

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica

**Estudo da importância da transmissão GABAérgica sobre os efeitos
biológicos mediados pelos neurônios que expressam somatostatina**

Aluna: Lígia Maria Martins de Sousa
Orientador: Prof. Dr. José Donato Júnior

São Paulo

2023

Lígia Maria Martins de Sousa

Estudo da importância da transmissão GABAérgica sobre os efeitos biológicos mediados pelos neurônios que expressam somatostatina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Anatomia morfofuncional

Orientador: Prof. Dr. José Donato Júnior

São Paulo

2023

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)

Martins de Sousa, Lígia Maria
Estudo da importância da transmissão GABAérgica
sobre os efeitos biológicos mediados pelos neurônios
que expressam somatostatina / Lígia Maria Martins
de Sousa; orientador José Donato Júnior. -- São
Paulo, 2023.
58 p.

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

1. Somatostatina. 2. GABA. 3. Metabolismo. 4.
Sociedade. I. Donato Júnior, José , orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lúgia Maria Martins de Sousa

Título da Dissertação/Tese:

Estudo da importância da transmissão GABAérgica sobre os efeitos biológicos mediados pelos neurônios que expressam somatostatina

Orientador: José Donato Júnior

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:
.....

Instituição:

.....

Examinador(a): Assinatura:

.....

Nome:

.....

Instituição:

.....

Presidente: Assinatura:

.....

Nome:

.....

Instituição:

.....

Dedicatória

Dedico essa dissertação ao meu Senhor Jesus, pois sem Ele nada disso seria possível. É Ele que me dá forças e me lembra constantemente do meu propósito nesta terra.

Dedico à minha família, em especial meus pais, minha irmã e meu noivo, por sempre me apoiarem de todas as formas possíveis para que esse sonho se tornasse realidade. Sem as palavras de conforto e consolo de vocês nos momentos mais difíceis, eu não teria chegado até aqui.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, pela orientação tão detalhada e próxima. Agradeço por todo incentivo, empenho e tempo investidos não apenas para a execução deste trabalho, mas também em mim. Muito obrigada pela oportunidade de aprender tanto com você.

Agradeço a todos que fazem parte do laboratório: Aninha, Will, Mari, Dani, Gabis, Maria e Fred, que ajudaram direta ou indiretamente, não apenas tirando dúvidas ou ensinando algo, mas também fazendo nossa rotina se tornar mais leve. Em especial, agradeço a nossa querida técnica Aninha, por sempre ser tão amável e prestativa. As suas palavras e abraços sempre me trouxeram conforto. Agradeço também a Mari, que me ensinou tanto desde que cheguei no laboratório, obrigada por todo seu tempo e paciência gastos comigo.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

“Bendito seja o Senhor, a minha Rocha, que treina as minhas mãos para a guerra e os meus dedos para a batalha. Ele é o meu aliado fiel, a minha fortaleza, a minha torre de proteção e o meu libertador, é o meu escudo, aquele em quem me refugio”.

Salmos 144. 1-2

Resumo

A somatostatina (SST) é um peptídeo com ação predominantemente inibitória no sistema nervoso central (SNC), conhecida principalmente por ser um potente regulador do eixo hipotálamo-hipófise na secreção do hormônio do crescimento (GH). Contudo, além do controle neuroendócrino, a SST desempenha outras ações no SNC, incluindo regulação de aspectos cognitivos, como ansiedade, e da ingestão alimentar. Em diversos núcleos encefálicos, neurônios que expressam a SST também co-liberam o ácido gama aminobutírico (GABA), sendo este o principal neurotransmissor com efeito inibitório no SNC. Para que o neurônio secrete GABA durante a neurotransmissão sináptica, ele necessita do transportador de aminoácidos inibidores vesiculares (VGAT), responsável por armazenar o GABA na vesícula sináptica. Evidências mostram que a deleção genética da VGAT impede que a célula consiga liberar GABA. Uma vez que a SST e o GABA têm efeitos inibitórios, é do interesse tentar identificar a função isolada desses neurotransmissores sobre as funções reguladas por essas células. Assim, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar os efeitos fisiológicos da deleção genética da VGAT em células que expressam SST sobre aspectos metabólicos e comportamentais. A deleção genética da VGAT foi feita por meio da tecnologia cre-loxP. Nossos resultados demonstram que a deleção da transmissão GABAérgica nos neurônios que expressam SST afeta a sobrevivência dos animais. Os animais nocautes não conseguem sobreviver após a quarta semana de vida, embora tenham peso similar ao nascimento. Observamos que por volta do 16º ao 17º dia de vida os animais nocautes apresentam redução acentuada no ganho de peso em comparação ao grupo controle. Essa redução persiste até a morte dos animais. Os animais nocautes apresentaram redução do consumo de ração o que ajuda a explicar sua perda de peso. Então avaliamos se uma ração altamente palatável rica em gordura (HFD), poderia afetar a sobrevivência dos animais nocautes. Surpreendentemente, foi possível prolongar o tempo de sobrevivência de parte dos animais em comparação aos animais nocautes que receberam a ração padrão. Porém, ao substituir a dieta HFD desses animais pela ração padrão na sétima semana de vida, os animais nocautes voltaram a perder peso e conseqüentemente morreram. Com base nesses resultados pudemos observar

que os animais morriam por inanição o que poderia ser prevenido em parte dos animais pela oferta de dieta palatável. Constatado o fenótipo, passamos a investigar quais regiões encefálicas que regulam a ingestão alimentar apresentam neurônios que expressam SST ou são inervadas por fibras somatostatinérgicas. Por meio de imunofluorescência, observamos que o núcleo arqueado, o núcleo tuberal do hipotálamo, núcleo central da amígdala e o núcleo intersticial da estria terminal possuem grande quantidade de neurônios que expressam SST e são regiões predominantemente GABAérgicas. Por outro lado, o núcleo do trato solitário e o núcleo parabraquial lateral são áreas envolvidas com o controle da saciedade e que recebem densa inervação de fibras expressando SST. Assim, é possível que a ausência da transmissão GABAérgica para algumas dessas regiões encefálicas causa desinibição e forte saciedade, mediando o efeito observado sobre a ingestão alimentar e peso corporal. Esses resultados ilustram a dinâmica complexa e sensitiva das redes de sinalização GABAérgica que controlam apetite e a palatabilidade pela comida e o possível envolvimento da transmissão GABAérgica pelos neurônios SST.

Palavras-chave: Somatostatina, GABA, metabolismo, saciedade.

Study of the importance of GABAergic transmission on the biological effects mediated by somatostatin-expressing neurons

Somatostatin (SST) is a peptide with predominantly inhibitory action in the central nervous system (CNS), known mainly for being a potent regulator of the hypothalamic-pituitary axis in the secretion of growth hormone (GH). However, in addition to neuroendocrine control, SST plays other actions in the CNS, including regulation of cognitive aspects such as anxiety and food intake. In several brain nuclei, neurons that express SST also co-release gamma aminobutyric acid (GABA), which is the main neurotransmitter with inhibitory effect on the CNS. For the neuron to secrete GABA during synaptic neurotransmission, it needs the vesicular inhibitor amino acid transporter (VGAT), responsible for storing GABA in the synaptic vesicle. Evidence shows that genetic deletion of VGAT prevents the cell from releasing GABA. Since SST and GABA have inhibitory effects, it is of interest to try to identify the isolated function of these neurotransmitters on the functions regulated by these cells. Thus, the objective of our study was to evaluate the physiological effects of VGAT deletion in cells expressing SST on metabolic and behavioral aspects. The genetic deletion of VGAT was made through cre-loxP technology. Our results demonstrate that the deletion of GABAergic transmission in neurons expressing SST affects the survival of animals. Knockout animals can not survive after the fourth week of life, although they have similar birth weight. We observed that, around the 16th to the 17th day of life, knockouts showed a marked reduction in weight gain compared to the control group. This reduction persists until the animals died. The knockouts showed reduced food intake which helps explain their weight loss. So we evaluated whether a highly palatable chow, like a high-fat diet (HFD), could affect the survival of knockout animals. Surprisingly, it was possible to prolong the survival time of part of the animals compared to the knockouts that received the standard ration. However, by replacing the HFD of these animals with the standard chow in the seventh week of life, the knockout animals lost weight again and consequently died. Based on these results we could observe that the animals died from starvation which could be prevented in part by the offer of palatable diet. Once the phenotype is verified, we began to investigate which brain regions that regulate food intake have neurons that express SST or are innervated by

somatostatinergic fibers. Through immunofluorescence, it was observed that the arched nucleus, the tuberal nucleus of the hypothalamus, the central nucleus of the amygdala and the interstitial nucleus of the stria terminalis have a large amount of neurons expressing SST and are predominantly GABAergic regions. On the other hand, the nucleus of the solitary tract and the lateral parabrachial nucleus are areas involved with satiety control and that receive dense innervation of fibers expressing TSS. Thus, it is possible that the absence of GABAergic transmission to some of these brain regions causes disinhibition and strong satiety, mediating the effect observed on food intake and body weight. These results illustrate the complex and sensitive dynamics of GABAergic signaling networks that control appetite and palatability by food and the possible involvement of GABAergic transmission by SST neurons.

Keywords: Somatostatin, GABA, metabolism, satiety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circuito esquemático de núcleos encefálicos relacionados com o controle da saciedade..	25
Figura 2. Acompanhamento da curva de sobrevivência dos animais controle e nocautes ($SST^{\Delta VGAT}$)..	34
Figura 3. Teste de lactação em animais controle e nocautes ($SST^{\Delta VGAT}$) com 10 dias de vida..	35
Figura 4. Acompanhamento da curva de sobrevivência dos animais controle e nocautes ($SST^{\Delta VGAT}$) em dieta padrão e dieta umedecida..	36
Figura 5. Probabilidade de sobrevivência entre animais controles e $SST^{\Delta VGAT}$ com dieta rica em gordura (HFD)..	37
Figura 6. Fotomicrografias de fluorescência ilustrando a localização encefálica de neurônios somatostatina (SST) relacionados com o controle da ingestão alimentar.....	38
Figura 7. Fotomicrografias de fluorescência demonstrando a inervação de neurônios SST no PBNL..	39
Figura 8. Fotomicrografias de fluorescência mostrando ativação neuronal por meio da proteína Fos..	40
Figura 9. Fotomicrografias marcadas com imunofluorescência para Fos, CGRP e Fluoro-Gold em magenta e AgRP, CGRP, SST e TH em verde..	41
Figura 10. Fotomicrografias marcadas com imunofluorescência para Fluoro-Gold (magenta) e SST (verde) em diferentes regiões encefálicas que enviam projeções para o PBN..	42
Figura 11. Co-localização de neurônios que expressam SST do núcleo intersticial da estria terminal (BSTN) que projetam-se para o PBN.....	42
Figura 12. Fotomicrografias marcadas com imunofluorescência para Fluoro-Gold (magenta), SST e PKC δ (verde).....	43
Figura 13. Administração de CNO e salina em animais SST^{cre} e controles para avaliar o consumo alimentar.....	44
Figura 14. Parâmetros avaliados no teste de campo aberto em P14, P21 e P49.....	46

Figura 15. Parâmetros avaliados no teste de labirinto em cruz elevada em P49..... 47

LISTA DE ABREVIATURAS

5HT – serotonina

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

AgRP – peptídeo relacionado com o gene da agouti

AgRP^{cre} - animais que expressam a enzima Cre Recombinase sob o controle dos promotores do gene do peptídeo relacionado com a agouti

AMPc - monofosfato de adenosina cíclico

ARH – núcleo arqueado do hipotálamo

BSTN – núcleo intersticial da estria terminal

CA^{NTS} – neurônios catecolaminérgicos do núcleo do trato solitário

CeA- núcleo central da amígdala

CCK - colecistocinina

CGRP – proteína relacionada com o gene da calcitonina

CRH - hormônio liberador de corticotrofina

DBH – dopamina beta-hidroxilase

DNA – ácido desoxirribonucleico

DREADDs – receptores sintéticos ativados exclusivamente por drogas artificiais

GABA – ácido gama-aminobutírico

GAD – enzima glutamato descarboxilase

eGFP- proteína fluorescente verde

GH- hormônio do crescimento

GHRH – hormônio liberador de GH

GLP-1 – peptídeo semelhante ao glucagon 1

HDB – núcleo diagonal da banda de Broca

HFD - dieta rica em gordura

Htr2a - receptor de serotonina

i.p - intraperitoneal

IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina

KPBS - tampão de fosfato de potássio

KPBST – tampão de fosfato de potássio com triton

LTP - potenciação de longa duração

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NPY - neuropeptídeo Y

NTS – núcleo do trato solitário

PBN – núcleo parabraquial

PBNL – núcleo parabraquial lateral

PBS - salina tamponada com sódio

PCR – reação em cadeia da polimerase

PKC δ – proteína quinase C

PVH - núcleo paraventricular do hipotálamo

SNC - sistema nervoso central

SST – somatostatina

SST^{cre} - animais que expressam a enzima Cre Recombinase sob o controle dos promotores do gene somatostatina

SST ^{Δ VGAT} - camundongos homocigotos para o alelo VGAT^{flox} e carregando Cre

SSTRs - receptores de somatostatina

TH – tirosina hidroxilase

TRH - hormônio liberador de tireotrofina

TN – núcleo tuberal do hipotálamo

VGAT – transportador de aminoácidos inibidores vesiculares

VGAT^{fllox} - camundongos que possuem o gene *Slc32a1* (VGAT) flanqueado por sítios LoxP

Sumário

Introdução	21
1.1 Distribuição de neurônios somatostatina	22
1.2 Ação da somatostatina no controle neuroendócrino	22
1.3 Ação da somatostatina no controle do metabolismo	23
1.4 Ação da somatostatina na regulação comportamental	26
1.5 Somatostatina e GABA	27
Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
Material e métodos	29
3.1 Animais	29
3.1.1 Avaliação do fenótipo	29
3.2 Avaliação do consumo alimentar	30
3.2.1 Teste de lactação	30
3.3 Avaliação das dietas	30
3.3.1 Teste com ração umedecida.....	30
3.3.2 Teste com dieta palatável (High fat diet)	30
3.4 Avaliação do comportamento	31
3.4.1 Campo aberto	31
3.4.2 Labirinto em cruz elevada	31
3.5 Experimento com ligantes sintéticos (DREADDS)	31
3.6 Eutanásia	31
3.7 Histologia.....	32
3.7.1 Perfusão e microtomia.....	32
3.7.2 Imunofluorescência.....	33
3.8 Análise estatística	33
Resultados	34
4.1 Camundongos deficientes da proteína VGAT em células SST não conseguem sobreviver por mais de 4 semanas de vida.....	34
4.2 Avaliação do consumo alimentar.....	35
4.3 Avaliação de diferentes dietas.....	35

4.4 Análise das vias somatostatinérgicas centrais	37
4.5 Ativação de neurônios do CeA por ligantes sintéticos (CNO) não altera o consumo alimentar	43
4.6 Avaliação comportamental dos camundongos com deleção da VGAT em células SST	44
Discussão	48
Conclusão	55
Referências	56

INTRODUÇÃO

A somatostatina (SST) é um neuropeptídeo sintetizada a partir de um pró-hormônio (pro-somatostatina) que produz duas formas ativas, a SST-14 e SST-28, sendo a primeira predominantemente expressa no sistema nervoso central (SNC), enquanto a SST-28 é produzida por células de outros tecidos, como o pâncreas (LIGUZ-LECZAR; URBAN-CIECKO and KOSSUT, 2016). No SNC, a SST desempenha múltiplas ações, incluindo controle neuroendócrino, regulação de aspectos cognitivos, como ansiedade, e regulação da ingestão alimentar. Por exemplo, do ponto de vista da ação neuroendócrina, a SST é um potente regulador do eixo hipotálamo-hipófise por sua regulação na secreção do hormônio do crescimento (GH) (STENGEL et al., 2015).

De maneira geral, a SST e a ativação dos seus receptores cognatos (SSTRs) possuem um efeito inibitório sobre as células alvo, tanto a nível do SNC, como nos sistemas periféricos (LIGUZ-LECZAR, URBAN-CIECKO e KOSSUT, 2016). Por isso, as células que expressam SST em geral são consideradas de natureza inibitória (URBAN-CIECKO e BARTH, 2016). A ação da SST é mediada pela sua interação com um dos cinco receptores identificados para SST (SSTR1, SSTR2A e SSTR2B, SSTR3, SSTR4 e SSTR5) (AMPOFO et al., 2020). Uma vez ligada ao SSTR na membrana da célula alvo, que é acoplado à proteína G_i , esse complexo pode inibir enzimas e suas vias de sinalização intracelular, como a adenilato ciclase e fosfotirosinafosfatase, respectivamente (LIGUZ-LECZAR, URBAN-CIECKO e KOSSUT, 2016; AMPOFO et al., 2020). A inibição da adenilato ciclase, por exemplo, impossibilita a síntese de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), frequentemente diminuindo a concentração de cálcio no citosol e assim diminuindo a resposta daquela célula alvo (KATO et al., 2002).

A localização e distribuição dos SSTRs no SNC é ampla, sendo frequente a expressão de diferentes subtipos na mesma célula (LIGUZ-LECZAR, URBAN-CIECKO e KOSSUT, 2016). Após a descoberta da ampla distribuição da SST no encéfalo, foi possível identificar uma variedade de efeitos, como o controle sobre o metabolismo (LUO et al., 2018; KUMAR e SNEHA, 2020; STENGEL et al., 2010a), comportamento (AHRENS et al., 2018), aprendizado e memória (MARTEL et al., 2012) e até funções motoras (MARAZIOTI et al., 2008).

Em determinadas regiões encefálicas, como a amígdala e em algumas áreas do hipotálamo, a SST é co-expressa com o ácido gama-aminobutírico (GABA), sendo este último o principal neurotransmissor inibitório no SNC (OBATA K, 2013; WOJCIK et al., 2006). O GABA é sintetizado a partir do ácido glutâmico pela ação da enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD) e em seguida é armazenado em uma vesícula sináptica denominada transportador de aminoácidos inibidores vesiculares (VGAT) (OBATA K, 2013). Uma vez que o GABA é liberado na fenda sináptica, ele pode ligar-se a receptores do tipo ionotrópicos (GABA_A) ou metabotrópicos (GABA_B) e assim diminuir a resposta daquela célula alvo (SALLARD E, LETOURNEUR D, LEGENDRE P., 2021). Tanto a SST como GABA são neurotransmissores de natureza inibitória. Contudo, pouco se sabe sobre a interação desses neurotransmissores em células que os co-produzem.

1.1 Distribuição de neurônios somatostatina

A SST é altamente expressa em muitas áreas cerebrais, como o hipotálamo, córtex, hipocampo, tronco encefálico, amígdala e regiões sensoriais, como áreas olfatórias e da retina, que são responsáveis por diversas funções (MARTEL et al., 2012; VIOLLET., et al 2008). Além do SNC, ela também é encontrada no trato gastrointestinal, pâncreas e glândula supra renal (KUMAR and SNEHA., 2020). Essa diversidade de localização da SST se dá em virtude da ampla distribuição dos seus receptores, sobretudo no SNC, sendo abundante a expressão no córtex cerebral e hipotálamo (GOEBEL, Miriam et al., 2010). Neurônios que expressam SST podem ser divididos em duas categorias: neurônios com projeções de longo alcance e interneurônios, que agem em circuitos locais (VIOLLET et al., 2008).

1.2 Ação da somatostatina no controle neuroendócrino

A SST desempenha um papel chave no controle de hormônios hipotalâmicos e hipofisários, sendo seu principal alvo neuroendócrino o GH (STEYN et al., 2016). Ela atua juntamente com o hormônio liberador de GH (GHRH) regulando a secreção de GH. Enquanto o GHRH ativa as células somatotróficas, a SST exerce efeito inibitório (STEYN et al., 2016). O GHRH

age abrindo canais de sódio que levam a despolarização da membrana e ao potencial de ação das células somatotróficas, permitindo um influxo de cálcio e assim a liberação do hormônio pelas vesículas (BEM-SHLOMO and SHLOMO MELMED., 2010). Já a SST tem um efeito antagônico, causando uma hiperpolarização na membrana das células somatotróficas ao ativar canais de potássio ou inibir canais de cálcio dependentes de voltagem (VIOLLET et al., 2008). Com a concentração intracelular de cálcio baixa, as vesículas que armazenam o GH não conseguem fazer exocitose, impedindo assim sua liberação (BEM-SHLOMO, and SHLOMO MELMED., 2010). Classicamente a SST age tanto pré- como pós-sinápticamente em uma célula (LIGUZ-LECZGAR; URBAN-CIECKO, and KOSSUT, 2016). Por isso a SST é considerada um neuromodulador do SNC, pois ela age modulando a transmissão sináptica e assim a atividade neuronal (VIOLLET et al., 2008). Dessa forma, seus efeitos sobre as células alvo são essencialmente inibitórios, sendo mediados principalmente pelo SSTR2 (STEYN et al., 2016). Os neurônios hipotalâmicos que expressam a SST projetam seus axônios para a eminência mediana, permitindo a secreção e assim o contato do neuropeptídeo com as células hipofisárias alvo (EIGLER and BEM-SHLOMO, 2014).

A regulação da secreção de SST se dá por sistema de alças de retroalimentação negativas, sendo que a atividades dos neurônios SST é estimulada pelo GH, pelo fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), pelo GHRH, glucagon, acetilcolina e dopamina (EIGLER and BEM-SHLOMO, 2014; MURRAY, HIGHAM e CLAYTON, 2015). Já os fatores inibitórios são mediados pela leptina, glicose e o peptídeo intestinal vasoativo (EIGLER and BEM-SHLOMO, 2014). Além do GH, a SST também inibe a secreção de outros hormônios hipotalâmicos, como o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e também de neurotransmissores como a dopamina e noradrenalina (BEM-SHLOMO and SHLOMO MELMED., 2010).

1.3 Ação da somatostatina no controle do metabolismo

Além do papel neuroendócrino, a SST desempenha um importante papel no controle do metabolismo, pois regula a longo prazo a homeostase energética, a partir de um efeito orexígeno (LUO et al., 2018; KUMAR e SNEHA, 2020;

STENGEL et al., 2010a). Um estudo demonstrou que a ablação de neurônios SST do núcleo tuberal do hipotálamo reduziu o consumo alimentar e ganho de peso em camundongos, revelando o papel crucial dessa população neuronal em estimular fome e portanto, em regular o comportamento alimentar (LUO et al., 2018). Outros dados demonstram que injeção intracerebroventricular de um agonista do receptor de SST estimula o consumo alimentar em roedores por ativar os receptores SSTR2 (STENGEL et al., 2015). A SST pode estimular fortemente o consumo alimentar mesmo em condições na qual a busca por alimento é baixa, como durante a fase clara para os roedores, indicando sua participação em circuitos centrais que estimulam a fome (STENGEL, et al., 2010b). Esse efeito pode ser em virtude da ampla expressão dos receptores de SST presentes em neurônios de núcleos hipotalâmicos que regulam o consumo alimentar, como o núcleo arqueado, paraventricular e ventromedial (STENGEL e TACHÉ, 2019; STENGEL, et al., 2010b).

A ação da SST sobre áreas clássicas que regulam o consumo alimentar, como o hipotálamo, pode explicar parte do seu efeito orexígeno (STENGEL e TACHÉ, 2019). Porém, também foi observado que a SST aumenta o quociente respiratório e o gasto energético, podendo contribuir para diminuição no peso corporal (STENGEL et al., 2010a). Esses efeitos distintos da SST sobre o metabolismo podem ser explicados pelas diferentes doses utilizadas nos estudos e pelos diferentes subtipos de receptores que ela pode ligar-se (STENGEL et al., 2010b).

Porém, os receptores também estão presentes em centros que controlam saciedade/apetite e funções viscerais, como o núcleo do trato solitário (NTS) e o núcleo parabraquial (PBN) (GOEBEL, Miriam et al., 2010; STENGEL e TACHÉ, 2019). O PBN é uma importante região que funciona como um relé de informações sensoriais como dor, mal estar, paladar, saciedade e apetite (CARTER et al., 2013; PALMITER., 2018). Além dessas regiões, também encontramos células que expressam SST, bem como, receptores de SST, em áreas que recebem projeções do PBN para o controle da saciedade, como o núcleo central da amígdala (CeA) (GOEBEL, Miriam et al., 2010). O CeA é uma região associada a comportamentos defensivos e alimentar, podendo desempenhar neste último, um reforço positivo ou negativo sobre o consumo

alimentar (KIM J et al., 2017). A Figura 1 resume a participação de núcleos hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos no controle da ingestão alimentar, sendo que todos apresentam neurônios que expressam SST ou seus receptores.

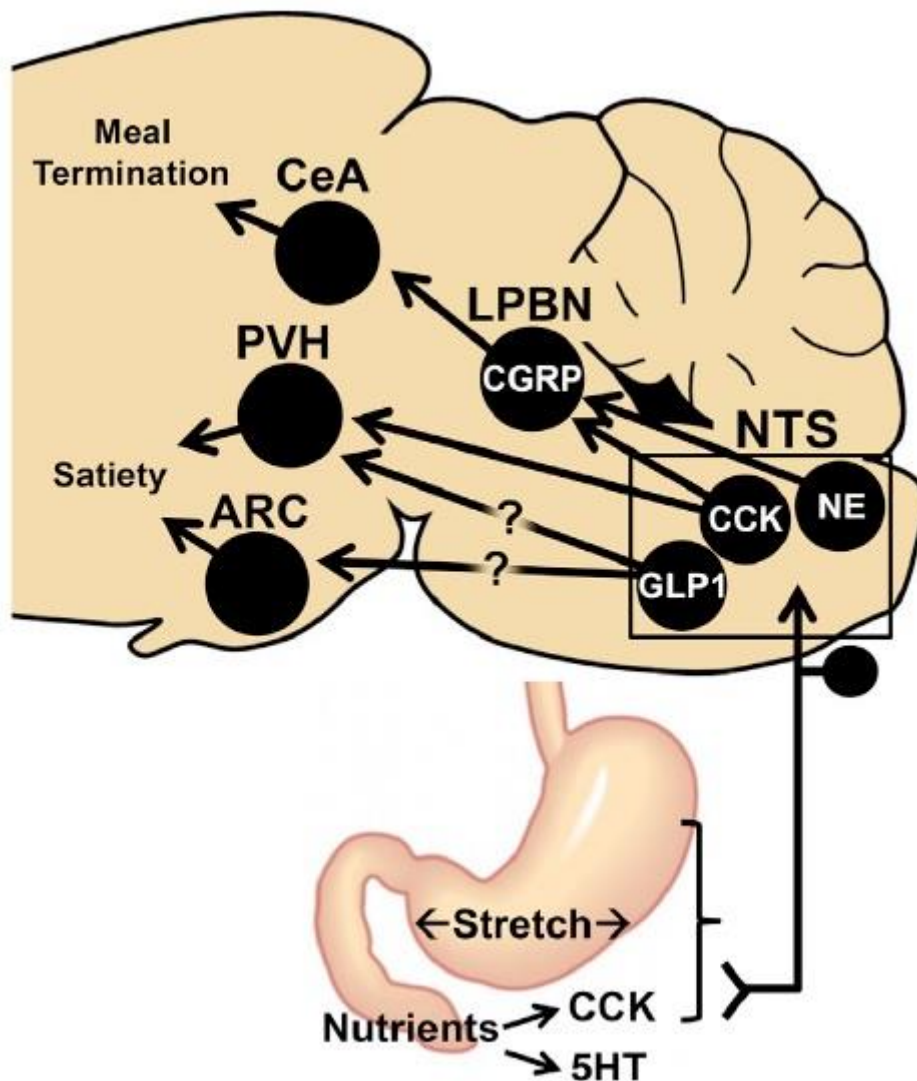


Figura 1. Circuito esquemático de núcleos encefálicos relacionados com o controle da saciedade. Sinais de saciedade gerados a curto prazo após o consumo alimentar são captados via nervo vago, que envia essa informação até o núcleo do trato solitário (NTS). Do NTS, essa informação é distribuída para diversos núcleos relacionadas com o controle do consumo alimentar, como o núcleo parabraquial lateral (LPBN), núcleo central da amígdala (CeA), núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) e núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH). Abreviaturas: **CCK**, colecistocina; **CGRP**, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; **GLP1**, peptídeo semelhante a glucagon 1; **Ne**, noradrenalina; **5HT**, serotonina. Figura extraída de Andermann ML, Lowell BB., 2017.

1.4 Ação da somatostatina na regulação comportamental

Como vimos anteriormente, a SST desempenha diversas funções biológicas, sobretudo no SNC, modulando o sistema neuroendócrino e o metabolismo. Contudo, dados tem demonstrado alta expressão de SST em regiões encefálicas envolvidas na cognição, como o hipocampo e córtex cerebral, bem como em áreas que processam emoções e comportamento, como a amígdala (ROBINSON, THIELE, 2020). A amígdala é uma região do encéfalo que está envolvida no processamento de respostas relacionadas a emoções, incluindo o medo (BEYELER A, DABROWSKA J, 2020). Dentre as suas subdivisões, o CeA tem sido descrito como uma região que processa informações relacionadas ao medo, ansiedade e também de supressão do apetite (BEYELER A, DABROWSKA J, 2020). O CeA é composto quase exclusivamente por neurônios inibitórios GABAérgicos que podem co-expressar diversos neuropeptídeos, como a SST, hormônio liberador de corticotrofina e taquicinina 2 (BEYELER A, DABROWSKA J, 2020). Um estudo demonstrou que a potencialização da atividade de neurônios SST do núcleo intersticial da estria terminal (BSTN) foi mediado pelo aumento da atividade de neurônios SST do CeA, induzindo um comportamento do tipo ansioso em camundongos, mensurados pelos testes de labirinto em cruz elevada e campo aberto (AHRENS et al., 2018). Esse circuito regula ansiedade em camundongos através da modulação de neurônios SST do CeA que se projetam para o BNST, permitindo uma conexão entre esses dois núcleos (AHRENS et al., 2018). Esses dados indicam que a amígdala via neurônios SST tem um papel relevante no comportamento ansioso. Outro estudo revelou que a falta do receptor de SST2 em camundongos aumentou comportamentos do tipo ansioso, que foi associado com aumento na secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise, sendo este o principal regulador de respostas estressoras (MARTEL et al., 2012). Esses resultados propõem que o SSTR2 é o principal receptor que media mudanças no comportamento induzidas pela SST. Por outro lado, em outras regiões encefálicas como no córtex cerebral e hipocampo, a literatura demonstra que a diminuição na atividade de neurônios SST durante comportamentos complexos pode facilitar a plasticidade sináptica e a

aprendizagem por aumentar a transmissão excitatória (URBAN-CIECKO e BARTH, 2016). Outro mecanismo proposto é que a SST melhora a potenciação de longa duração (LTP) nas sinapses de células piramidais do hipocampo, contribuindo para a plasticidade sináptica (ROBINSON, THIELE, 2020).

1.5 Somatostatina e GABA

Neurônios que expressam SST e GABA constituem uma das maiores classes de neurônios inibitórios no córtex cerebral, constituindo aproximadamente 30% dos interneurônios dessa região e do hipocampo (URBAN-CIECKO, BARTH, 2016). Além dessas regiões, como dito anteriormente, em algumas áreas do hipotálamo e amígdala os neurônios que expressam SST também secretam GABA, sendo este o principal neurotransmissor inibitório do SNC (WOJCIK et al., 2006).

Os neurônios que secretam GABA são denominados GABAérgicos e sua ação inibitória consiste basicamente em abrir ou fechar canais iônicos específicos a fim de hiperpolarizar a membrana da célula alvo (POWERS et al., 2012). Ele age por tanto, modulando a excitabilidade das células e assim suas respostas (URBAN-CIECKO e BARTH, 2016). Para a célula secretar GABA, o neurônios necessita da proteína VGAT, que é responsável em armazenar o GABA na vesícula sináptica antes de ser liberado na neurotransmissão (MÜNSTER-WANDOWSKI et al., 2016). Evidências mostraram que a deleção genética da VGAT impede que a célula consiga liberar GABA, demonstrando o papel essencial dessa vesícula na transmissão GABAérgica (WOJCIK et al., 2006). Não se sabe se a natureza inibitória dos neurônios SST/GABA é mediada predominantemente pela SST ou pelo GABA (URBAN-CIECKO e BARTH, 2016). Assim, a proposta do projeto foi estudar as consequências fisiológicas da deleção genética da VGAT em células que expressam SST. Nosso estudo testou a hipótese que a ação inibitória desempenhada pelos neurônios SST sobre aspectos como o controle do metabolismo é, ao menos em parte, mediada pela transmissão GABAérgica. Esses achados podem ajudar a identificar o papel isolado desses neurotransmissores sobre as funções reguladas por essas células.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar os efeitos fisiológicos da deleção genética da VGAT em células que expressam SST sobre aspectos metabólicos e comportamentais.

Objetivos específicos

a) Avaliar possíveis alterações na secreção de GH e no crescimento de camundongos deficientes da VGAT exclusivamente em neurônios que expressam a SST.

b) Mensurar o balanço energético e homeostase glicêmica de camundongos deficientes da VGAT exclusivamente em neurônios que expressam a SST.

c) Analisar possíveis alterações comportamentais de camundongos deficientes da VGAT exclusivamente em neurônios que expressam a SST.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram gerados camundongos que carregam inativação do gene que codifica a proteína VGAT (*Slc32a1*) exclusivamente em neurônios que expressam a SST. Para tanto, animais que expressam a enzima Cre Recombinase sob o controle dos promotores do gene *Sst* (camundongo SST^{cre}) foram cruzados com camundongos que possuem o gene *Slc32a1* (VGAT) flanqueado por sítios LoxP (camundongo VGAT^{flox}). Após uma série de cruzamentos, obtivemos camundongos homocigotos para o alelo VGAT^{flox} e carregando Cre (SST^{ΔVGAT}), nos quais apresentaram a incapacidade de liberar GABA apenas nas células SST. Os animais do grupo controle são os filhotes nascidos da mesma ninhada, mas sem expressar o gene da Cre. Os animais SST^{cre} também foram utilizados para os experimentos no qual induzimos a expressão de receptores sintéticos (DREADDs) de maneira Cre-dependente. Além desses animais, utilizamos dois modelos de animais repórter: animais que expressam a proteína fluorescente verde (eGFP) em neurônios SST (SST^{cre}) e animais que expressam a proteína fluorescente vermelha (td-tomato) em neurônios AgRP (AgRP^{cre}). Esses dois modelos animais foram utilizados nos experimentos morfohistológicos. Todos os modelos animais foram importados da Jackson Laboratory e produzidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/USP. Os camundongos foram criados e mantidos em condições controladas de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12 h) e temperatura (23 ± 1 °C). Todos os experimentos foram conduzidos com machos e fêmeas e de acordo com as diretrizes nacionais para o cuidado e uso de animais de laboratório.

3.1.1 Avaliação do fenótipo

Ao constatar que o fenótipo dos animais SST^{ΔVGAT} afeta a sobrevivência dos mesmos, passamos a acompanhar diariamente o peso corporal e a curva de sobrevivência dos animais. Inicialmente os animais receberam uma dieta padrão para roedores (2,99 kcal/g; 9,4% calorias de gordura; Quimtia) e água ad libitum. Posteriormente, um outro grupo de animais recebeu dieta rica em gordura e calorias (High Fat Diet; com 60% do conteúdo calórico derivado de gordura; 5,24 kcal/g; D12492; Research Diets) a partir do décimo terceiro dia de vida. Dos

animais que receberam a high fat diet (HFD) e que conseguiram chegar a idade adulta, foi substituída a HFD pela ração padrão ao completarem 7 semanas de vida.

3.2 Avaliação do consumo alimentar

3.2.1 Teste de lactação

Os animais com 10 dias de vida (P10) foram submetidos ao teste de lactação, para sabermos a quantidade de leite consumido no período determinado. Para isso, os animais foram retirados da mãe e colocados em caixas separadas, para serem submetidos a um jejum de quatro horas. Após esse período, os filhotes foram pesados e devolvidos para a mãe. Os animais foram pesados novamente após 60 e 120 minutos depois do retorno para a caixa da mãe, sendo que o ganho de peso indica o consumo aproximado de leite no período avaliado.

3.3 Avaliação das dietas

3.3.1 Teste com ração umedecida

Uma vez que observamos redução do consumo alimentar no período pós-natal, ao completarem 13 dias de vida (P13), um grupo de animais receberam diariamente a ração padrão para roedores umedecida (acrescida de água), a fim de facilitar seu consumo. Como os animais ainda não estavam no período de desmame, eles continuavam com a mãe na caixa até completarem 28 dias de vida.

3.3.2 Teste com dieta palatável (High fat diet)

Ao completarem 13 dias de vida (P13), um outro grupo de animais receberam diariamente a HFD. Como os animais ainda não estavam no período de desmame, eles continuavam com a mãe na caixa até completarem 28 dias de vida.

3.4 Avaliação do Comportamento

3.4.1 Campo aberto

O teste de campo aberto foi realizado em uma arena circular de acrílico, composta por uma base com diâmetro de 300 x 300 mm e uma plataforma de 400 x 400 mm. Previamente ao dia do teste, os animais com P13 e P19 dias de vida foram adaptados ao ambiente do teste, com a base e a plataforma, por um período de 10 minutos. Antes de iniciar a sessão, o campo foi cuidadosamente limpo com etanol a 70% entre cada animal. No início da sessão, os animais foram colocados na zona central. Os camundongos puderam explorar o labirinto por 5 minutos, enquanto o seu comportamento foi gravado usando uma câmera digital, ligada a um computador. Os dados resultantes foram analisados utilizando o software *AnyMaze*. Os parâmetros avaliados foram distância total percorrida, número de entradas no centro e tempo no centro.

3.4.2 Labirinto em cruz elevada

O aparelho para o teste de labirinto em cruz elevado é construído de dois abertos braços sem paredes (350mm de comprimento e 50mm de largura) e dois braços fechados por 150mm de altura de paredes não transparentes. Os braços foram estendidos a partir de uma plataforma central, ficando a 400mm de altura do solo. Os braços foram dispostos de tal forma a ficarem opostos um ao outro. O labirinto foi levantado a uma altura de 50 cm acima do chão. Previamente ao dia do teste, os animais com P49 dias de vida foram adaptados ao ambiente do teste, na plataforma com os braços, por um período de 10 minutos. Antes de iniciar a sessão, o campo foi cuidadosamente limpo com etanol a 70% entre cada animal. No início da sessão, os animais foram colocados na zona central, com a cabeça orientada para um braço fechado. Os camundongos puderam explorar o labirinto por 5 minutos, enquanto o seu comportamento foi gravado usando uma câmera digital. Os dados resultantes foram armazenados em um computador pessoal e analisados utilizando o software *AnyMaze*. Os parâmetros avaliados foram distância total percorrida, número de entradas nos braços abertos, tempo nos braços abertos e distância percorrida nos braços abertos.

3.5 Experimento com receptores sintéticos (DREADDS)

Para avaliar o efeito dos neurônios SST do CeA sobre o consumo alimentar, nós injetamos um vírus que codifica receptores sintéticos (DREADDs)

no CeA de animais C57BL/6 (grupo controle) e animais SST^{cre}, pois os receptores são expressos de maneira Cre-dependente. Para este experimento utilizamos o receptor muscarínico de acetilcolina excitatório (hM3Dq). Esses receptores sintéticos podem ser ativados por meio de um ligante chamado N-óxido de clozapina (CNO). Para a manipulação aguda dos neurônios do CeA que expressam SST, o CNO foi dissolvido em solução de DMSO à 10% de salina na concentração de 5mg/mL. Os animais receberam 2µg de CNO por cada grama de peso (peso em gramas x 4) ou solução de salina (grupo controle) via injeção intraperitoneal (i.p). O consumo alimentar foi medido 30, 60, 120 e 240 minutos após a administração do CNO.

3.6 Eutanásia

Os animais SST^{cre} e controles no qual injetamos DREADDs foram perfundidos após os experimentos com CNO para confirmar o local da injeção do vírus hM3Dq no CeA.

3.7 Histologia

3.7.1 Perfusão e microtomia

Os animais com P10, P21, P49, bem como os animais SST^{cre} no qual injetamos DREADDs e animais repórter (SST^{cre} e AgRP^{cre}) foram anestesiados com isoflurano e perfundidos transcárdialmente com salina seguido por solução de formaldeído à 10% (150 a 200mL por camundongo). O encéfalo foi coletado e mantido no mesmo fixador por 60 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 °. Os cortes encefálicos dos animais com P10, P21 e P49 foram utilizados para os experimentos com Fos. Já os animais repórteres, foram utilizados para o mapeamento de regiões encefálicas que expressam SST, bem como analisar possíveis colocalizações com neurônios conhecidos como reguladores da ingestão alimentar.

3.7.2 Imunofluorescência

Os cortes encefálicos foram lavados em PBS de potássio a 0,02 M, pH 7,4 (KPBS). Após as lavagens, os cortes foram bloqueados em soro normal de burro a 3% durante 1 hora, seguido de incubação em anticorpos primários anti-SST feito em coelho (1:1000, Península Laboratories Internacional), anti-GFP feito em galinha (1:5000; Aves Laboratories), anti-cFos (1:1000, Calbiochem), anti-AgRP feito em coelho (1:4000; Phoenix Pharmaceuticals), anti-CGRP feito em coelho (1:5000; Immunostar), anti-TH feito em mouse (1:2500; Millipore), anti-PKC δ feito em mouse (1:1000; Transduction Laboratories) , anti-Fluoro-Gold feito em (1:10000) por 24 horas. Em seguida, 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 gelatinizadas 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).

3.9 Análise estatística

Após a normalidade dos dados ser verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, os dados foram analisados por meio de t-teste não pareado de duas vias para comparar os grupos (camundongos deficientes da VGAT x grupo controle). Para as análises que avaliam o genótipo e tempo, utilizamos a ANOVA de duas vias de medidas repetidas. O teste post hoc de Bonferroni foi utilizado para identificar diferenças estatísticas nas análises de variância. Intervalos de confiança (IC= 95%) foram utilizados para especificar a magnitude das diferenças. Os dados são apresentados com média e desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1 Camundongos deficientes da proteína VGAT em células SST não conseguem sobreviver por mais de 4 semanas de vida

Nas primeiras ninhadas, fomos surpreendidos com a falta de animais nocautes ($SST^{\Delta VGAT}$) após o período de desmame (aproximadamente 4 semanas de vida). Esses resultados poderiam indicar que a geração de camundongos sem a proteína VGAT em células SST é inviável. Para investigar essa possibilidade, passamos a acompanhar os animais do momento do nascimento em diante. Pudemos observar que embora os camundongos com deleção da proteína VGAT em células SST conseguem nascer, esses animais não conseguem sobreviver após a quarta semana de vida (Figura 2A). No acompanhamento diário notamos que os animais $SST^{\Delta VGAT}$ apresentam peso corporal significativamente menor que os animais do grupo controle após o quinto dia de vida. Por volta do 16° ao 17° dia de vida, os animais $SST^{\Delta VGAT}$ apresentam redução acentuada no ganho de peso em comparação ao grupo controle (Figura 2B). Essa redução persiste até a morte dos animais.

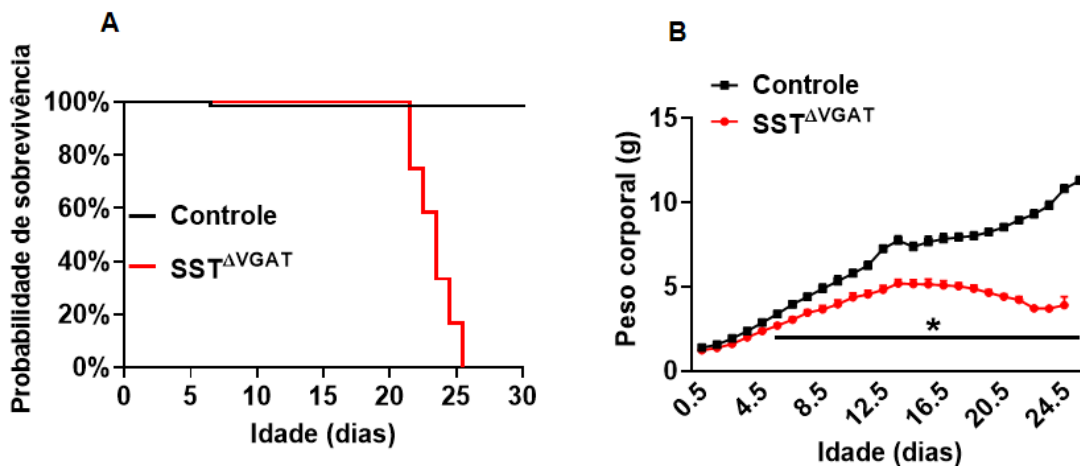


Figura 2. A- Acompanhamento da curva de sobrevivência dos animais controle e nocautes ($SST^{\Delta VGAT}$). B- Peso corporal dos animais controles e $SST^{\Delta VGAT}$ em dieta normal e dieta umedecida.

4.2 Avaliação do consumo alimentar

A partir da constatação desse fenótipo, testes adicionais foram realizados para compreender o que poderia estar causando a morte precoce dos animais $SST^{\Delta VGAT}$. Foi realizado o teste de ingestão alimentar em animais com 10 dias de vida (P10), para determinar o consumo aproximado de leite. Foi verificado que os animais $SST^{\Delta VGAT}$ apresentaram menor consumo alimentar em comparação ao grupo controle, tanto uma hora quanto duas horas após a re-exposição das mães (Figura 3).

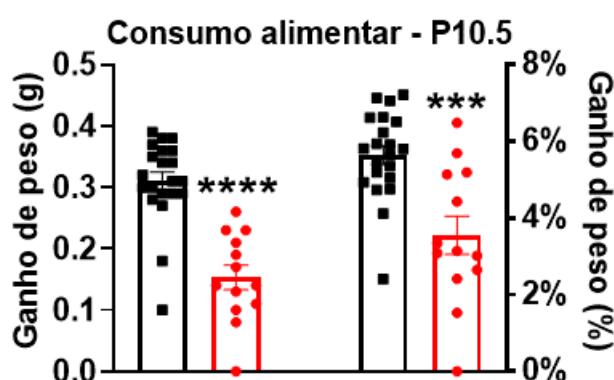


Figura 3. Teste de lactação em animais controle e nocautes ($SST^{\Delta VGAT}$) com 10 dias de vida.

4.3 Avaliação de diferentes dietas

Uma vez que foi observado redução do consumo alimentar de leite, avaliamos a possibilidade dos animais $SST^{\Delta VGAT}$ em apresentarem dificuldade em se alimentar ao substituir a ração peletizada por uma ração umedecida a partir do décimo terceiro dia de vida. Assim, essa ração pastosa seria mais facilmente consumida. A implementação dessa ração não foi capaz de modificar o ganho de peso dos animais, tão pouco a sobrevivência dos animais $SST^{\Delta VGAT}$. Esses dados são apresentados juntamente com os dados da figura 2 para fins de comparação (Figura 4).

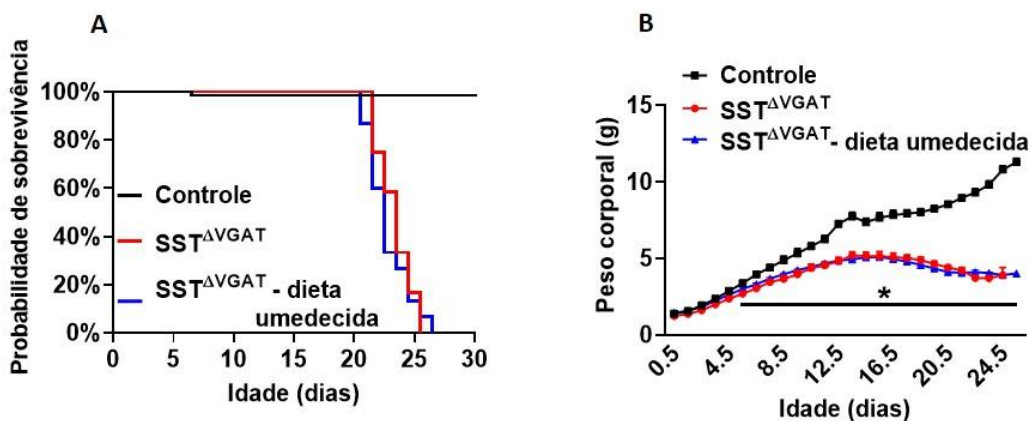


Figura 4. **A-** Acompanhamento da curva de sobrevivência dos animais controle e nocautes (SST^{ΔVGAT}) em dieta padrão e dieta umedecida. **B-** Peso corporal dos animais controles e SST^{ΔVGAT} em dieta padrão e dieta umedecida.

Então foi avaliado se uma ração altamente palatável, como a HFD, poderia afetar a sobrevivência dos animais SST^{ΔVGAT}. A ração HFD foi implementada a partir do décimo terceiro dia de vida. Surpreendentemente, foi possível prolongar o tempo de sobrevivência dos animais, em comparação aos animais SST^{ΔVGAT} sem intervenção na dieta ou que receberam a ração umedecida (Figura 5A). Parte desse resultado pode-se dar em virtude do ganho de peso desses animais SST^{ΔVGAT} que estavam em HFD (Figura 5B). Mas apesar do ganho de peso dos animais nocautes em dieta HFD ser expressivo, ele ainda é significativamente menor em relação aos animais controles que também estavam em dieta HFD. Uma vez que a dieta HFD foi a única que prolongou o tempo de sobrevivência dos animais nocautes (Figura D), desafiemos substituir a HFD pela ração padrão nos animais nocautes que conseguiram chegar à idade adulta, para atestar se de fato era a dieta HFD que estava mantendo esses animais vivos. Ao substituir a dieta HFD desses animais por volta do 49º dia de vida, os animais SST^{ΔVGAT} voltaram a perder peso e consequentemente morreram (Figura 5C). Com base nesses resultados, pudemos observar que os animais SST^{ΔVGAT} morriam por inanição e que uma dieta palatável conseguia melhorar parcialmente o ganho de peso e, consequentemente, a sobrevivência dos animais.

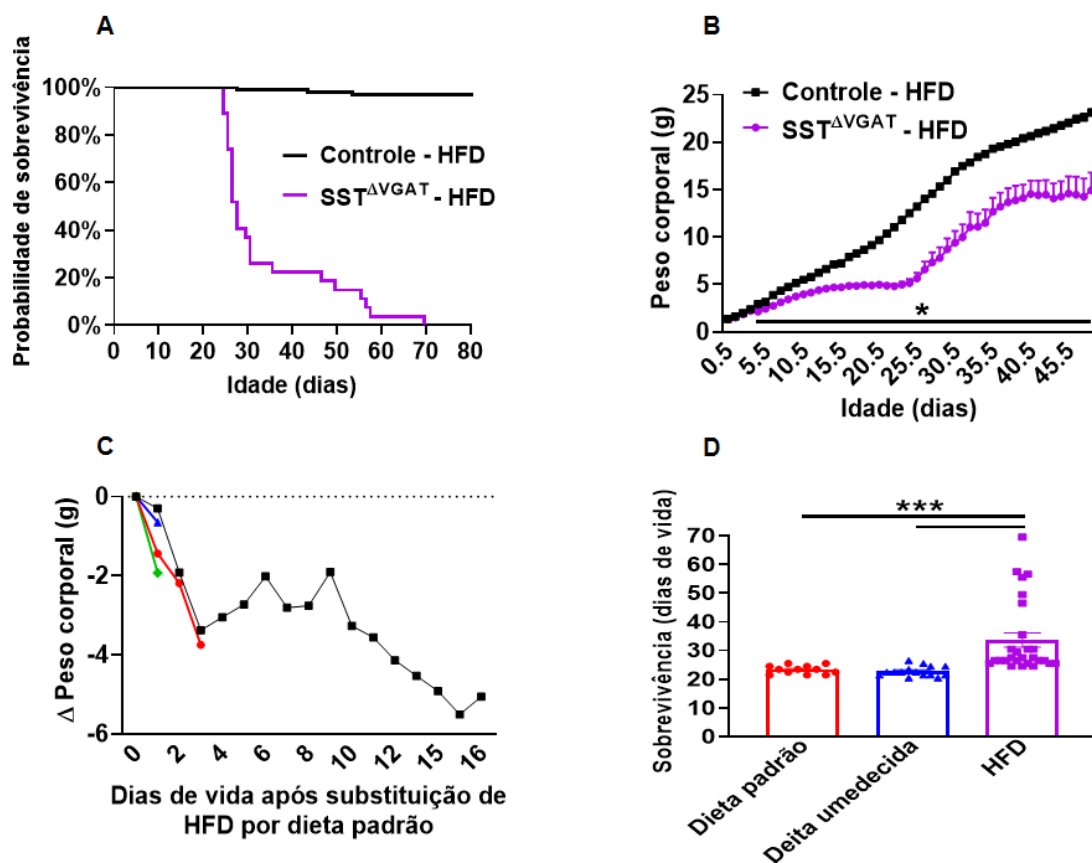


Figura 5. **A-** Probabilidade de sobrevivência entre animais controles e SST^{ΔVGAT} com dieta rica em gordura (HFD). **B-** Peso corporal de animais controles e SST^{ΔVGAT} com HFD. **C-** Sobrevivências dos animais SST^{ΔVGAT} após substituição de dieta HFD por dieta padrão. **D-** Sobrevivência em dias dos animais SST^{ΔVGAT} nas três diferentes dietas avaliadas. *Diferença significativa.

4.4 Análise das vias somatostatinérgicas centrais

Constatado o fenótipo, foi investigado quais regiões encefálicas que regulam a ingestão alimentar apresentam neurônios que expressam SST ou são inervadas por fibras somatostatinérgicas. Por meio da imunofluorescência, foi observado que o núcleo arqueado (ARH), o núcleo tuberal do hipotálamo (TN) e o núcleo central da amígdala (CeA) possuem grande quantidade de neurônios que expressam SST (Figura 6A e B). Por outro lado, o núcleo do trato solitário (NTS) e o núcleo parabraquial lateral (PBNL) (Figura 6C, H) recebem densa inervação de fibras expressando SST. Uma vez que a inervação de fibras de neurônios que expressam AgRP no PBNL são fundamentais para a regulação da ingestão alimentar por meio da transmissão GABAérgica (WU Q, CLARK MS,

PALMITER RD, 2009), foi comparado a distribuição entre as fibras AgRP e SST no PBNL (Figura 6D, E, G, H). Foi observado que a densidade de fibras SST é muito maior que as fibras AgRP e embora inervem regiões próximas do PBNL, essa inervação não apresenta muita sobreposição (Figura 6F e I).

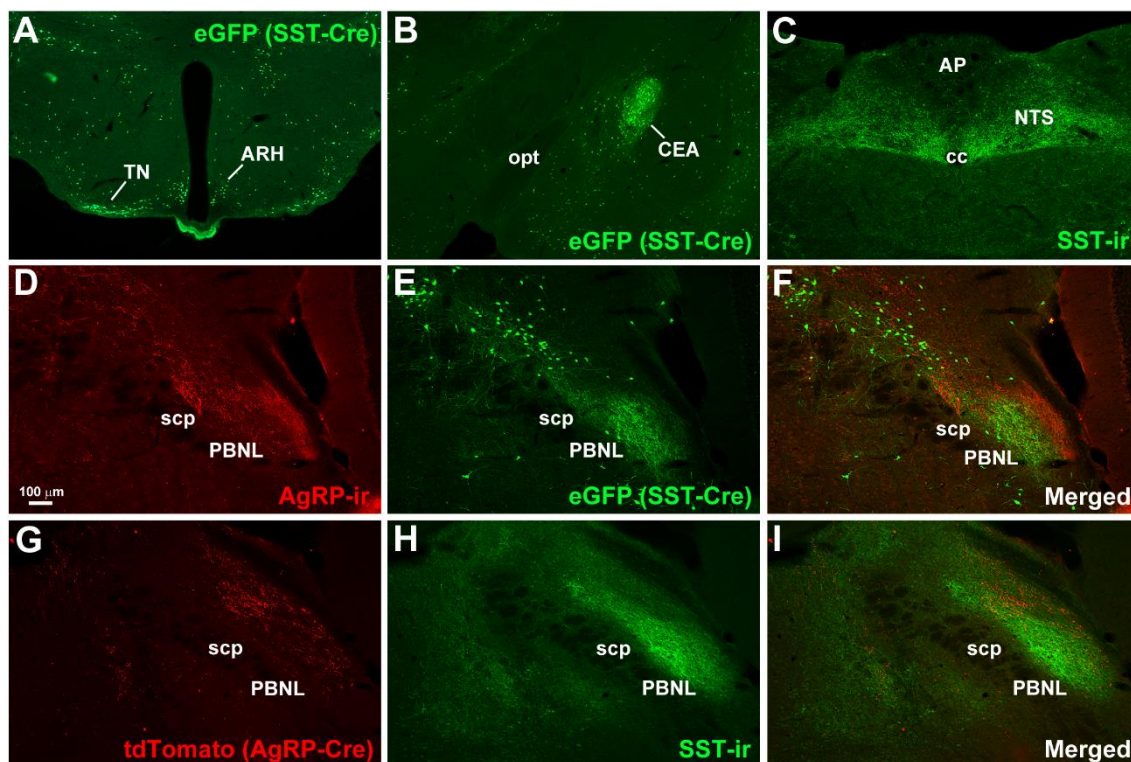


Figura 6. Fotomicrografias de fluorescência ilustrando a localização encefálica de neurônios somatostatina (SST) relacionados com o controle da ingestão alimentar. **A-** Marcação da proteína fluorescente verde (eGFP) em neurônios SST no núcleo arqueado (ARH) e núcleo tuberal do hipotálamo (TN). **B-** Marcação de eGFP em neurônios SST no núcleo central da amígdala (CeA). **C-** Marcação de inervação de neurônios SST no núcleo do trato solitário (NTS). **D-** Marcação de inervação de neurônios AgRP no núcleo parabraquial lateral (PBNL). **E-** Marcação de eGFP em fibras de neurônios SST no PBNL. **F-** Co-localização de inervação de neurônios AgRP com inervação de neurônios SST no PBNL. **G-** Marcação de inervação de neurônios AgRP no PBNL. **H-** Marcação de inervação de neurônios SST no PBNL. **I-** Co-localização de inervação de neurônios AgRP com inervação de neurônios SST no PBNL.

Abreviaturas: **AgRP**, peptídeo relacionado à agouti, **opt** trato óptico, **AP** área pós-trema, **cc** canal ventral da medula, **scp** pedúnculo cerebelar.

A inervação GABAérgica para os neurônios que expressam a proteína relacionada ao gene da calcitonina (CGRP) no PBNL é fundamental para o controle da ingestão alimentar (WU Q, CLARK MS, PALMITER RD, 2009). O controle dessas células é mediado por um tônus GABAérgico. Assim, foi avaliado se fibras expressando SST interagem com os neurônios CGRP do PBNL. Foi

observado que os neurônios que expressam CGRP no PBNL recebem densa inervação de fibras contendo SST (Figura 5C e F).

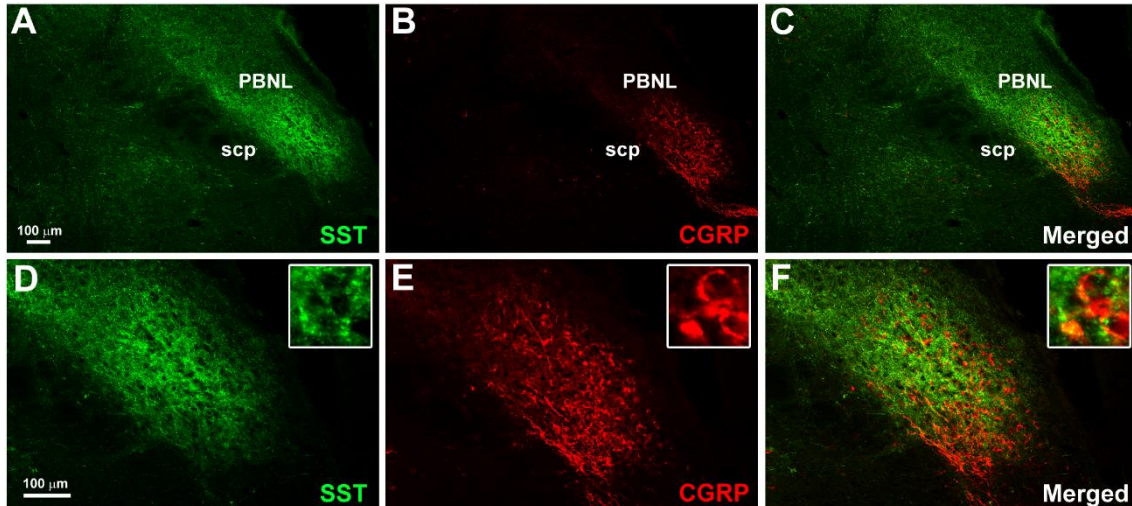


Figura 7. Fotomicrografias de fluorescência demonstrando a inervação de neurônios SST no PBNL. **A e D-** Inervação de neurônios SST no PBNL. **B e E-** Marcação de neurônios CGRP no PBNL. **C e F-** Co-localização de inervação SST em neurônios CGRP do PBNL.

Abreviatura: **scp** pedúnculo cerebelar.

Para compreender se a ausência da transmissão GABAérgica dos neurônios SST poderia alterar a atividade neuronal de áreas que regulam a ingestão alimentar, foi avaliada a expressão da proteína Fos dos animais controles e $SST^{\Delta VGAT}$ com 21 e 49 dias de vida. Foi observada marcante expressão da proteína Fos no ARH e no NTS dos camundongos $SST^{\Delta VGAT}$ com 21 dias em relação aos animais controle (Figura 8).

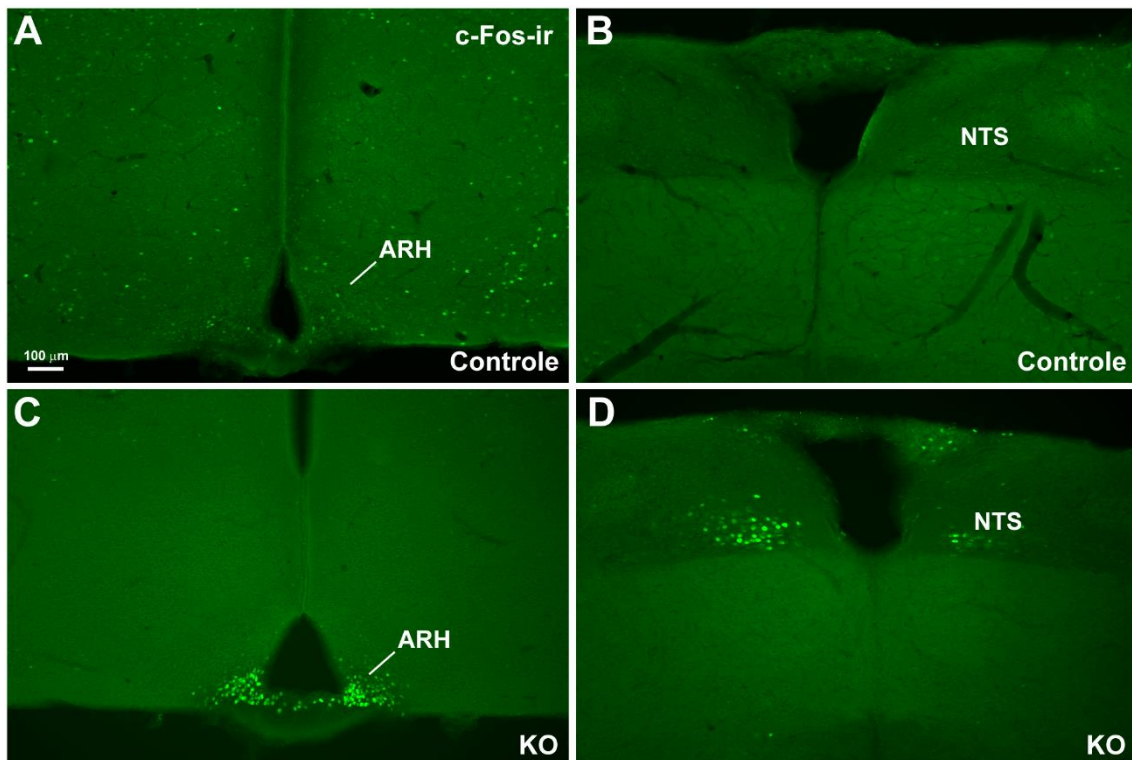


Figura 8. Fotomicrografias de fluorescência mostrando ativação neuronal por meio da proteína Fos. **A-** ausência de Fos no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH) em animais controle. **B-** ausência de Fos no núcleo do trato solitário (NTS) de animais controle. **C-** presença de Fos no ARH de animais nocautes ($SST^{\Delta VGAT}$). **D-** presença de Fos no NTS de animais $SST^{\Delta VGAT}$.

Nos animais com 49 dias, também observamos ativação neuronal no ARH e NTS apenas dos animais $SST^{\Delta VGAT}$ (Figura 9B, C, F e G). Além dessas áreas, foi constatado Fos no PBNL dos $SST^{\Delta VGAT}$ em relação aos controles (Figura 9D, E). Com base nesses resultados, passamos a investigar a identidade neuroquímica desses neurônios que apresentaram Fos. No ARH, nós vimos co-localização do Fos com neurônios AgRP (Figura 9H). No PBN, são os neurônios CGRP que se co-localizam com o Fos (Figura 9I). Já no NTS, observamos co-localização do Fos com os neurônios que expressam a enzima tirosina hidroxilase (TH), sendo este um marcador de neurônios catecolaminérgicos no NTS (ANDERMANN ML, LOWELL BB, 2017) (Figura 9K). Todos esses neurônios identificados são reguladores do consumo alimentar (WU Q, CLARK MS, PALMITER RD, 2009).

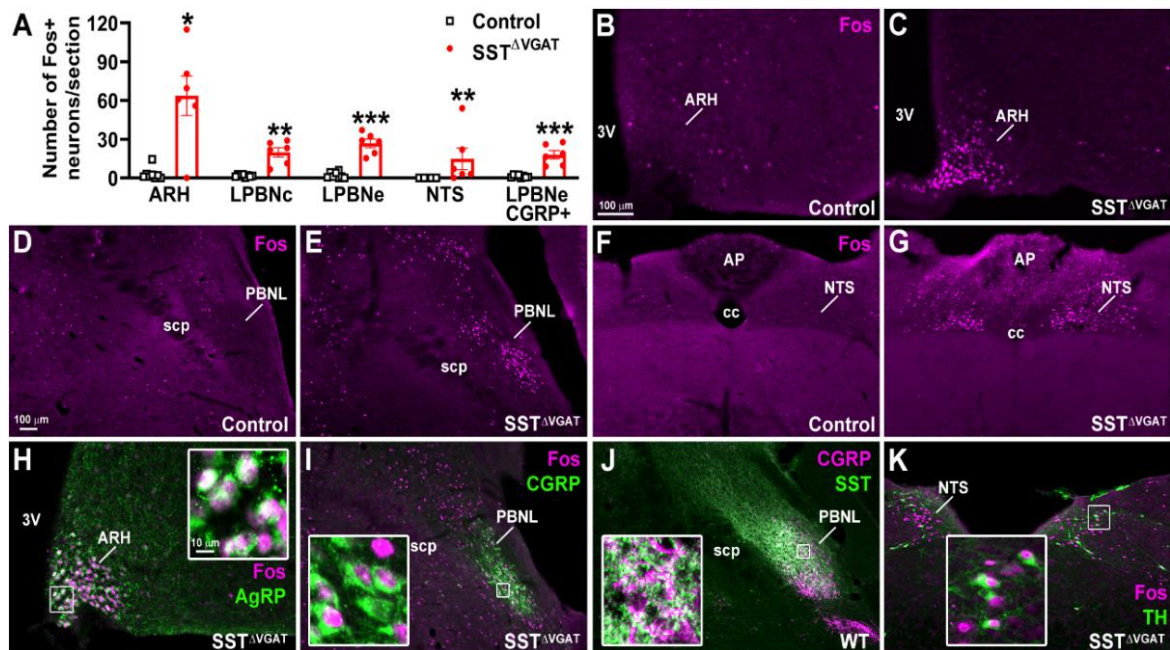


Figura 9. Fotomicrografias marcadas com imunofluorescência para Fos, CGRP e Fluoro-Gold em magenta e AgRP, CGRP, SST e TH em verde. **A-** Número de células marcadas com Fos no núcleo arqueado (ARH), núcleo parabraquial lateral central (LPBNC), núcleo parabraquial lateral externo (LPBNE), núcleo do trato solitário (NTS) e neurônios que expressam a proteína relacionada com o gene da calcitonina (CGRP) no LPBNE. **B-** Ausência de Fos no ARH de animais controles. **C-** Presença de Fos no ARH de animais SST^{ΔVGAT}. **D-** Ausência de Fos no PBNL de animais controles. **E-** Presença de Fos no PBNL de animais SST^{ΔVGAT}. **F-** Ausência de Fos no NTS de animais controles. **G-** Presença de Fos no NTS de animais SST^{ΔVGAT}. **H-** Co-localização de Fos com neurônios que expressam o peptídeo relacionado à agouti (AgRP) no ARH. **I-** Co-localização de Fos com neurônios CGRP no PBNL. **J-** Inervação de neurônios SST em neurônios CGRP. **K.** Co-localização de Fos com neurônios que expressam tirosina hidroxilase (TH) no NTS de animais SST^{ΔVGAT}.

Para investigar possíveis regiões encefálicas que poderiam estar modulando a atividade do PBN, foi realizado injeções de um traçador retrógrado (Fluoro-Gold) no PBN (Figura 10A) em animais que permitem a visualização dos neurônios SST. Adicionalmente, foi feita a co-localização do traçador com SST, a fim de identificar possíveis áreas encefálicas que se projetam para o PBN e expressam SST. Foi observado que núcleos reguladores do consumo alimentar como o ARH, TN, núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH), núcleo diagonal da banda de Broca (HBD) e NTS enviam suas fibras de axônios para o PBN, porém estes não expressam SST (Figura 10). Por outro lado, identificamos que neurônios do CeA e do núcleo intersticial da estria terminal (BSTN) enviam projeções para o PBNL e são somatostatínérgicos (Figura 11A, B).

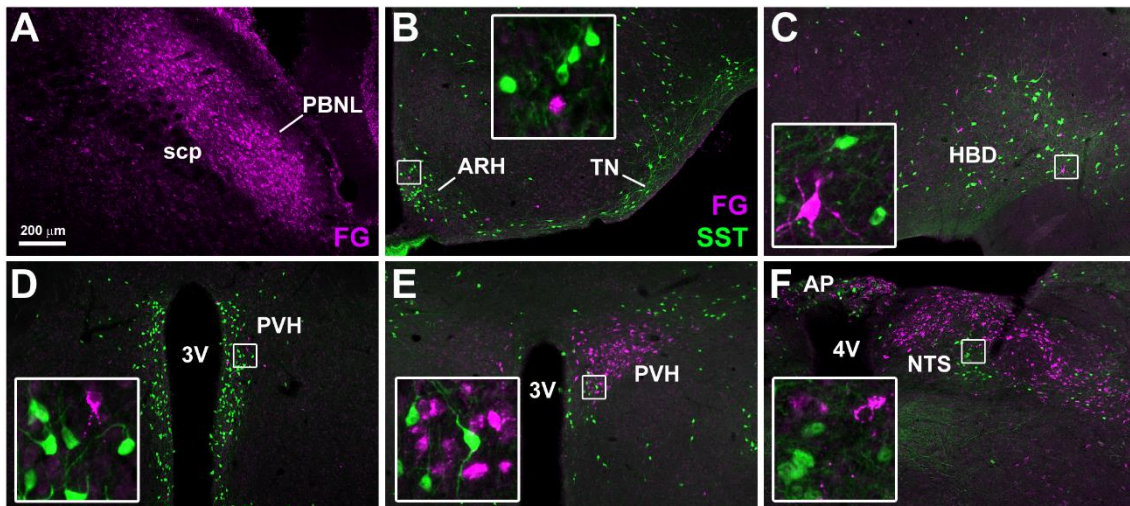


Figura 10. Fotomicrografias marcadas com imunofluorescência para Fluoro-Gold (magenta) e SST (verde) em diferentes regiões encefálicas que enviam projeções para o PBN. **A-** Área de injeção marcada com imunofluorescência para Fluoro-Gold. **B, C, D, E, F-** Núcleo arqueado do hipotálamo (ARH), núcleo tuberal do hipotálamo (TN), HDB, núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH) e NTS se projetam para o PBN, mas não fazem co-localização com SST.

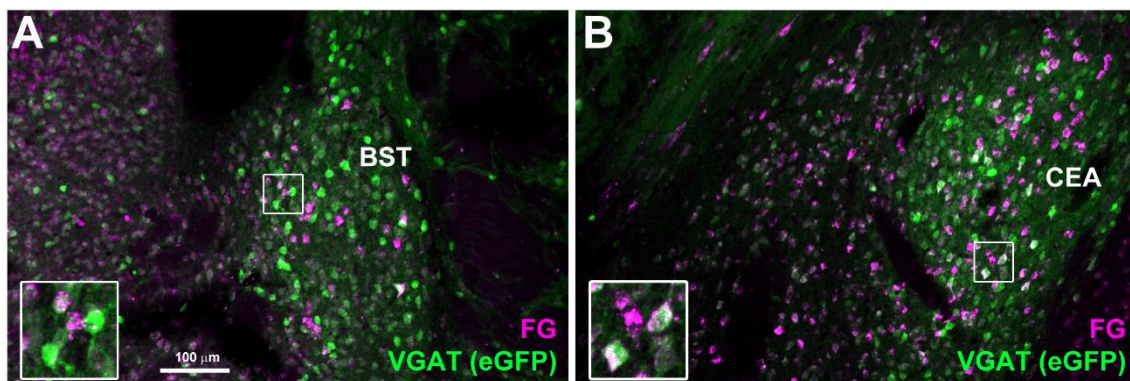


Figura 11. A. Co-localização de neurônios que expressam SST (em verde) do núcleo intersticial da estria terminal (BSTN) que projetam-se para o PBN (em magenta). **B.** Co-localização de neurônios que expressam SST (em verde) do CeA que projetam-se para o PBN (em magenta).

A literatura tem demonstrado que neurônios que expressam a proteína quinase C- δ (PKC- δ) do CeA regulam o consumo alimentar por suprimir o apetite (DOUGLAS et al., 2017). Assim, foi investigado se os neurônios do CeA e BSTN que expressam SST e projetam-se para o PBN, também expressavam a PKC- δ . Os dados de imunofluorescência demonstram que os neurônios do BSTN e CeA com projeções para o PBN não se co-localizam com neurônios PKC δ (Figura 12

A, B). Confirmamos também que os neurônios PKC δ do BSTN e CeA não são somatostatinérgicos (Figura 12 C, D).

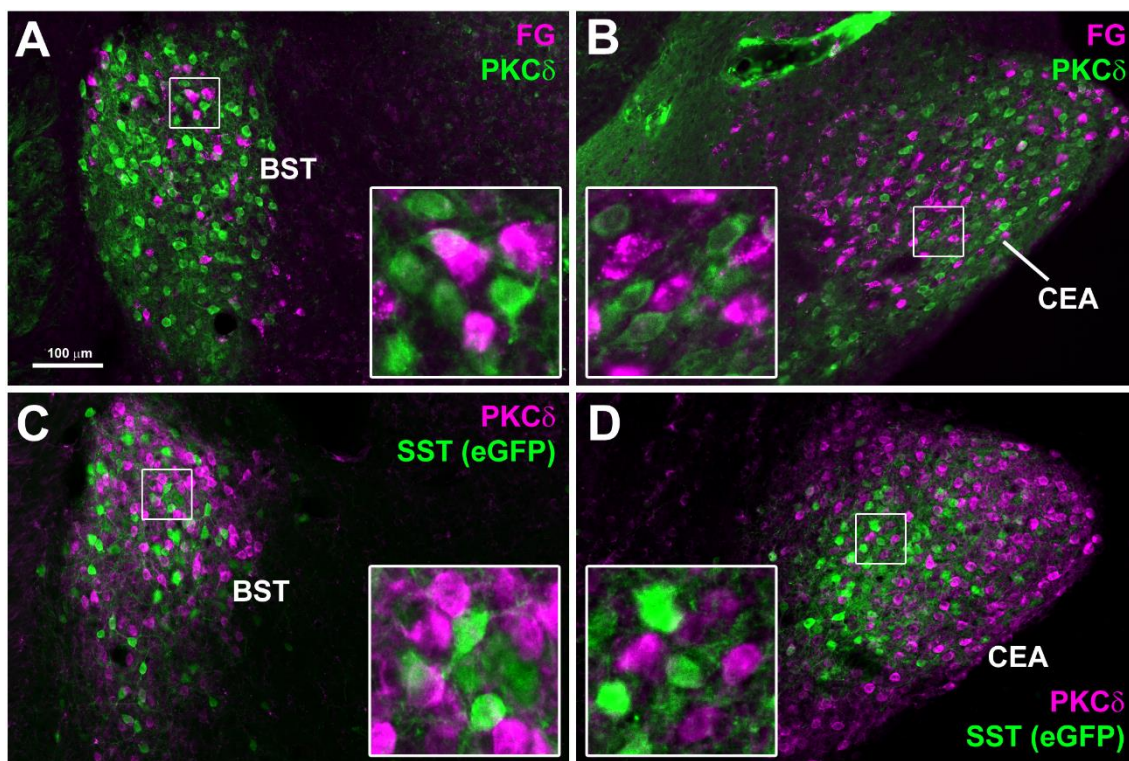


Figura 12. Fotomicrografias marcadas com imunofluorescência para Fluoro-Gold (magenta), SST e PKC δ (verde). **A, B-** Neurônios do BST e CeA com projeções para o PBN não se co-localizam com neurônios PKC δ . **C, D.** Neurônios PKC δ do BST e CeA não são somatostatinérgicos.

4.5 Ativação de neurônios do CeA por ligantes sintéticos (CNO) não altera o consumo alimentar

Para avaliar o efeito da ativação dos neurônios SST do CeA sobre o consumo alimentar, injetamos um vírus que codifica receptores sintéticos (DREADDs) no CeA de animais C57BL/6 (grupo controle) e animais SST^{cre}, uma vez que o vírus é expresso de maneira Cre-dependente. Assim, foi induzida a expressão de receptores excitatórios (hM3Dq) que são ativados apenas por meio de um ligante chamado N-óxido de clozapina (CNO). Para a manipulação aguda dos neurônios do CeA que expressam SST, o CNO ou solução de salina (grupo controle) foi administrado intraperitonealmente e o consumo alimentar foi medido 30, 60, 120 e 240 minutos após a administração do CNO. Foi observado que não

houve diferença significativa no consumo alimentar em ambos animais, SST^{cre} e controle, após a administração do CNO nos tempos avaliados (figura 13). O local da injeção foi confirmado após análise histológica (marcação de GFP) e também pela presença da proteína Fos, induzida por CNO, após perfusão dos animais (dados não mostrados).

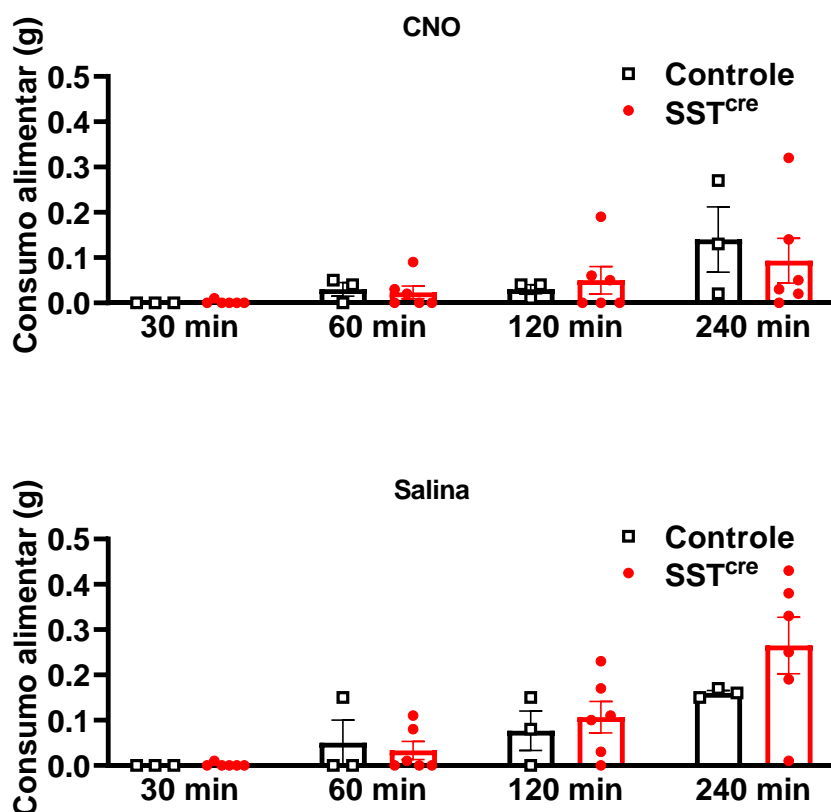


Figura 13. Administração de CNO e salina em animais SST^{cre} e controles para avaliar o consumo alimentar.

4.6 Avaliação comportamental dos camundongos com deleção da VGAT em células SST

Foi realizada avaliação do comportamento do tipo ansioso dos animais, uma vez que aspectos comportamentais podem ter sido afetados pela deleção da VGAT em células SST. Já é bem descrito na literatura que a amígdala e o BSTN, via neurônios SST, tem um papel relevante no comportamento ansioso (AHRENS et al., 2018). O comportamento ansioso foi avaliado por meio dos

testes de campo aberto e labirinto em cruz elevada. O teste de campo aberto foi realizado em animais que receberam a dieta padrão para roedores nas idades P14, P21 e na idade P49 nos animais que receberam a HFD, pois eram os animais que conseguiam chegar até essa idade. O teste de labirinto em cruz elevada foi realizado apenas nos animais que receberam a HFD, na idade P49.

No teste de campo aberto em P14, não houve diferença significativa entre os animais controle e SST^{ΔVGAT} nos parâmetros de distância percorrida, tempo no centro e número de entradas no centro (Figura 14A, D, G). Já no P21, houve diferença significativa na distância percorrida, sendo maior nos animais controles em relação aos SST^{ΔVGAT} (Figura 14B). Já no P49, o número de entradas no centro foi significativamente menor nos animais SST^{ΔVGAT} em relação aos controles (Figura 14F).

No teste de labirinto em cruz elevada realizado em animais P49, houve diferença significativa entre os grupos nos quatro parâmetros avaliados, no qual a distância total percorrida e o número de entrada os braços abertos foi significativamente menor nos animais SST^{ΔVGAT} (Figura 15A, B). Já o tempo e distância percorrida nos braços abertos, foi significativamente maior nos animais SST^{ΔVGAT} em comparação ao grupo controle (Figura 15C, D). Esses dados indicam que os animais nocautes exploraram mais os braços abertos do que os animais do grupo controle.

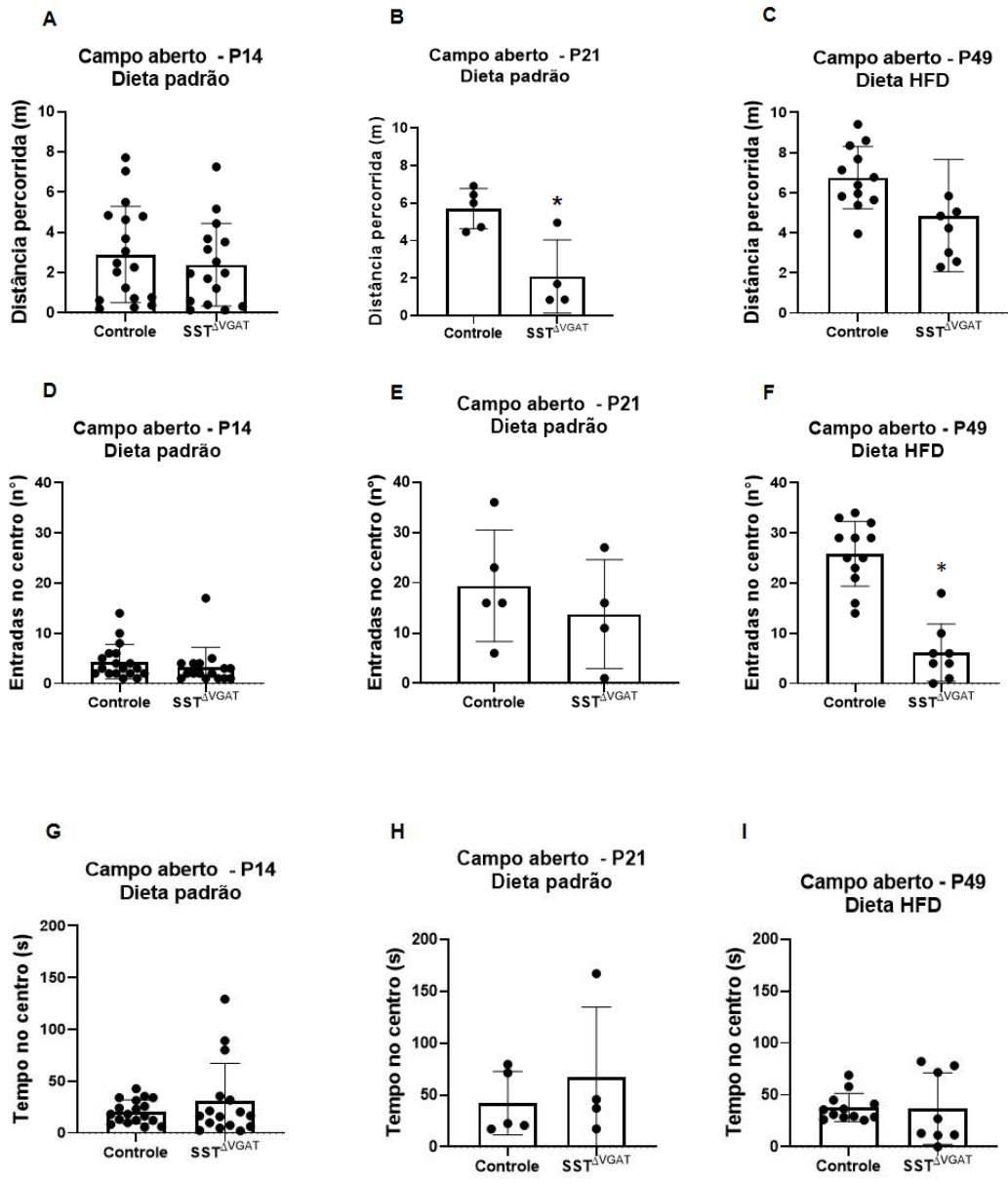


Figura 14. Parâmetros avaliados no teste de campo aberto em P14, P21 e P49. **A, B e C**- distância total percorrida em metros. **D, E e F**- número de entradas no centro. **G, H, I**- tempo no centro. *Diferença significativa.

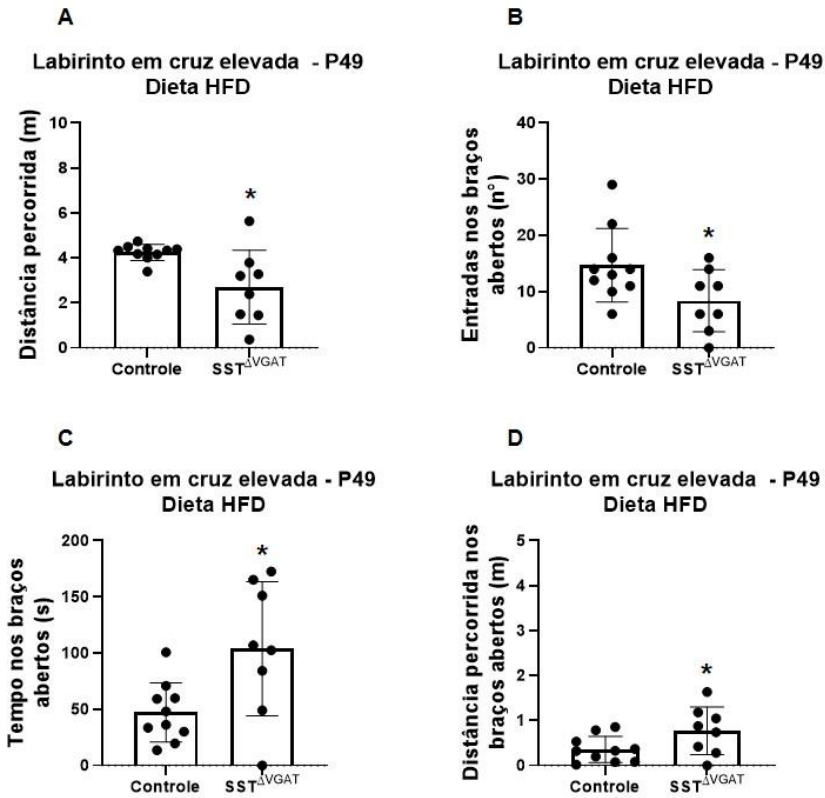


Figura 15. Parâmetros avaliados no teste de labirinto em cruz elevada em P49. **A-** distância total percorrida em metros. **B-** número de entrada nos braços abertos. **C-** tempo nos braços abertos. **D-** distância total percorrida nos braços abertos. *Diferença significativa.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos os efeitos fisiológicos da deleção genética da VGAT em células que expressam SST sobre aspectos metabólicos e comportamentais. Nossos resultados demonstraram que o GABA pode ser um neurotransmissor crítico para o efeito inibitório desempenhado pelos neurônios SST no controle do consumo alimentar. Como a exposição a uma dieta altamente palatável prolongou o tempo de sobrevivência dos animais SST^{ΔVGAT}, esse dado sugere que a progressiva perda de peso e conseqüentemente a morte por inanição está, de alguma forma, relacionada com circuitos que regulam o apetite e palatabilidade pela comida. Dessa forma, foi investigado núcleos que regulam a ingestão alimentar e que são inervados por neurônios SST e que conhecidamente são predominantemente GABAérgicos. Nossos resultados demonstraram ampla presença de células SST no ARH, TN, CEA e no núcleo intersticial da estria terminal (BSTN). Por outro lado, o PBNL e o NTS recebem densa inervação de fibras SST. Assim, com base nos nossos resultados e na literatura, é possível que a ausência da transmissão GABAérgica em neurônios SST afete distintas populações neuronais.

Um estudo que demonstrou um fenótipo semelhante ao nosso foi realizado em animais no qual houve a ablação dos neurônios AgRP, levando a um quadro de inanição quando realizada em animais adultos (WU Q, CLARK MS, PALMITER RD, 2009). Nesse trabalho, os autores observaram que a perda desses neurônios AgRP, e mais especificamente de sua transmissão GABAérgica, levava a uma hiperatividade de seus principais alvos pós-sinápticos, como o ARH, PVN, PBN e NTS, promovendo anorexia severa. Destes, o PBN demonstrou ser uma importante região que suprime apetite, pois ao tratar os animais com um agonista de GABA diretamente no PBN, foi possível prevenir a inanição (WU Q, CLARK MS, PALMITER RD, 2009). Porém, esse fenótipo é visto apenas quando a morte neuronal é feita em animais adultos. Quando a ablação é realizada em neonatos, o organismo provavelmente gera adaptações que permitem os animais ter um consumo alimentar normal. Como os camundongos SST^{ΔVGAT} do nosso experimento já nascem com a deleção gênica, mas não conseguem sobreviver, fica evidente que a capacidade dos neurônios SST em regular essa via parece ser maior que o efeito descrito pelos

neurônios AgRP, que são passíveis de compensações durante o desenvolvimento.

Como demonstrado na imunofluorescência, foi observada a presença de ativação neuronal (Fos) no PBNL dos animais $SST^{\Delta VGAT}$ que chegaram à idade adulta. Essa porção do PBN tem se mostrado ser particularmente importante no circuito que regula saciedade. Um estudo relevou que a indução de morte dos neurônios AgRP em camundongos adultos induzia uma ativação neuronal (Fos) especificamente no PBNL (CARTER et al., 2013). A partir desse resultado, os autores passaram a investigar qual população neuronal no PBNL estava ativada nesse modelo animal. Eles descobriram que os neurônios que expressam a CGRP representavam os neurônios que expressavam Fos após ablação dos neurônios AgRP. Assim, eles provaram que a ablação de neurônios AgRP desinibe os neurônios CGRP do PBNL, aumentando a saciedade e suprimindo o apetite. Uma vez que constatamos ativação neuronal no PBNL dos animais $SST^{\Delta VGAT}$ com 49 dias, foi investigada no presente trabalho a identidade neuroquímica desses neurônios que estavam ativos no PBNL. Foi observado que os neurônios que expressam a CGRP que estavam ativos nos animais $SST^{\Delta VGAT}$, embora também tenha sido observado Fos em outras regiões do PBN cuja identidade neuroquímica é desconhecida. Além disso, foi constatado que os neurônios CGRP do PBNL recebem ampla inervação somatostatinérgica. A literatura demonstra que a ativação crônica de neurônios que expressam CGRP no PBNL ou suas projeções para o CeA, causa profunda anorexia em camundongos, por reduzir o consumo alimentar e peso (CARTER et al., 2013). Assim, é possível que nos camundongos $SST^{\Delta VGAT}$, o efeito inibitório desempenhado pelos neurônios SST sobre o PBNL, possa ter sido afetado. Assim, foi postulado que a ausência da transmissão GABAérgica dos neurônios SST possa estar desinibindo os neurônios CGRP do PBNL, levando-os a estarem tonicamente ativos e assim, gerando constantemente um sinal de saciedade e supressão do apetite.

Uma outra região que pode ter sido afetada e que está relacionada com a regulação do consumo alimentar é o NTS, pois nossos resultados demonstraram ativação neuronal no NTS dos animais $SST^{\Delta VGAT}$ com 21 e 49 dias de vida. O NTS funciona como uma porta de entrada das informações que vem do TGI para

o SNC, sendo descrito, portanto, como o primeiro relé central que recebe informações viscerais relacionadas com a ingestão alimentar. Essa informação é retransmitida para outros núcleos envolvidos na supressão do consumo alimentar, como o PBN e o CeA (ROMAN CW, DERKACH VA, PALMITER RD, 2016; MOURA-ASSIS A, FRIEDMAN JM, VELLOSO LA., 2020). O NTS é uma região encefálica que possui diversos tipos neuronais expressando uma variedade de neurotransmissores e neuromoduladores (ROMAN CW, DERKACH VA, PALMITER RD, 2016). Assim, buscamos identificar qual população neuronal estava ativa no NTS nos camundongos SST^{AVGAT} . Foi identificado que a ativação neuronal vista no NTS é derivada dos neurônios que expressam a enzima tirosina β -hidroxilase (TH), sendo, portanto, neurônios catecolaminérgicos (CA^{NTS}). Existem fortes evidências que a ativação dos neurônios CA^{NTS} suprimem o consumo alimentar (ROMAN CW, DERKACH VA, PALMITER RD, 2016). O NTS está diretamente relacionado com o efeito de supressão do apetite mediado pelo PBNL, pois este último depende da sinalização do NTS. Os sinais de saciedade gerados a curto prazo durante a ingestão alimentar, como a colecistocinina (CCK) e o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP1), ativam as fibras sensoriais vagais e estas, fazem sinapse com neurônios do NTS e da área postrema (BEYELER A, DABROWSKA J, 2020). Os neurônios do NTS enviam projeções para o PBNL, especificamente os neurônios CGRP, que por sua vez processam esses sinais de saciedade e geram supressão do apetite (ROMAN CW, DERKACH VA, PALMITER RD, 2016).

Porém, apesar do NTS ser comumente associado à saciedade, um estudo recente demonstrou que a ativação quimiogénica dos neurônios CA^{NTS} estimulam o consumo alimentar de camundongos, mesmo durante a fase clara, quando o estímulo para o consumo alimentar é normalmente diminuído (CHEN et al., 2020). Os neurônios CA^{NTS} induzem fome por ativarem os neurônios AgRP do ARH (AKLAN et al., 2020). Essa aparente contradição no qual os neurônios CA^{NTS} medeiam efeitos opostos, pode ser explicada pelo fato de existirem duas subpopulações distintas de neurônios CA^{NTS} , uma que se projeta para o PBN e media saciedade, outra que se projeta para o ARH e media fome (AKLAN et al., 2020). Considerando que foi identificado que são os neurônios CA^{NTS} que estão

ativos no NTS e que o NTS recebe forte inervação de neurônios SST, é possível que a falta da transmissão GABAérgica esteja levando a uma hiperatividade do NTS, que por sua vez, pode afetar a atividade dos neurônios CGRP, já que o NTS se comunica diretamente com os neurônios CGRP do PBNL. Dessa forma, o NTS pode estar sendo tonicamente ativo nos camundongos SST^{ΔVGAT}, levando-os a um estado de constante saciedade, mesmo isso não representando o estado nutricional do animal.

Contudo, a expressão de Fos também foi observada no ARH dos animais SST^{ΔVGAT} com 21 e 49 dias de vida. Foi identificado que são os neurônios AgRP que estavam expressando Fos. Esse resultado evidencia que os neurônios AgRP estão respondendo aos sinais periféricos de privação de alimento. Os neurônios AgRP são conhecidos como neurônios de primeira ordem, pois são os primeiros a receberem informações sobre a privação de energia e assim, responder a esses sinais estimulando fortemente o consumo alimentar (DENIS et al., 2015). Contudo, apesar dos neurônios AgRP estarem ativos e, portanto, estimulando fome, os camundongos SST^{ΔVGAT} de alguma forma não conseguem responder a esse estímulo. É possível que seja resultado da hiperatividade observada nos neurônios CGRP do PBNL e/ou dos neurônios CA^{NTS}, que podem estar gerando um sinal intenso de saciedade. Esses dados sugerem que a transmissão GABAérgica por meio dos neurônios SST são essenciais para a regulação do consumo alimentar e que consegue se sobrepôr à ativação observada nos neurônios AgRP.

Considerando a hipótese que neurônios expressando SST estão mediando o efeito anorexígeno no PBN, foi investigado quais núcleos expressando SST projetam-se para o PBN e assim, podem ser potenciais candidatos responsáveis pela supressão do apetite no nosso modelo animal. Para isso, foi injetado um traçador retrógrado (Fluoro-gold) no PBN, afim de identificar quais regiões encefálicas projetam-se para o PBN. Ademais, foi realizado a co-localização do fluoro-gold com SST, a fim de verificar quais núcleos projetam-se para o PBN e são somatostatinérgicos. Foi identificado que dentre todos os núcleos que se projetam para o PBN, apenas o CeA e BSTN são somatostatinérgicos. Interessantemente, o CeA é um núcleo que também participa do circuito que regula o consumo alimentar, pois os neurônios CGRP

do PBNL retransmitem informações tanto de saciedade quanto gustativa para regiões encefálicas como o CeA e o BSTN (PALMITER., 2018). Um estudo demonstrou que a maior fonte de projeções de axônios para o PBN origina-se do CeA (LUNDY R., 2020). Destas projeções, cerca de 40% dos neurônios do CeA que se projetam para o PBN são somatostatinérgicos e também co-expressam GABA (BARTONJO and LUNDY, 2020; LUNDY., 2020). Considerando a complexa conexão existente entre o PBN e o CeA, este último é um potencial candidato responsável pela modulação da atividade dos neurônios CGRP no PBNL. Uma vez que tanto o PBN quanto o CeA podem modular a atividade um do outro, esse fato pode explicar em parte a presença de ativação neuronal vista no PBNL dos animais $SST^{\Delta VGAT}$, uma vez que foi retirada a transmissão GABAérgica dos neurônios SST, isso pode ter levado a desinibição dos neurônios CGRP do PBNL.

O CeA expressa dois principais neuropeptídios, a SST e o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (LUNDY R., 2020). Evidências demonstram que a subdivisão lateral do CeA contém uma subpopulação de neurônios GABAérgicos que expressam a proteína kinase C- δ (PKC- δ) (DOUGLAS et al., 2017). Os autores comprovaram que neurônios PKC- δ do CeA lateral de camundongos são ativados por diversos sinais anoxerigênicos, suprimindo fortemente o consumo alimentar, quando ativados. Assim, foi investigado se esses neurônios se projetam para o PBN. Foi identificado que os neurônios PKC δ do CeA e BSNT não se projetam para o PBN. Dessa forma, descartamos a possibilidade de ser os neurônios PKC δ do CeA que poderia estar mediando o efeito de supressão do apetite no nosso modelo animal.

Estudos eletrofisiológicos provaram que a estimulação do CeA leva a inibição no PBN (LUNDY R., 2020). Dessa forma, o CeA exerce basicamente um efeito inibitório sobre o PBN. Sabendo disso, foi testado se a ativação aguda do CeA poderia levar a inibição do PBN e assim, ser capaz de aumentar o consumo alimentar. Para isso, o vírus que expressa o receptor excitatório hM3Dq foi injetado bilateralmente no CeA de animais SST^{cre} , uma vez que o vírus é expresso de maneira Cre-dependente. O CNO ou salina foram injetados perifericamente e o consumo alimentar foi avaliado em diferentes tempos. Foi observado que não houve diferença significativa no consumo alimentar entre

animais hM3Dq e controles nos diferentes tempos avaliados. É possível que não tenha sido observado aumento no consumo alimentar desses animais por ter sido avaliado apenas o efeito agudo e não crônico da ativação dos neurônios do CeA sobre o consumo alimentar.

A literatura demonstra que diferentes populações de neurônios do CeA modulam neurônios responsivos ao paladar no PBN e NTS (BARTONJO and LUNDY, 2020). Por exemplo, o CeA possui uma população neuronal que expressa o receptor de serotonina (Htr2a), promovendo reforço positivo no consumo alimentar (DOUGLAS et al., 2017). Esses neurônios Htr2a do CeA geram esse efeito por meio da inibição de longo alcance de neurônios do PBN, provavelmente os neurônios CGRP. Foi demonstrado que a atividade dos neurônios Htr2a do CeA é modulada e reforçada por recompensa alimentar (DOUGLAS et al., 2017). Assim, no contexto do comportamento alimentar, esses neurônios parecem promover constantemente o consumo alimentar por meio de sinais positivos. Uma vez que a implementação de uma dieta altamente palatável, como a HFD, pôde prolongar o tempo de sobrevivência dos animais SST^{VGAT}, é possível que os neurônios do CeA tenham modulado a resposta do PBN frente a um estímulo palatável. Um dado que corrobora com essa ideia, é o fato de ao ser substituída a HFD pela ração padrão, os animais SST^{VGAT} morrerem rapidamente, sugerindo que o estímulo de uma dieta altamente palatável, é necessário para a sobrevivência desses animais na ausência da transmissão GABAérgica dos neurônios SST.

Dados recentes têm comprovado que o comportamento alimentar pode ser iniciado na ausência de necessidade homeostática energética (AHN BH, KIM M, KIM SY, 2022). Por exemplo, estímulos sensoriais como a visão, cheiro e sabor de alimentos palatáveis, podem estimular o apetite, mesmo quando os animais estão repletos de calorias. Apesar dos animais SST^{VGAT} estarem em déficit energético, como os neurônios CGRP estão ativos, o sinal de saciedade está sendo constantemente enviado. Assim, na presença da dieta padrão, o animal passa a comer cada vez menos, até morrer por inanição. Mas ao ter implementado uma dieta palatável, como a HFD, ela é capaz de estimular o apetite, possivelmente por vias cerebrais que estimulam o apetite não homeostático. Assim, o consumo alimentar é influenciado não apenas pela

necessidade da homeostase energética, mas também por fatores hedônicos (DENIS et al., 2015).

Dada a complexa conexão entre CeA e PBN, a hipótese é que os neurônios SST do CeA regulam a informação de saciedade do PBN através da transmissão GABAérgica. Uma vez que o BSTN também se projeta para o PBN, mas sua ação sobre o PBN até então é desconhecida, talvez o BSNT também esteja envolvido nos efeitos observados no presente trabalho sobre o consumo alimentar. Nos camundongos SST^{ΔV_{GAT}} ao retirarmos a transmissão GABAérgica dos neurônios SST, é possível que o CeA, e talvez outras populações neuronais, deixem de enviar a transmissão inibitória sobre o PBN, deixando esse núcleo tonicamente ativo. Nossos resultados sugerem que o GABA é essencial para o efeito inibitório desempenhado pelos neurônios SST sobre o PBN. Até então o papel da transmissão GABAérgica pelos neurônios expressando SST sobre o PBN era desconhecido.

5. CONCLUSÃO

No nosso estudo, foi investigado o papel inibitório feito pelos neurônios SST sobre o consumo alimentar. No presente estudo, lançamos luz sobre um potencial circuito neural capaz de mediar a supressão do apetite, desempenhado pelos neurônios SST, possivelmente do CeA e BSTN, sobre os neurônios CGRP do PBNL e catecolaminérgicos do NTS. As evidências demonstradas no presente estudo indicam que a inervação GABAérgica dos neurônios SST é um componente vital para a funcionalidade do circuito neural que controla consumo alimentar. Juntos, esses resultados ilustram quão complexa e sensitiva são as redes de sinalização GABAérgica que controlam apetite e palatabilidade pela comida e o possível envolvimento dos neurônios SST que co-expressam GABA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRENS S, WU MV, FURLAN A, HWANG GR, PAIK R, LI H, PENZO MA, TOLLKUH N J, LI B. "A Central Extended Amygdala Circuit That Modulates Anxiety". *J Neurosci*. 2018, 38 (24) 5567-5583.

AHN BH, KIM M, KIM SY. *Brain circuits for promoting homeostatic and non-homeostatic appetites*. *Exp Mol Med*. 2022, Apr;54(4):349-357.

AKLAN I, SAYAR ATASOY N, YAVUZ Y, ATES T, COBAN I, KOKSALAR F, FILIZ G, TOPCU IC, ONCUL M, DILSIZ P, CEBECIOGLU U, ALP MI, YILMAZ B, DAVIS DR, HAJDUKIEWICZ K, SAITO K, KONOPKA W, CUI H, ATASOY D. *NTS Catecholamine Neurons Mediate Hypoglycemic Hunger via Medial Hypothalamic Feeding Pathways*. *Cell Metab*. 2020, Feb 4;31(2):313-326.e5.

AMPOFO, E.; NALBACH, L.; MENDER, M.D.; LASCHKE, M.W. *Regulatory Mechanisms of Somatostatin Expression*. *Int J Mol Sci*. 2020, Jun 11;21(11):4170.

ANDERMANN ML, LOWELL BB. *Toward a Wiring Diagram Understanding of Appetite Control*. *Neuron*. 2017, Aug 16;95(4):757-778.

BARTONJO JJ, LUNDY RF. *Distinct Populations of Amygdala Somatostatin-Expressing Neurons Project to the Nucleus of the Solitary Tract and Parabrachial Nucleus*. *Chem Senses*. 2020, Nov 7;45(8):687-698.

BEN-SHLOMO A, MELMED S. "Pituitary somatostatin receptor signaling". *Trends Endocrinol Metab*. 2010, Mar;21(3):123-33.

BEYELER A, DABROWSKA J. "Neuronal diversity of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis". *Handb Behav Neurosci*. 2020, 26:63-100.

CARTER, MATTHEW E et al. "Genetic identification of a neural circuit that suppresses appetite." *Nature*. 2013, Nov 7;503(7474):111-4.

CHEN J, CHENG M, WANG L, ZHANG L, XU D, CAO P, WANG F, HERZOG H, SONG S, ZHAN C. *A Vagal-NTS Neural Pathway that Stimulates Feeding*. *Curr Biol*. 2020, Oct 19;30(20):3986-3998.e5.

DENIS RG, JOLY-AMADO A, WEBBER E, LANGLET F, SCHAEFFER M, PADILLA SL, CANSELL C, DEHOUCK B, CASTEL J, DELBÈS AS, MARTINEZ S, LACOMBE A, ROUCH C, KASSIS N, FEHRENTZ JA, MARTINEZ J, VERDIÉ P, HNASKO TS, PALMITER RD, KRASHES MJ, GÜLER AD, MAGNAN C, LUQUET S. *Palatability Can Drive Feeding Independent of AgRP Neurons*. *Cell Metab*. 2015, Apr 4;25(4):975.

DOUGLASS AM, KUCUKDERELI H, PONSERRE M, MARKOVIC M, GRÜNDEMANN J, STROBEL C, ALCALA MORALES PL, CONZELMANN KK, LÜTHI A, KLEIN R. "Central amygdala circuits modulate food consumption through a positive-valence mechanism". *Nat Neurosci*. 2017, Oct;20(10):1384-1394.

- EIGLER T, BEN-SHLOMO A. “*Somatostatin system: molecular mechanisms regulating anterior pituitary hormones*”. J Mol Endocrinol. 2014, Aug;53(1):R1-19.
- GOEBEL M, STENGEL A, WANG L, COSKUN T, ALSINA-FERNANDEZ J, RIVIER J, TACHÉ Y. “*Pattern of Fos expression in the brain induced by selective activation of somatostatin receptor 2 in rats*”. Brain Res. 2010, Sep 10;1351:150-164.
- KATO Y, MURAKAMI Y, SOHMIYA M, NISHIKI M. *Regulation of human growth hormone secretion and its disorders*. Intern Med. 2002, Jan;41(1):7-13.
- KIM J, ZHANG X, MURALIDHAR S, LEBLANC SA, Tonegawa S. “*Basolateral to Central Amygdala Neural Circuits for Appetitive Behaviors*”. Neuron. 2017, Mar 22;93(6):1464-1479.e5.
- KUMAR, Ujendra, and SNEHA Singh. “*Role of Somatostatin in the Regulation of Central and Peripheral Factors of Satiety and Obesity*.” International journal of molecular sciences vol. 21,7 2568. 7 Apr. 2020.
- LIGUZ-LECZGAR, Monika; URBAN-CIECKO, Joanna; KOSSUT, Malgorzata. *Somatostatin and somatostatin-containing neurons in shaping neuronal activity and plasticity*. Frontiers in neural circuits, v. 10, p. 48, 2016.
- LUNDY R. *Comparison of GABA, Somatostatin, and Corticotrophin-Releasing Hormone Expression in Axon Terminals That Target the Parabrachial Nucleus*. Chem Senses. 2020, May 21;45(4):275-282.
- LUO, Sarah Xinwei et al. “*Regulation of feeding by somatostatin neurons in the tuberal nucleus*.” Science (New York, N.Y.) vol. 361, 2018.
- MARAZIOTI A, PITYCHOUTIS PM, PAPADOPOULOU-DAIFOTI Z, SPYRAKI C, THERMOS K. “*Activation of somatostatin receptors in the globus pallidus increases rat locomotor activity and dopamine release in the striatum*”. Psychopharmacology (Berl). 2008, Dec;201(3):413-22.
- MARTEL G, DUTAR P, EPELBAUM J, VIOLLET C. “*Somatostatinergic systems: an update on brain functions in normal and pathological aging*”. Front Endocrinol (Lausanne), 2012, Dec 6;3:154.
- MOURA-ASSIS A, FRIEDMAN JM, VELLOSO LA. *Gut-to-brain signals in feeding control*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2021, Feb 1;320(2):E326-E332.
- MÜNSTER-WANDOWSKI, Agnieszka et al. “*Co-existence of Functionally Different Vesicular Neurotransmitter Transporters*.” Frontiers in synaptic neuroscience vol. 8 4. 16 Feb. 2016.
- MURRAY, P. G.; HIGHAM, Claire E.; CLAYTON, P. E. *60 Years Of Neuroendocrinology: The hypothalamo-GH axis: the past 60 years*. Journal of Endocrinology, v. 226, n. 2, p. T123-T140, 2015.
- OBATA K. *Synaptic inhibition and γ -aminobutyric acid in the mammalian central nervous system*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2013, 89(4):139-56.

PALMITER RD. The Parabrachial Nucleus: CGRP Neurons Function as a General Alarm. *Trends Neurosci.* 2018, May;41(5):280-293.

POWERS M. *GABA supplementation and growth hormone response.* *Med Sport Sci.* 2012, 59:36-46.

ROBINSON SL, THIELE TE. "A role for the neuropeptide somatostatin in the neurobiology of behaviors associated with substances abuse and affective disorders. *Neuropharmacology*". 2020, May 1;167:107983.

ROMAN CW, DERKACH VA, PALMITER RD. Genetically and functionally defined NTS to PBN brain circuits mediating anorexia. *Nat Commun.* 2016, Jun 15;7:11905.

SALLARD E, LETOURNEUR D, LEGENDRE P. *Electrophysiology of ionotropic GABA receptors.* *Cell Mol Life Sci.* 2021, Jul;78(13):5341-5370.

STENGEL, Andreas et al. "Central injection of the stable somatostatin analog ODT8-SST induces a somatostatin2 receptor-mediated orexigenic effect: role of neuropeptide Y and opioid signaling pathways in rats." *Endocrinology* vol. 151, 2010a.

STENGEL A, GOEBEL M, WANG L, RIVIER J, KOBELT P, MONNIKES H, TACHE Y. "Selective central activation of somatostatin receptor 2 increases food intake, grooming behavior and rectal temperature in rats". *J Physiol Pharmacol.* 2010b, Aug;61(4):399-407.

STENGEL A, KARASAWA H, TACHÉ Y. "The role of brain somatostatin receptor 2 in the regulation of feeding and drinking behavior". *Horm Behav.* 2015, Jul;73:15-22.

STENGEL, Andreas; TACHÉ, Yvette. *Central somatostatin signaling and regulation of food intake.* *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1455, n. 1, p. 98-104, 2019.

STEYN, Frederik J et al. "Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion." *Comprehensive Physiology* vol. 6,2 687-735. 15 Mar. 2016.

URBAN-CIECKO, J and BARTH, AL. *Somatostatin-expressing neurons in cortical networks.* *Nat Rev Neurosci.* 2016, Jul;17(7):401-9.

VIOLLET C, LEPOUSEZ G, LOUDES C, VIDEAU C, SIMON A, EPELBAUM J. "Somatostatinergic systems in brain: networks and functions". *Mol Cell Endocrinol.* 2008, May 14;286(1-2):75-87.

WOJCIK, Sonja M et al. "A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine." *Neuron* vol. 50, 2006.

WU Q, CLARK MS, PALMITER RD. "Deciphering a neuronal circuit that mediates appetite". *Nature.* 2012, Mar 14;483(7391):594-7.