol, 2015; Marshall *et al.*, 2017). Estudos publicados recentemente pelo nosso laboratório mostraram que a falta do GHR em todo sistema nervoso atrapalha o controle hipotalâmico da secreção de GH, levando a um aumento na secreção de GH e conseqüentemente de gigantismo, observado pelo aumento do peso corporal e massa magra, sem alteração da gordura corporal. Em vez de uma menor expressão de GHRH, indicando uma tentativa de correção à alta circulação do hormônio do crescimento plasmático via feedback negativo, a deleção do GHR em todo sistema nervoso ou apenas em neurônios TH aumentou a expressão de mRNA GHRH e a secreção de GH. Esta alteração teve relação com o crescimento corporal tanto de animais machos como de fêmeas (Wasinski *et al.*, 2020). Sabendo disso, achamos que os animais que não possuem GHR em neurônios GABAérgicos apresentaram maior crescimento devido à falta de feedback negativo nessas células.

Interessantemente, os animais VGLUT2 apresentaram menor ganho de peso em relação aos outros grupos. Esse fenótipo foi surpreendente, pois normalmente a perda de um dado receptor leva ao aumento da secreção do hormônio afetado, contudo, uma possibilidade é que o GHR foi inativado no fígado, levando a diminuição do IGF-1 e do crescimento corporal. Porém, seria necessário que o fígado expressasse VGLUT2, que é um marcador genético de neurônios que liberam glutamato. Planejamos no futuro próximo avaliar essa possibilidade para poder

compreender os mecanismos fisiológicos envolvidos com a diminuição do peso corporal, observado no modelo VGLUT2 GHR KO.

Vimos que a falta do GHR em neurônios glutamatérgicos acarretou no aumento do consumo alimentar. A ação parcial ou a falta total da sinalização do GH em camundongos está relacionado com o aumento do consumo alimentar desses animais (Coschigano *et al.*, 2003; Berryman *et al.*, 2004). Um estudo onde usaram animais nocautes do GHR em todo organismo mostrou aumento no consumo alimentar. Essa hiperfagia parece ter sido resultado da hipoglicemia e/ou da diminuição dos níveis circulantes de insulina apresentados por esses animais. Mesmo sendo sensíveis à insulina foi mostrado aumento nos níveis plasmáticos de glicocorticoides (Hauck *et al.*, 2001; Egecioglu *et al.*, 2006). Tratamentos com glicocorticoides estão relacionados com aumento do consumo alimentar (Chen and Romsos, 1995). Pode ser que o aumento do gasto energético (aumento no VO₂) dos animais VGLUT2 GHR KO tenha acontecido de forma compensatória à hiperfagia. Alguns hormônios podem estar envolvidos nesse processo compensatório, atuando na plasticidade dos neurônios (Pinto *et al.*, 2004).

Os animais VGLUT2 GHR KO apresentaram melhor tolerância à glicose e maior sensibilidade à insulina. Em um estudo, camundongos nocautes para o GHR apresentaram diminuição acentuada nas concentrações de insulina e diminuição moderada nas concentrações de glicose em jejum. Isto indica que a falta do GHR induz um estado de hipersensibilidade à insulina, com a homeostase da glicose sendo preservada mesmo com pouca insulina circulante (Dominici *et al.*, 2000). Há uma associação entre a deficiência de GH e a hipersensibilidade à insulina em humanos e animais (Davidson, 1987). Em pacientes com deficiência de GH há uma tendência à hipoglicemia (Hopwood *et al.*, 1975; Dominici *et al.*, 2003), aparentemente causado principalmente pela redução da produção hepática de glicose (Bougnères *et al.*, 1985). A deficiência de GH em ratos também leva ao aumento da sensibilidade à insulina (Daugaard *et al.*, 1999). A administração de insulina por via intraperitoneal diminuiu mais a concentração de glicose no sangue de animais GHR KO GLOBAL do que nos controles, mostrando que a sensibilidade à insulina é realmente aumentada nesses animais (Coschigano *et al.* 1999). Esses animais ainda apresentaram redução da glicose e níveis extremamente baixos de insulina no plasma, tanto em estado alimentado como em jejum (Hauck *et al.*, 2001).

O fígado de camundongos GHR KO GLOBAL é adaptado para funcionar na presença de baixas concentrações de insulina. Há aumento na quantidade de receptores de insulina (IR) no fígado desses animais. Parece que acontece esta regulação positiva por consequência de concentrações muito baixas de insulina plasmática por um longo período de tempo, que podem ser responsáveis, pelo menos em parte pelo aumento da sensibilidade à insulina apresentada por esses animais. (Dominici *et al.*, 2000). Portanto, a maior sensibilidade à insulina dos camundongos VGLUT2 GHR KO pode ser um indicativo que o efeito diabetogênico do GH seja mediado por células glutamatérgicas, sendo que o camundongo VGLUT2 GHR KO mimetiza o fenótipo da ablação global do GHR no que se refere à homeostase glicêmica.

Após injeção de 2DG, os animais machos VGLUT2 GHR KO apresentaram menor glicemia em relação ao grupo controle. Existem neurônios que são amplamente estimulados ou inibidos pela concentração de glicose intersticial. Mudanças nas concentrações normais de glicose podem desencadear a ação desses neurônios (Routh, 2010). Estudos vem mostrando que o GH é importante na resposta contra regulatória (RCR) induzida por hipoglicemia (Hussain *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2010; Tennese and Wevrick, 2011). A falta de GHR em neurônios SF1 está relacionada com a deficiência na RCR. Um trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo sugeriu que o GH atua em neurônios do VMH para melhorar a resposta contra regulatória frente a hipoglicemia. Foi mostrado que a administração de 2DG conjuntamente com bloqueadores simpáticos suprime fortemente a curva glicêmica durante o RCR. No entanto, animais sem o GHR em neurônios do VMH (SF1 GHR KO) ainda mantiveram a curva glicêmica mais baixa durante a infusão de 2DG com alfa e beta bloqueadores. Por outro lado, os bloqueadores parassimpáticos eliminaram completamente as diferenças na curva glicêmica entre os animais controle e SF1 GHR KO durante a RCR. Isso sugeri que a falta de GHR nos neurônios VMH possivelmente afeta o metabolismo hepático da glicose via o sistema nervoso parassimpático (Furigo, De Souza, *et al.*, 2019). O sistema nervoso autônomo é conhecido por estimular ou suprimir a produção de glicose pelo fígado em resposta a administração de 2DG (Matsunaga *et al.*, 1989; Pascoe *et al.*, 1989; Yi *et al.*, 2010; Carnagarin *et al.*, 2018). Algumas áreas hipotalâmicas são responsáveis por regular esses sinais autônomos até o fígado. O VMH modula as

funções simpáticas, enquanto o LH as parassimpáticas, já o PVN integra os sinais autônomos proveniente de diversas áreas hipotalâmicas (Uyama *et al.*, 2004; Klieverik *et al.*, 2009; Shimazu and Minokoshi, 2017). Nesse sentido, a falta de GHR em neurônios do VMH pode aumentar a atividade do sistema nervoso parassimpático, enquanto o tônus simpático é reduzido (Paes *et al.*, 2006). Além disso, nossos resultados mostram que os neurônios do VMH são glutamatérgicos e altamente responsivos ao GH, podendo explicar a hipoglicemia e o não aumento do consumo alimentar frente à injeção de 2DG dos animais VGLUT2 GHR KO machos. Ainda, acreditamos que as fêmeas VGLUT2 GHR KO podem não ter apresentado as mesmas respostas que os machos por possuírem algum tipo de dimorfismo sexual, que é típico do VMH que modula a expressão de diferentes comportamentos sexualmente dimórficos (Jiang *et al.*, 2019; Kawabata-Sakata *et al.*, 2020).

Durante a restrição calórica de 40% do consumo habitual, os animais VGAT GHR KO machos e fêmeas perderam mais peso e massa magra que os animais VGLUT2 GHR KO. Os níveis circulantes de GH aumentam durante a restrição alimentar e a secreção de GH é importante para prevenir a hipoglicemia nessa situação (Zhao *et al.*, 2010). Os neurônios AgRP expressam c-Fos durante a privação alimentar, como um indicador do aumento da atividade celular (Pedroso *et al.*, 2016). Em outro trabalho publicado pelo nosso laboratório, foi mostrado que em animais AgRP GHR KO (ausência de GHR em neurônios AgRP), a expressão de c-Fos estava prejudicada. Também viram que estes animais não conseguem economizar energia frente a uma situação de restrição alimentar. Isto evidencia que para os neurônios possam responder corretamente à uma situação de restrição alimentar, eles precisam da sinalização promovida pelo GH (Furigo, Teixeira, *et al.*, 2019). Neurônios que expressam LepR são conhecidos por desencadarem adaptações metabólicas que conservam energia (Erickson *et al.*, 1996; Donato *et al.*, 2011; Berglund *et al.*, 2012). Animais LepR GHR KO e GHR KO no cérebro mostraram dificuldade em economizar energia frente a restrição alimentar levando a uma maior perda de peso e menor glicemia (Furigo, Teixeira, *et al.*, 2019). Nossos resultados mostram que durante a restrição alimentar, os animais VGAT GHR KO machos apresentaram glicemia bem baixa em comparação aos outros grupos. Pode ser que os neurônios LepR ou mais especificamente os neurônios AgRP, que

desencadeiam respostas adaptativas frente a restrição alimentar, sejam GABAérgicos.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo mostrou que existem diversas regiões encefálicas responsivas ao hormônio do crescimento, sendo várias delas GABAérgicas, glutamatérgicas ou ambas. A falta de GHR em neurônios GABAérgicos parece aumentar a secreção de GH proporcionando um crescimento dos animais acima do normal, provavelmente devido a falta de feedback negativo em neurônios hipotalâmicos. A ação do GH em neurônios glutamatérgicos parece ser importante para regulação do consumo alimentar e homeostase glicêmica. Por fim, parece que em situações de extrema escassez de alimento, o GH age em neurônios GABAérgicos gerando adaptações metabólicas para economia de energia. Esse trabalho contribui para o melhor entendimento do papel do GH no SNC para a regulação do balanço energético e homeostase glicêmica e na identificação da identidade neuroquímica de neurônios responsivos por ele.

7 REFERÊNCIAS

ABDALLA, M. M. Central and peripheral control of food intake. **Endocr Regul**, v. 51, n. 1, p. 52-70, Jan 2017. ISSN 1210-0668. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28222022> >.

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**, v. 6, p. 53-80, Jan 2006. ISSN 1537-744X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432628> >.

AIRES, M. D. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2012.

ARMSTRONG, D. M. et al. Co-localization of choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase within neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus. **J Chem Neuroanat**, v. 3, n. 2, p. 133-40, 1990 Mar-Apr 1990. ISSN 0891-0618. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1971179> >.

ASHPOLE, N. M. et al. Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging brain. **Exp Gerontol**, v. 68, p. 76-81, Aug 2015. ISSN 1873-6815. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25300732> >.

BAI, L. et al. Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. **J Biol Chem**, v. 276, n. 39, p. 36764-9, Sep 2001. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11432869> >.

BEN-ARI, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 9, p. 728-39, Sep 2002. ISSN 1471-003X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209121> >.

BENGTSSON, B. A. et al. Treatment of adults with growth hormone (GH) deficiency with recombinant human GH. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 76, n. 2, p. 309-17, Feb 1993. ISSN 0021-972X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8432773> >.

BERGLUND, E. D. et al. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 3, p. 1000-9, Mar 2012. ISSN 1558-8238. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22326958> >.

BERRYMAN, D. E. et al. Comparing adiposity profiles in three mouse models with altered GH signaling. **Growth Horm IGF Res**, v. 14, n. 4, p. 309-18, Aug 2004. ISSN 1096-6374. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231300> >.

BORGIUS, L. et al. A transgenic mouse line for molecular genetic analysis of excitatory glutamatergic neurons. **Mol Cell Neurosci**, v. 45, n. 3, p. 245-57, Nov 2010. ISSN 1095-9327. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600924> >.

BOUGNERES, P. F. et al. Effects of hypopituitarism and growth hormone replacement therapy on the production and utilization of glucose in childhood. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 61, n. 6, p. 1152-7, Dec 1985. ISSN 0021-972X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3902870> >.

BRASHEAR, H. R.; ZABORSZKY, L.; HEIMER, L. Distribution of GABAergic and cholinergic neurons in the rat diagonal band. **Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 439-51, Feb 1986. ISSN 0306-4522. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3517690> >.

BRETON-PROVENCHER, V.; SUR, M. Active control of arousal by a locus coeruleus GABAergic circuit. **Nat Neurosci**, v. 22, n. 2, p. 218-228, 02 2019. ISSN 1546-1726. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30643295> >.

CADY, G. et al. Hypothalamic growth hormone receptor (GHR) controls hepatic glucose production in nutrient-sensing leptin receptor (LepRb) expressing neurons. **Mol Metab**, v. 6, n. 5, p. 393-405, 05 2017. ISSN 2212-8778. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28462074> >.

CARNAGARIN, R. et al. Autonomic Regulation of Glucose Homeostasis: a Specific Role for Sympathetic Nervous System Activation. **Curr Diab Rep**, v. 18, n. 11, p. 107, 09 2018. ISSN 1539-0829. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30232652> >.

CHEN, H. L.; ROMSOS, D. R. A single intracerebroventricular injection of dexamethasone elevates food intake and plasma insulin and depresses metabolic rates in adrenalectomized obese (ob/ob) mice. **J Nutr**, v. 125, n. 3, p. 540-5, Mar 1995. ISSN 0022-3166. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876929> >.

COSCHIGANO, K. T. et al. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3799-810, Sep 2003. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933651> >.

COSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 5. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

DANIEL DAMIANI, D. D. **Sinalização cerebral do apetite: Rev Bras Clin Med**: 138-145 p. 2011.

DARNELL, J. E.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, v. 264, n. 5164, p. 1415-21, Jun 1994. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8197455> >.

DAUGAARD, J. R. et al. Insulin action in growth hormone-deficient and age-matched control rats: effect of growth hormone treatment. **J Endocrinol**, v. 160, n. 1, p. 127-35, Jan 1999. ISSN 0022-0795. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9854184> >.

DAVIDSON, M. B. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. **Endocr Rev**, v. 8, n. 2, p. 115-31, May 1987. ISSN 0163-769X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3301316> >.

DOMINICI, F. P. et al. The dwarf mutation decreases high dose insulin responses in skeletal muscle, the opposite of effects in liver. **Mech Ageing Dev**, v. 124, n. 7, p. 819-27, Jul 2003. ISSN 0047-6374. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875745> >.

_____. Compensatory alterations of insulin signal transduction in liver of growth hormone receptor knockout mice. **J Endocrinol**, v. 166, n. 3, p. 579-90, Sep 2000. ISSN 0022-0795. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974652> >.

DONATO, J. et al. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. **J Clin Invest**, v. 121, n. 1, p. 355-68, Jan 2011. ISSN 1558-8238. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21183787> >.

EGECIOGLU, E. et al. Growth hormone receptor deficiency results in blunted ghrelin feeding response, obesity, and hypolipidemia in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 290, n. 2, p. E317-25, Feb 2006. ISSN 0193-1849. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16174655> >.

ERICKSON, J. C.; HOLLOPETER, G.; PALMITER, R. D. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1704-7, Dec 1996. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939859> >.

EYIGOR, O.; LIN, W.; JENNES, L. Identification of neurones in the female rat hypothalamus that express oestrogen receptor-alpha and vesicular glutamate transporter-2. **J Neuroendocrinol**, v. 16, n. 1, p. 26-31, Jan 2004. ISSN 0953-8194. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14962072> >.

FENSELAU, H. et al. A rapidly acting glutamatergic ARC→PVH satiety circuit postsynaptically regulated by α -MSH. **Nat Neurosci**, v. 20, n. 1, p. 42-51, 01 2017. ISSN 1546-1726. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27869800> >.

FODOR, M.; KORDON, C.; EPELBAUM, J. Anatomy of the hypophysiotropic somatostatinergic and growth hormone-releasing hormone system minireview. **Neurochem Res**, v. 31, n. 2, p. 137-43, Feb 2006. ISSN 0364-3190. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16586030> >.

FREMEAU, R. T. et al. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 22, p. 14488-93, Oct 2002. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388773> >.

FURIGO, I. C. et al. Growth hormone enhances the recovery of hypoglycemia. **FASEB J**, v. 33, n. 11, p. 11909-11924, 11 2019. ISSN 1530-6860. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31366244> >.

_____. Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- α and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. **Brain Res**, v. 1566, p. 47-59, May 2014. ISSN 1872-6240. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24751572> >.

_____. Distribution of growth hormone-responsive cells in the mouse brain. **Brain Struct Funct**, v. 222, n. 1, p. 341-363, 01 2017. ISSN 1863-2661. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27072946> >.

_____. Growth hormone regulates neuroendocrine responses to weight loss via AgRP neurons. **Nat Commun**, v. 10, n. 1, p. 662, 02 2019. ISSN 2041-1723. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30737388> >.

_____. STAT5 ablation in AgRP neurons increases female adiposity and blunts food restriction adaptations. **J Mol Endocrinol**, v. 64, n. 1, p. 13-27, Jan 2020. ISSN 1479-6813. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31756168> >.

GHAMARI-LANGROUDI, M. et al. Regulation of energy rheostasis by the melanocortin-3 receptor. **Sci Adv**, v. 4, n. 8, p. eaat0866, Aug 2018. ISSN 2375-2548. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30140740> >.

GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

GRAS, C. et al. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. **J Neurosci**, v. 22, n. 13, p. 5442-51, Jul 2002. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097496> >.

HATAYA, Y. et al. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 9, p. 4552, Sep 2001. ISSN 0021-972X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549707> >.

HAUCK, S. J. et al. Reduced levels of thyroid hormones, insulin, and glucose, and lower body core temperature in the growth hormone receptor/binding protein knockout mouse. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 226, n. 6, p. 552-8, Jun 2001. ISSN 1535-3702. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395925> >.

HAYAKAWA, T. et al. Distribution and ultrastructure of dopaminergic neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus projecting to the stomach of the rat. **Brain Res**, v. 1006, n. 1, p. 66-73, Apr 2004. ISSN 0006-8993. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15047025> >.

HERRINGTON, J. et al. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. **Oncogene**, v. 19, n. 21, p. 2585-97, May 2000. ISSN 0950-9232. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10851057> >.

HERZOG, E. et al. Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. **Neuroscience**, v. 123, n. 4, p. 983-1002, 2004. ISSN 0306-4522. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751290> >.

HOPWOOD, N. J. et al. Hypoglycemia in hypopituitary children. **Am J Dis Child**, v. 129, n. 8, p. 918-26, Aug 1975. ISSN 0002-922X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/169689> >.

HRABOVŠKY, E. et al. Distribution of type 1 cannabinoid receptor-expressing neurons in the septal-hypothalamic region of the mouse: colocalization with GABAergic and glutamatergic markers. **J Comp Neurol**, v. 520, n. 5, p. 1005-20, Apr 2012. ISSN 1096-9861. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21935941> >.

HUSSAIN, K.; HINDMARSH, P.; AYSLEY-GREEN, A. Spontaneous hypoglycemia in childhood is accompanied by paradoxically low serum growth hormone and appropriate cortisol counterregulatory hormonal responses. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 8, p. 3715-23, Aug 2003. ISSN 0021-972X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915660> >.

JIANG, Y.; BABIC, T.; TRAVAGLI, R. A. Sex differences in GABAergic neurotransmission to rat DMV neurons. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**,

v. 317, n. 4, p. G476-G483, 10 2019. ISSN 1522-1547. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31393788> >.

JIN, X. et al. GABAergic synaptic inputs of locus coeruleus neurons in wild-type and Mecp2-null mice. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 304, n. 9, p. C844-57, May 2013. ISSN 1522-1563. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23392116> >.

KALLÓ, I. et al. Area-specific analysis of the distribution of hypothalamic neurons projecting to the rat ventral tegmental area, with special reference to the GABAergic and glutamatergic efferents. **Front Neuroanat**, v. 9, p. 112, 2015. ISSN 1662-5129. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26388742> >.

KAWABATA-SAKATA, Y. et al. Androgen-dependent sexual dimorphism in pituitary tryptophan hydroxylase expression: relevance to sex differences in pituitary hormones. **Proc Biol Sci**, v. 287, n. 1928, p. 20200713, Jun 2020. ISSN 1471-2954. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32517612> >.

KIM, S. H.; PARK, M. J. Effects of growth hormone on glucose metabolism and insulin resistance in human. **Ann Pediatr Endocrinol Metab**, v. 22, n. 3, p. 145-152, Sep 2017. ISSN 2287-1012. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29025199> >.

KLIEVERIK, L. P. et al. Thyroid hormone modulates glucose production via a sympathetic pathway from the hypothalamic paraventricular nucleus to the liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 14, p. 5966-71, Apr 2009. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19321430> >.

KRASHES, M. J. et al. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. **J Clin Invest**, v. 121, n. 4, p. 1424-8, Apr 2011. ISSN 1558-8238. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364278> >.

_____. Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. **Cell Metab**, v. 18, n. 4, p. 588-95, Oct 2013. ISSN 1932-7420. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24093681> >.

LAI, Z. N. et al. Characterization of putative growth hormone receptors in human choroid plexus. **Brain Res**, v. 546, n. 2, p. 222-6, Apr 1991. ISSN 0006-8993. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2070259> >.

LE GREVÈS, M. et al. Growth hormone replacement in hypophysectomized rats affects spatial performance and hippocampal levels of NMDA receptor subunit and PSD-95 gene transcript levels. **Exp Brain Res**, v. 173, n. 2, p. 267-73, Aug 2006. ISSN 0014-4819. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16633806> >.

LIN, W. et al. Distribution of vesicular glutamate transporter-2 messenger ribonucleic Acid and protein in the septum-hypothalamus of the rat. **Endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 662-70, Feb 2003. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538629> >.

LIU, N. et al. Mode of the autocrine/paracrine mechanism of growth hormone action. **Exp Cell Res**, v. 237, n. 1, p. 196-206, Nov 1997. ISSN 0014-4827. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9417883> >.

MALLICK, B. N.; KAUR, S.; SAXENA, R. N. Interactions between cholinergic and GABAergic neurotransmitters in and around the locus coeruleus for the induction and maintenance of rapid eye movement sleep in rats. **Neuroscience**, v. 104, n. 2, p. 467-85, 2001. ISSN 0306-4522. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11377848> >.

MARSHALL, C. J. et al. Defining Subpopulations of Arcuate Nucleus GABA Neurons in Male, Female, and Prenatally Androgenized Female Mice. **Neuroendocrinology**, v. 105, n. 2, p. 157-169, 2017. ISSN 1423-0194. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27710963> >.

MARTY, A.; LLANO, I. Excitatory effects of GABA in established brain networks. **Trends Neurosci**, v. 28, n. 6, p. 284-9, Jun 2005. ISSN 0166-2236. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927683> >.

MATSUNAGA, H. et al. The relative importance of nervous system and hormones to the 2-deoxy-D-glucose-induced hyperglycemia in fed rats. **Endocrinology**, v. 124, n. 3, p. 1259-64, Mar 1989. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2563682> >.

MYERS, M. G. Metabolic sensing and regulation by the hypothalamus. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 5, p. E809, May 2008. ISSN 0193-1849. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451261> >.

MØLLER, N.; JØRGENSEN, J. O. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. **Endocr Rev**, v. 30, n. 2, p. 152-77, Apr 2009. ISSN 1945-7189. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19240267> >.

NECTOW, A. R. et al. Identification of a Brainstem Circuit Controlling Feeding. **Cell**, v. 170, n. 3, p. 429-442.e11, Jul 2017. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28753423> >.

NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. Porto Alegre: Artmed,, 2014.

NYBERG, F. Growth hormone in the brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. **Front Neuroendocrinol**, v. 21, n. 4, p. 330-48, Oct 2000. ISSN 0091-3022. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11013068> >.

OWENS, D. F.; KRIEGSTEIN, A. R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 9, p. 715-27, Sep 2002. ISSN 1471-003X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209120> >.

PAES, A. M. et al. Acetylcholinesterase activity changes on visceral organs of VMH lesion-induced obese rats. **Int J Neurosci**, v. 116, n. 11, p. 1295-302, Nov 2006. ISSN 0020-7454. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17000530> >.

PAN, W. W.; MYERS, M. G. Leptin and the maintenance of elevated body weight. **Nat Rev Neurosci**, v. 19, n. 2, p. 95-105, Feb 2018. ISSN 1471-0048. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29321684> >.

PASCOE, W. S.; SMYTHE, G. A.; STORLIEN, L. H. 2-deoxy-D-glucose-induced hyperglycemia: role for direct sympathetic nervous system activation of liver glucose output. **Brain Res**, v. 505, n. 1, p. 23-8, Dec 1989. ISSN 0006-8993. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2611676> >.

PEDROSO, J. A. et al. Changes in Leptin Signaling by SOCS3 Modulate Fasting-Induced Hyperphagia and Weight Regain in Mice. **Endocrinology**, v. 157, n. 10, p. 3901-3914, Oct 2016. ISSN 1945-7170. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27471877> >.

PINTO, S. et al. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 110-5, Apr 2004. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064421> >.

PLUMMER, N. W. et al. Two Subpopulations of Noradrenergic Neurons in the Locus Coeruleus Complex Distinguished by Expression of the Dorsal Neural Tube Marker. **Front Neuroanat**, v. 11, p. 60, 2017. ISSN 1662-5129. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28775681> >.

QUARESMA, P. G. F. et al. Growth hormone/STAT5 signaling in proopiomelanocortin neurons regulates glucoprivic hyperphagia. **Mol Cell Endocrinol**, v. 498, p. 110574, 12 2019. ISSN 1872-8057. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31494175> >.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ROOT, D. H. et al. Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 11, p. 1543-51, Nov 2014. ISSN 1546-1726. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242304> >.

_____. Selective Brain Distribution and Distinctive Synaptic Architecture of Dual Glutamatergic-GABAergic Neurons. **Cell Rep**, v. 23, n. 12, p. 3465-3479, 06 2018. ISSN 2211-1247. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29924991> >.

ROUTH, V. H. Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. **Sensors (Basel)**, v. 10, n. 10, p. 9002-25, 2010. ISSN 1424-8220. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22022208> >.

RUDY, B. et al. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. **Dev Neurobiol**, v. 71, n. 1, p. 45-61, Jan 2011. ISSN 1932-846X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21154909> >.

SANDOVAL, D.; COTA, D.; SEELEY, R. J. The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. **Annu Rev Physiol**, v. 70, p. 513-35, 2008. ISSN 0066-4278. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17988209> >.

SATHIAVAGEESWARAN, M. et al. Effects of GH on cognitive function in elderly patients with adult-onset GH deficiency: a placebo-controlled 12-month study. **Eur J Endocrinol**, v. 156, n. 4, p. 439-47, Apr 2007. ISSN 0804-4643. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389458> >.

SHIMAZU, T.; MINOKOSHI, Y. Systemic Glucoregulation by Glucose-Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH). **J Endocr Soc**, v. 1, n. 5, p. 449-459, May 2017. ISSN 2472-1972. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29264500> >.

SILVEIRA, M. A. et al. Acute effects of somatomammotropin hormones on neuronal components of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. **Brain Res**, v. 1714, p. 210-217, 07 2019. ISSN 1872-6240. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30851245> >.

SMOLDERS, I. et al. In vivo modulation of extracellular hippocampal glutamate and GABA levels and limbic seizures by group I and II metabotropic glutamate receptor ligands. **J Neurochem**, v. 88, n. 5, p. 1068-77, Mar 2004. ISSN 0022-3042. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009663> >.

SÁINZ, N. et al. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. **Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 35-46, Jan 2015. ISSN 1532-8600. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25497342> >.

TEIXEIRA, P. D. S. et al. Central growth hormone action regulates metabolism during pregnancy. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 317, n. 5, p. E925-E940, 11 2019. ISSN 1522-1555. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31479305> >.

TENNESE, A. A.; WEVRICK, R. Impaired hypothalamic regulation of endocrine function and delayed counterregulatory response to hypoglycemia in Magel2-null mice. **Endocrinology**, v. 152, n. 3, p. 967-78, Mar 2011. ISSN 1945-7170. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248145> >.

TOUSSAY, X. et al. Locus coeruleus stimulation recruits a broad cortical neuronal network and increases cortical perfusion. **J Neurosci**, v. 33, n. 8, p. 3390-401, Feb 2013. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23426667> >.

URBAN-CIECKO, J.; BARTH, A. L. Somatostatin-expressing neurons in cortical networks. **Nat Rev Neurosci**, v. 17, n. 7, p. 401-9, 07 2016. ISSN 1471-0048. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27225074> >.

UYAMA, N.; GEERTS, A.; REYNAERT, H. Neural connections between the hypothalamus and the liver. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 280, n. 1, p. 808-20, Sep 2004. ISSN 1552-4884. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15382020> >.

VAN DEN POL, A. N. et al. Defining the caudal hypothalamic arcuate nucleus with a focus on anorexic excitatory neurons. **J Physiol**, v. 597, n. 6, p. 1605-1625, Mar 2019. ISSN 1469-7793. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30618146> >.

VAN NIEUWPOORT, I. C.; DRENT, M. L. Cognition in the adult with childhood-onset GH deficiency. **Eur J Endocrinol**, v. 159 Suppl 1, p. S53-7, Dec 2008. ISSN 1479-683X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18787050> >.

VONG, L. et al. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. **Neuron**, v. 71, n. 1, p. 142-54, Jul 2011. ISSN 1097-4199. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21745644> >.

WANG, H. L. et al. Rewarding Effects of Optical Stimulation of Ventral Tegmental Area Glutamatergic Neurons. **J Neurosci**, v. 35, n. 48, p. 15948-54, Dec 2015. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26631475> >.

WASINSKI, F. et al. Tyrosine Hydroxylase Neurons Regulate Growth Hormone Secretion via Short-Loop Negative Feedback. **J Neurosci**, v. 40, n. 22, p. 4309-

4322, May 2020. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32317389> >.

WINDISCH, K. A.; CZACHOWSKI, C. L. Effects of group II metabotropic glutamate receptor modulation on ethanol- and sucrose-seeking and consumption in the rat. **Alcohol**, v. 66, p. 77-85, 02 2018. ISSN 1873-6823. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29220747> >.

XU, J. et al. Genetic identification of leptin neural circuits in energy and glucose homeostases. **Nature**, v. 556, n. 7702, p. 505-509, 04 2018. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29670283> >.

YI, C. X. et al. The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1802, n. 4, p. 416-31, Apr 2010. ISSN 0006-3002. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060897> >.

ZHAI, Q. et al. Characterization of growth hormone binding sites in rat brain. **Acta Paediatr Suppl**, v. 406, p. 92-5, Dec 1994. ISSN 0803-5326. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7734820> >.

ZHANG, X.; VAN DEN POL, A. N. Dopamine/Tyrosine Hydroxylase Neurons of the Hypothalamic Arcuate Nucleus Release GABA, Communicate with Dopaminergic and Other Arcuate Neurons, and Respond to Dynorphin, Met-Enkephalin, and Oxytocin. **J Neurosci**, v. 35, n. 45, p. 14966-82, Nov 2015. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26558770> >.

ZHAO, T. J. et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 16, p. 7467-72, Apr 2010. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20231469> >.