



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PEDRO AUGUSTO SILVA NOGUEIRA

IDENTIFICAÇÃO DE GPCRS ENVOLVIDOS NO CONTROLE HIPOTALÂMICO
DO BALANÇO ENERGÉTICO

CAMPINAS

2022

PEDRO AUGUSTO SILVA NOGUEIRA

IDENTIFICAÇÃO DE GPCRS ENVOLVIDOS NO
CONTROLE HIPOTALÂMICO DO BALANÇO ENERGÉTICO

*Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,
na Área de Anatomia.*

Supervisor/Orientador: Prof. Dr. LICIO AUGUSTO VELLOSO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELO ALUNO PEDRO AUGUSTO SILVA
NOGUEIRA E ORIENTADO PELO PROF.
DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO

Campinas

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

N689i Nogueira, Pedro Augusto Silva, 1989-
Identificação de GPCRs envolvidos no controle hipotalâmico do balanço energético / Pedro Augusto Silva Nogueira. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Licio Augusto Velloso.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Obesidade. 2. Receptores acoplados a proteínas G. 3. Hipotálamo. 4. Melanocortinas. 5. Regulação alostérica. 6. Dieta hiperlipídica. I. Velloso, Licio Augusto, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification of GPCRs involved in the hypothalamic control of energy balance

Palavras-chave em inglês:

Obesity
Receptors, G-protein-coupled
Hypothalamus
Melanocortins
Allosteric modulators
Diet, High-fat

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Licio Augusto Velloso [Orientador]
Renata Frazão
Helena Cristina de Lima Barbosa
Aline Mara dos Santos
Lucila Leico Kagohara Elias

Data de defesa: 11-05-2022

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8916-6589>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6192635075065054>

Campinas, 11 de Maio de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

Prof.(a). Dr(a). Renata Frazão

Prof.(a) Dr(a). Helena Cristina de Lima Barbosa

Prof.(a) Dr(a). Aline Mara dos Santos

Prof.(a) Dr(a). Lucila Leico Kagohara Elias

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todas as vítimas da pandemia causada pelo SARS-COV-2, bem como a todos os profissionais da área da saúde que trabalharam de modo incessante durante toda a pandemia.

Para todas as pessoas que perderam parentes e amigos durante esse período catastrófico de pandemia, dedico meus sinceros e profundos sentimentos.

Dedico também a todas as vítimas e povos envolvidos em conflito armado em todo o mundo. Meus sinceros sentimentos a todas essas pessoas.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e Código de Financiamento Bolsa de Doutorado 88882.329652/2019-01.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à professora Dra. **Renata Zanon** e à pesquisadora **Daniela Razolli**, que sempre me motivaram, estimularam e me fizeram acreditar na minha capacidade. Agradeço aos meus familiares e aqueles amigos que considero como familiares, por estarem sempre por perto e me apoiando nos momentos mais delicados durante o Doutorado.

Em especial, agradeço ao meu orientador, professor **Licio Velloso**, por toda paciência, atenção e dedicação na execução desse projeto. Foram anos de muita discussão e reuniões científicas que fizeram uma grande diferença na minha vida e impactaram de modo positivo no meu amadurecimento, tanto como ser humano quanto como pesquisador.

Agradeço aos colaboradores **Alexandre Moura-Assis**, **Ariane Maria ZanESCO** e **Bruna Bombassaro**, que foram muito importantes na condução desse trabalho, assim como os funcionários e técnicos **Joseane**, **Érika**, **Gerson** e **Márcio**, por todo carinho e atenção.

Por fim, agradeço aos amigos que a cidade de Campinas me proveu, bem como os amigos de laboratório, que serão lembrados sempre na minha vida em qualquer momento, com muito carinho e amor.

RESUMO

Obesidade e sobrepeso afetam mais da metade da população mundial, sendo hoje considerados problemas de saúde pública. O controle do peso corporal, comportamento alimentar e homeostase energética são mantidos pelo sistema melanocortina hipotalâmico, composto por neurônios de primeira ordem, anorexigênicos (POMC e CART) e orexigênicos (AgRP e NPY), presentes no núcleo arqueado do hipotálamo que detectam tanto níveis hormonais circulantes (leptina, insulina, grelina e colecistoquinina), quanto componentes alimentares (ácidos graxos). Assim, esses neurônios integram esses sinais periféricos e produzem os neuropeptídeos (POMC/CART e NPY/AGRP) que mantêm a homeostase energética. Entretanto, o aumento na ingestão de alimentos ricos em gorduras saturadas promove uma regulação anômala do neuropeptídeo POMC e um quadro de inflamação hipotalâmica que leva ao estabelecimento de um fenótipo obeso. Como estratégia terapêutica para manejo da obesidade, são utilizados alguns fármacos, como os análogos do GLP1 (peptídeo 1 semelhante ao glucagon), baseados em receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Apesar de não existir tratamento efetivo para obesidade e de ser uma condição patológica sistêmica que afeta vários órgãos, ainda se torna necessária a identificação de novos componentes e de novos alvos terapêuticos que possam contribuir para o reestabelecimento da homeostase energética. Desse modo, nosso estudo identificou, por meio de estudos preliminares em bases de dados, dois novos GPCRs (GPR68 e GPR139), ambos presentes no sistema melanocortina hipotalâmico e modulados pelo curto período de alimentação em dieta hiperlipídica (HFD) e por privação de nutrientes. Além disso, nossas abordagens farmacológicas, por meio de moduladores alostéricos positivos (PAM) e negativos (NAM) do GPR68, mostraram seu efeito no controle da ingestão alimentar. Por meio da inibição parcial do GPR139, pontuamos que esse receptor é importante no controle da glicemia, peso corporal e ingestão alimentar. Logo, os novos participantes, GPR68 e GPR139, caracterizados nesse trabalho, mostraram estar relacionados diretamente com o comportamento alimentar (GPR68 e GPR139), bem como a manutenção adequada do peso corporal e homeostase glicêmica (GPR139).

Palavras chaves: Obesidade, GPCRs órfãos, hipotálamo, sistema melanocortina e moduladores alostéricos

ABSTRACT

Obesity and overweight affect more than half of the world's population and are now considered public health problems. Body weight control, feeding behavior and energy homeostasis are maintained by the hypothalamic melanocortin system, composed of first-order anorexigenic (POMC and CART) and orexigenic (AgRP and NPY) neurons present in the arcuate nucleus of the hypothalamus that detect both hormone levels circulating substances (leptin, insulin, ghrelin and cholecystokinin), as well as food components (fatty acids). Thus, these neurons integrate these peripheral signals and produce neuropeptides (POMC/CART and NPY/AGRP) that maintain energy homeostasis. However, the increase in the intake of foods rich in saturated fats promotes an anomalous regulation of the neuropeptide POMC and a picture of hypothalamic inflammation that leads to the establishment of an obese phenotype. As a therapeutic strategy for obesity management, some drugs are used, such as GLP1 (glucagon-like peptide 1) analogues, based on G protein-coupled receptors (GPCRs). Although there is no effective treatment for obesity and it is a systemic pathological condition that affects several organs, it is still necessary to identify new components and new therapeutic targets that can contribute to the reestablishment of energy homeostasis. Thus, our study identified, through preliminary database studies, two new GPCRs (GPR68 and GPR139), both present in the hypothalamic melanocortin system and modulated by short-term high-fat diet (HFD) and nutrient deprivation. In addition, our pharmacological approaches, through positive (PAM) and negative (NAM) allosteric modulators of GPR68, have shown their effect in controlling food intake. Through the partial inhibition of GPR139, we pointed out that this receptor is important in the control of blood glucose, body weight and food intake. Therefore, the new participants, GPR68 and GPR139, characterized in this work, showed to be directly related to eating behavior (GPR68 and GPR139), as well as the adequate maintenance of body weight and glycemic homeostasis (GPR139).

Keywords: Obesity, orphan GPCRs, hypothalamus, melanocortin system and allosteric modulators.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 loops extracelulares (ECL1-3)

3 loops intracelulares (ICL1-3)

Adenilil ciclase (cAMP)

Brown Adipose Tissue (BAT)

C57BL/6J Unib

Carboxipeptidase E (CPE)

Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC)

Colecistoquinina (CCK)

Diacilglicerol (DAG)

Dieta hiperlipídica (HFD)

Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD)

Enzima pró-hormônio convertase 1 (PC1)

Fator de Necrose Tumoral (TNF α)

Fosfolipase β (PLC β)

Fragmentos por mil de nucleotídeos por milhão de leituras mapeadas (FPKM)

G protein-coupled receptors (GPCRs)

Guanosina Difosfato (GDP)

Guanosina Trifosfato (GTP)

Free Fatty Acids 3-FFA3 (GPR41)

Free Fatty Acids 2-FFA2 (GPR43)

Hipotálamo lateral (LH)

Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH)

Hormônio concentrador de melanina (MCH),

Hormônio estimulante de melanócito (MSH)

Hormônio estimulante de Melanócitos alfa (α -MSH)

Hormônio liberador de corticotrofina (CRH)

Hormônio liberador de tireotrofina (TRH)

Índice de Massa Corporal (IMC)

Inositol fosfato (IP3)

Interleucina 1 beta (IL1 β)

Interleucina 6 (IL6)

Intracerebroventricular (ICV)

IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology)

Knockdown (KD)

knockdown do gpr139 (KD-GPR139)

MECA (melanocortina, endoteliais, canabinoides e adenosina)

Modulador alostérico negativo (NAM)

Modulador alostérico positivo (PAM)

National Center for Health Statistics (NCHS)

Neuropeptídeo Y (NPY)

Núcleo arqueado (ARC)

Núcleo paraventricular (PVN)

Orexina (ORE)

Organização Mundial de Saúde (OMS)

Peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1)

Peptídeo YY (PYY)

Pró-hormônio convertase (PC2)

Prolil carboxipeptidase (PRCP)

Proopiomelanocortina (POMC)

Proteína quinase A (PKA)

Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)

Proteína relacionada ao agouti (AgRP)

Quinases de proteína G (GRK)

Receptor de dopamina 2 (DRD2)

Receptor de GLP-1 (GLP-1R)

Receptor semelhante ao Toll 4 (TLR4)

Receptores acoplados à proteína G (GPCRs)

Receptores de Melanocortina (MCR)

Receptores de Melanocortina do tipo 3 (MC3R)

Receptores de Melanocortina do tipo 4 (MC4R)

Receptores de NPY (NPY1-5R)

Receptores sete α hélice transmembrana (7TM)

Sistema Nervoso Central (SNC)

Tecido adiposo branco epididimal (WATep.)

Tecido adiposo branco inguinal (WATing.)

Terceiro ventrículo (3V)

TGF- β 1 (transforming grow factor beta 1)

Transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART)

Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL)

α peptidil amino mono oxigenasse (PAM)

SUMÁRIO

1-Resumo-----	5
2-Abstract-----	6
3-Lista de Abreviaturas e Siglas-----	7
4-Introdução-----	11
5-Justificativas-----	23
6-Objetivos-----	24
7-Materiais e Métodos-----	25
8-Resultados-----	30
9-Discussão-----	45
10-Conclusões-----	55
11-Referências-----	56
12-Anexos-----	59

INTRODUÇÃO

Aspectos Epidemiológicos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define obesidade e sobrepeso como o acúmulo anormal ou excessivo de tecido adiposo branco, resultando em risco aumentado de comprometimento da saúde dos indivíduos (WHO, 2019). O principal critério utilizado para avaliar e classificar o estado nutricional dos indivíduos é o Índice de Massa Corporal (IMC), uma grandeza obtida por meio da razão entre o peso corporal em quilogramas pelo quadrado da altura em metros. Assim, é possível classificar os indivíduos em sobrepeso (IMC entre 25 e 29,9 Kg/m²) e obesos, com IMC maior ou igual a 30 Kg/m² (WHO, 2020).

A partir desse critério, a OMS mostrou que no ano de 2016 cerca de 39% da população mundial foi considerada com sobrepeso ou obesa. Em valores absolutos, isso representa mais de 1,9 bilhão de indivíduos adultos maiores de dezoito anos. Desse total, 13% ou 650 milhões de indivíduos são considerados obesos. Além dos elevados índices de obesidade e sobrepeso na população de indivíduos adultos, a população de crianças menores de 5 anos, também é afetada, existindo mais de 38 milhões de crianças com sobrepeso ou obesidade no mundo (WHO, 2020).

No Brasil, o Ministério da Saúde e a Secretaria de Vigilância em Saúde, por meio da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), estimaram que no ano de 2010, no conjunto das 27 capitais brasileiras, a prevalência de sobrepeso e obesidade eram de 48,1% e 15% em indivíduos adultos maiores de 18 anos, respectivamente. Porém, após dez anos, os valores de prevalência de sobrepeso e obesidade na população brasileira cresceram e atingiram 57,5% e 21,5% em indivíduos adultos (VIGITEL, 2020), corroborando os estudos mundiais e confirmando o aumento do IMC da população ao longo de curtos intervalos de tempo.

De acordo com a relação entre prevalência de obesidade e fatores socioeconômicos, Jaacks e colaboradores (2019) propuseram diferentes estágios de transição da prevalência de obesidade e fatores socioeconômicos entre os indivíduos de sexo masculino e feminino. Assim, o estágio em que o Brasil transita é marcado pelo aumento na prevalência de adultos obesos, com redução da diferença entre os sexos e níveis socioeconômicos, como mostrado pelo VIGITEL no ano de 2020.

O rápido aumento na prevalência de sobrepeso e obesidade entre os indivíduos está relacionado com as transformações industriais e socioeconômicas ocorridas a partir da década de 1970. A introdução da mecanização na indústria alimentícia transformou o processo produtivo de alimentos, proporcionando maior oferta e disponibilidade de alimentos com grande densidade energética, ricos em gorduras. Esse fator, promoveu efeitos diretos no balanço energético da população, contribuindo assim para o aumento no IMC da população (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017).

Além disso, o estilo de vida rural (consumo de alimentos com baixo grau de processamento e baixa densidade energética, aliados a baixos níveis de sedentarismo) passou a ser substituído pela adoção de um estilo de vida urbano (redução no gasto energético em atividades físicas e de trabalho e aumento da ingestão de alimentos industrializados com grande densidade energética). Desse modo, o estilo de vida urbano e a mudança no padrão alimentar favoreceram o ganho de peso corporal e, conseqüentemente, obesidade entre os indivíduos (SWINBURN et al., 2011).

Alimentos Industrializados e Homeostase energética

O advento da indústria alimentícia trouxe inovações no processamento dos alimentos que culminaram na substituição de alimentos *in natura* por alimentos modificados por processos industriais, como por exemplo, os alimentos ultraprocessados, que possuem em suas formulações dietéticas substâncias derivadas de alimentos *in natura*, bem como a adição de sal, açúcar, óleos e gorduras. Esses alimentos são altamente palatáveis, mimetizam propriedades sensoriais de alimentos *in natura* e passam por processos de cozimento ou fritura antes de serem empacotados (MOUBARAC et al., 2014).

A relação entre consumo de alimentos ultraprocessados e obesidade ainda não está totalmente clara. Contudo, alguns estudos mostram que o consumo de alimentos industrializados, como os alimentos ultraprocessados, oferece risco à saúde dos indivíduos, pois está associado com ganho de peso corporal, obesidade, aumento na prevalência de síndrome metabólica e risco de hipertensão arterial (POTI et al., 2017). Contudo, o componente ácido graxo saturado parece ser importante no desequilíbrio energético e ganho de peso corporal.

Assim, um estudo clínico mostrou que, indivíduos adultos alimentados durante duas semanas com alimentos ultraprocessados (13,1 g/1.000 kcal. de gordura saturada)

ganharam $0,9 \pm 0,3$ Kg. de peso corporal e, $0,4 \pm 0,1$ Kg. de gordura corporal, quando comparados com indivíduos alimentados durante o mesmo período com dieta de alimentos não processados (7,6 g/1.000 kcal. de gordura saturada). Para ambos os grupos, foram oferecidas refeições isocalóricas com diferentes quantidades de gordura saturada. Assim, o curto período de alimentação em dieta ultraprocessada aumentou significativamente o peso corporal dos indivíduos (HALL et al., 2019).

As principais mudanças no padrão alimentar da população foram em relação aos constituintes das dietas, como gorduras e ácidos graxos. Em 2017, Raatz e colaboradores mostraram que quanto maior era o grau de obesidade nos indivíduos (Grau 1, IMC: 30-34,9 Kg/m²; Grau 2, IMC: 35-39,9 Kg/m² e Grau 3, IMC \geq 40 Kg/m²), maior foi o consumo de gorduras e ácidos graxos, estabelecendo uma relação entre obesidade e consumo de gorduras totais e ácidos graxos do tipo saturado. Em contrapartida, indivíduos eutróficos consumiram menos gorduras totais e menos ácidos graxos (RAATZ et al., 2017). Portanto, o padrão alimentar de indivíduos obesos difere do padrão encontrado para indivíduos eutróficos, por conter maiores quantidades de gorduras e ácidos graxos nas dietas dos indivíduos obesos.

Por meio da ingestão de alimentos e líquidos, nosso organismo obtém energia química necessária para a manutenção das funções fisiológicas humanas. Esse processo de fornecimento e aquisição de energia é baseado na lei da conservação das massas, em que a energia adquirida nunca é perdida, é sempre transformada em outras formas de energia. Assim, a energia proveniente dos alimentos (calorias), é dissipada na forma de calor (termogênese), utilizada para manter funções fisiológicas basais e para realização de atividades de locomoção (HALL et al., 2012).

O modo como nosso organismo controla o peso corporal é por meio de uma série de funções que se integram para regular o balanço energético corporal. Para preservar o balanço energético, nosso organismo mantém estável o equilíbrio entre a quantidade de energia ingerida, e a quantidade de energia gasta para manutenção do metabolismo basal, termogênese e atividade locomotora. Desse modo, ocorre o equilíbrio energético (KRASHES et al., 2016).

O controle da homeostase energética é exercido pelo Sistema Nervoso Central (SNC), em específico, por uma área presente no diencefalo, na região médio basal do encéfalo, logo abaixo do sulco hipotalâmico e denominado de hipotálamo. Essa área está morfológicamente organizada e subdividida em diferentes núcleos (conjuntos de

células neurais e não neurais) responsáveis por executarem funções específicas. Esses núcleos se comunicam entre si e com outras regiões do cérebro, formando circuitos neurais capazes de integrar, por exemplo, sinais hormonais periféricos e controlar o comportamento alimentar, a homeostase energética e o peso corporal (SCHWARTZ et al., 2000; SHEN et al., 2017).

Sistema Melanocortina Hipotalâmico e Controle da Homeostase energética

O sistema melanocortina hipotalâmico é responsável pelo controle do comportamento alimentar e do gasto energético. Este sistema é composto por neurônios responsáveis por detectar sinais periféricos hormonais, como leptina e insulina, e sinais nutricionais, como ácidos graxos, e converter esses sinais em neuropeptídeos anorexigênicos e orexigênicos capazes de ativar receptores acoplados à proteína G (GPCRs), mantendo assim o equilíbrio energético (BALDINI e PHELAN, 2019).

Os neurônios do sistema melanocortina são subdivididos em neurônios anorexigênicos de primeira ordem, que expressam os neuropeptídeos transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) e proopiomelanocortina (POMC) e, estão dispostos dorsolateralmente ao terceiro ventrículo (3V) no parênquima no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo. Outra população de neurônios de primeira ordem, porém, orexigênicos, expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao agouti (AgRP), estão localizados ventromedialmente e próximo ao 3V no ARC (HILL, J. F; FAULKNER, L. D., 2017).

Os neurônios POMC se comunicam com neurônios de segunda ordem presentes no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo por meio de um subproduto da clivagem desse neuropeptídeo, o Hormônio Estimulante de Melanócitos alfa (α -MSH). Esse hormônio atua diretamente como um agonista dos Receptores de Melanocortina dos tipos 3 e 4 (MC3 e MC4R, ambos GPCRs) localizados principalmente no PVN. Desse modo, quando o α -MSH ativa os MC4R, ocorre um estímulo ao gasto energético com supressão da sensação de fome e redução na ingestão alimentar, assim os indivíduos aumentam sua sensação de saciedade (WATERSON, M. J.; HORVATH, T. L., 2015).

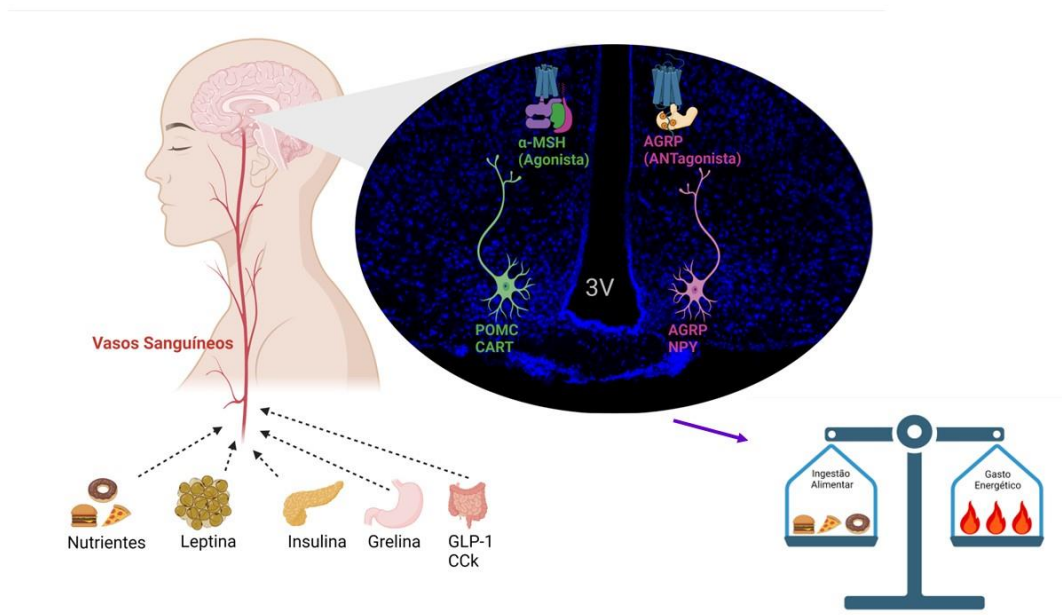


Figura 1: Sistema Melanocortina Hipotalâmico. O sistema melanocortina hipotalâmico integra sinais nutricionais e hormonais e produz neuropeptídeos hipotalâmicos responsáveis pelo controle da homeostase energética. POMC-pro opiomelancortina; Cart-transcrito regulado por cocaína e anfetamina; AgRP-peptídeo relacionado à proteína do Agouti; Npy-neuropeptídeo Y; α -MSH-hormônio estimulante de melanocortina alfa; 3V-terceiro ventrículo. Figura produzida no website BioRender.com.

O aumento nos níveis de nutrientes e níveis plasmáticos dos hormônios insulina e leptina ativa predominantemente neurônios POMC localizados no ARC. Esses neurônios, por meio de enzimas, promovem clivagens sucessivas nesse neuropeptídeo, que culmina na formação de α -MSH, que, por sua vez, atua como agonista dos receptores MC3 e 4 no PVN, induzindo aumento na produção hormônio liberador de tireotrofina (TRH), que é liberado e atua no eixo hipotálamo-pituitária-tireóide, promovendo aumento no metabolismo basal. Além disso, ocorre um aumento nos níveis do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), aumento na termogênese no tecido adiposo marrom e redução nos níveis hipotalâmicos do hormônio concentrador de melanina (MCH) no núcleo lateral do hipotálamo (LH), culminando na inibição da sensação de fome. Assim, ocorre um aumento do gasto energético e redução da sensação de fome e ingestão de nutrientes (WATERSON e HORVATH, 2015).

Em situações de privação de nutrientes (jejum) ou redução de estoques energéticos corporais, os níveis plasmáticos de leptina e insulina são reduzidos. Em resposta a essa redução, ocorre uma ativação predominantemente dos neurônios orexigênicos AgRP/NPY, que inibem (via neurotransmissor GABA) os neurônios

POMC e emitem projeções celulares diretas para o PVN, atuando como antagonistas dos receptores MC3 e 4. Assim, ocorre redução dos níveis de hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e, aumento da expressão de orexina (ORE) e hormônio concentrador de melanina (MCH) no núcleo lateral do hipotálamo (LH) resultando em redução do gasto energético e aumento da sensação de fome (VAN DE SANDE-LEE; VELLOSO, L. A. 2012; WATERSON e HORVATH, 2015).

Além dos hormônios leptina e insulina, o trato gastrointestinal produz e secreta hormônios como a grelina, peptídeo YY (PYY), colecistoquinina (CCK) e o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1). Esses hormônios possuem ações no sistema melanocortina hipotalâmico e atuam tanto na supressão da ingestão alimentar (CCK e GLP-1) quanto na estimulação (grelina) da ingestão alimentar (KIM et al., 2018). Além dos efeitos supressores no consumo alimentar, os agonistas do receptor de GLP-1 (GLP-1R) têm sido utilizados como modalidade terapêutica para pacientes com obesidade e diabetes mellitus tipo 2, por reduzir a glicemia plasmática. O GLP-1 atua de modo incretínico, sendo liberado logo após a ingestão alimentar (hiperglicemia) e potencializa a liberação de insulina e supressão de glucagon (NAUCK et al., 2019).

Efeitos da Dieta Hiperlipídica no Sistema Melanocortina Hipotalâmico

Mudanças no comportamento alimentar, como o aumento no consumo de ácidos graxos saturados, podem interferir no funcionamento adequado do sistema melanocortina hipotalâmico, promovendo uma desregulação desse circuito que culmine no desequilíbrio energético. Nessa perspectiva, foi levantada a hipótese de que o consumo a longo prazo de dietas ricas em ácidos graxos saturados teria impacto direto no hipotálamo. Para confirmar essa hipótese, De Souza e colaboradores (2005), mostraram que quando ratos foram alimentados durante 16 semanas com dieta rica em ácidos graxos saturados (45% de Kcal provenientes de gorduras), e comparados a ratos alimentados durante 16 semanas com dieta convencional (10% de Kcal em gorduras), houve aumento significativo dos genes pró inflamatórios Fator de Necrose Tumoral (TNF α), Interleucina 6 (IL6), Interleucina 1 beta (IL1 β), além de aumento significativo no conteúdo proteico de TNF α , IL6 e IL1 β . Nesse mesmo estudo, foi mostrado que o consumo crônico de dieta hiperlipídica prejudicou a responsividade à insulina e promoveu resistência a esse hormônio no hipotálamo (DE SOUZA et al., 2005).

Os ácidos graxos saturados provenientes da alimentação iniciam o processo inflamatório por meio de um componente do sistema imune inato, o receptor semelhante ao Toll 4 (TLR4). Quando ativo, TLR4 induz a transcrição de citocinas pró inflamatórias e proteínas de estresse do retículo endoplasmático, porém, a inibição periférica (intraperitoneal) de TLR4 ou inibição central hipotalâmica (intracerebroventricular) em ratos alimentados com dieta rica em ácidos graxos saturados reduz significativamente a expressão gênica de TNF- α e IL-1 β , atenua o ganho de peso corporal (tratamento periférico) e diminui a variação de massa corporal (tratamento central), mostrando a importância deste receptor no processo inflamatório induzido por dieta hiperlipídica (MILANSKI et al., 2009).

Contudo, os sinais inflamatórios que acometem o hipotálamo começam muito precoces, antes mesmo do ganho de peso corporal e estabelecimento do fenótipo obeso. Thaler e colaboradores (2012) demonstraram que os sinais inflamatórios que acometem o hipotálamo, decorrentes do consumo de dieta hiperlipídica (60% gordura), ocorrem após um dia de alimentação em dieta hiperlipídica. Nesse estudo foi pontuado que houve aumento significativo na transcrição gênica de IL6 e TNF- α no hipotálamo, porém sem ativação de células da glia nesse curto período. Entretanto, após três dias da introdução da dieta hiperlipídica ocorreu uma ativação de células da micróglia no hipotálamo, destacando o papel de outros tipos celulares envolvidos na resposta imune (THALER et al., 2012).

Não obstante, Souza e colaboradores (2016), utilizando camundongos heterogêneos da linhagem Swiss, mostraram que antes da instalação do processo inflamatório hipotalâmico ocorre uma regulação anômala do neuropeptídeo POMC. Nesse estudo, os camundongos propensos a obesidade (OP), após 12 horas de alimentação com HFD, exibiram redução significativa no transcrito de POMC sem alterar NPY e as citocinas pró inflamatórias IL6 e TNF alfa, visto que, após 24 horas de consumo de HFD, o mesmo grupo, OP, mostrou aumento significativo de POMC e IL6 e TNF alfa, indicando que o desequilíbrio do neuropeptídeo POMC antecedeu os sinais inflamatórios provocados pela dieta hiperlipídica.

O neuropeptídeo POMC existe sob forma de pró-peptídeo, o qual sofre sucessivas clivagens pós tradução até formar o α -MSH. Nesse processo, a enzima pró-hormônio convertase 1 (PC1) cliva o pré-hormônio POMC em β -Lipotrofina e pró-ACTH. Essa mesma enzima é também responsável por clivar o pró-ACTH em

ACTH₁₋₃₉ enquanto β -Lipotrofina é clivado e forma β -Endorfina, e o hormônio estimulante de melanócito (MSH) β . O ACTH₁₋₃₉ sofre clivagem enzimática pelo pró-hormônio convertase (PC2) e forma o ACTH₁₋₁₇, que sofre ação catalítica pela carboxipeptidase E (CPE), uma enzima que atua em resíduos de glicina. Após isso, é formado o α -MSH₁₋₁₄, que sofre adição de grupamento amina pela enzima α peptidil amino mono oxigenase (PAM) gerando o desacetil α -MSH₁₋₁₃. Por fim, a enzima N-acetil transferase adiciona um grupamento acetil que torna o α -MSH ativo (DIANO, S., 2011).

O complexo processamento do neuropeptídeo POMC é prejudicado pelos ácidos graxos saturados, principalmente o palmitato de sódio. Algumas hipóteses para explicar o processamento anômalo de POMC foram estudadas por Razolli e colaboradores em 2019. Nesse estudo, foi mostrado que a administração sistêmica de ácido palmítico (ácido graxo saturado) aumentou a expressão proteica de POMC e PC1/3 no hipotálamo de camundongos propensos à obesidade. De modo semelhante, o tratamento com ácido palmítico em culturas de neurônios hipotalâmicos humanas aumentou a expressão gênica de POMC, PC1/3, PC2, CPE e PRCP e reduziu a expressão gênica do subproduto desacetil α -MSH.

O aumento na expressão gênica de PRCP e redução do desacetil α -MSH em culturas neuronais hipotalâmicas humanas mostrou que o tratamento com o ácido palmítico alterou o processamento de POMC e a formação de subprodutos. Assim, o ácido palmítico foi capaz de atuar diretamente no processamento de POMC modulando enzimas responsáveis pela clivagem do pró hormônio em seus principais subprodutos, ACTH e α -MSH. (RAZOLLI et al., 2019).

O aumento no consumo de ácidos graxos saturados leva primeiro a uma regulação anômala de POMC, seguida pela inflamação hipotalâmica que, por sua vez, prejudica a sinalização dos hormônios leptina e insulina, ativa células da glia e promove o desequilíbrio energético e ganho de peso corporal (DE SOUZA, etl al., 2005; THALER et al., 2012; RAZOLLI et al., 2019). Diante disso, as estratégias terapêuticas baseadas em abordagens farmacológicas têm como alvo o sistema melanocrotina hipotalâmico como principal agente efetor do controle da homeostase energética e do peso corporal.

Nessa perspectiva, os Receptores Acoplados à Proteína G (GPCRs) emergem como possíveis alvos terapêuticos, uma vez que o sistema melanocortina hipotalâmico integra processos neuroendócrinos de regulação autócrina e parácrina (neurônios que expressam NPY) que atuam, via diferentes GPCRs, para controlar a homeostase energética. Alguns hormônios provenientes do trato gastrointestinal, como grelina, CCK e GLP-1 atuam via receptores acoplados à proteína G presentes em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo. Como exemplo, o neuropeptídeo Y possui 5 diferentes tipos de receptores (Y1-Y5R) sendo os receptores Y1, Y2, Y4 e Y5, os mais expressos em neurônios de primeira e segunda ordens no sistema melanocortina (TSE e WONG, 2019).

Receptores Acoplados à Proteína G

Existem aproximadamente 800 tipos de receptores acoplados à Proteína G (GPCRs) identificados no genoma humano, dos quais, estão classificados, segundo o último consenso do guia de farmacologia em famílias que compartilham sequências de aminoácidos primários semelhantes. Essas famílias são agrupadas em cinco classes de GPCRs encontrados em vertebrados, entretanto, existem outras duas classes (D e E) que não são encontradas em animais vertebrados. A tabela 1 mostra a organização quanto às classes de GPCRs e o número de receptores classificados em cada classe (FREDRIKSSON et al., 2003; ALEXANDER et al., 2019).

FAMÍLIA	Classe A (rodopsina)	Classe B (secretina)	Classe C (glutamato)	Adesão	Frizzled
Nº de GPCRS	719	15	22	33	11

Tabela 1: Famílias de GPCRs encontradas no genoma humano, segundo o *The concise guide to pharmacology 2021/22: G protein-coupled receptors* (doi: 10.1111/bph.15538).

A maior família de GPCRs existentes é a Classe A (rodopsina) que se subdivide nos subgrupos α , representado por receptores de prostaglandina, amina (receptores de serotonina, dopamina, histamina, muscarínicos, adrenérgicos e orfãos), opsina, melatonina e MECA (melanocortina, endoteliais, canabinoides e adenosina); subgrupo β (como por exemplo o neuropeptídeo FF, colecistoquinina, e grelina); subgrupo γ (composto por MCH, opióides e quimiocina) e por fim o subgrupo δ (exemplificado por glicoproteína e purinas (FREDRIKSSON et al., 2003).

Os GPCRs, também são conhecidos como receptores sete α hélice transmembrana (7TM). Recebem essa outra denominação pois seus sinais intracelulares ativam outras proteínas além das proteínas G e suas subunidades. No sistema nervoso central, esses receptores são muito expressos e estão distribuídos em diversas áreas relacionadas a cognição, memória e resposta hedônica, onde participam do controle fisiológico e são afetados em condições patológicas de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington e doenças neuropsiquiátricas como ansiedade e depressão. Desse modo, esses receptores oferecem grande potencial para serem potentes alvos farmacológicos de doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (ALAVI e tl., 2018; AZAM et al., 2020).

Os GPCRs podem ser ativados por diversos tipos de moléculas como, pequenas moléculas orgânicas, peptídeos, proteínas, aminoácidos, hormônios, íons, fótons entre outras moléculas. São estruturas proteicas transmembrana que em seu estado basal possuem uma estrutura espacial inativa. Porém, a partir da interação com seu ligante ou pela interação de moléculas específicas, ocorre uma mudança na disposição conformacional da estrutura do receptor que o torna ativo, sendo capaz de recrutar proteínas intracelulares (proteínas G, quinases de proteínas ou beta arrestina) responsáveis pela ativação de uma via de sinalização celular (KOBILKA, B. K, 2007).

A organização estrutural em 7 domínios transmembrana α hélice hidrofóbicos formam 3 loops extracelulares (ECL1-3) e 3 loops intracelulares (ICL1-3). Os ECLs1-3, presentes na porção N-terminal (extracelular), são capazes de oferecer regiões para interação com diferentes tipos de ligantes, como, por exemplo, agonista, antagonista e agonistas inversos, pois oferecem uma região ortostérica de ligação. Na porção intracelular, os ICLs1-3 na porção C-terminal, podem se ligar a proteína G heterotrimérica intracelular ou proteínas independentes da proteína G, como as quinases de proteína G (GRK), que atuam fosforilando substratos do receptor e, as arrestinas, que podem ser fosforiladas pelas GRK ou mesmo se associar aos loops intracelulares dos GPCRs (KOBILKA, B. K, 2007; GACASAN et al., 2018).

A partir da interação entre um ligante e sua região específico para ligação (região ortostérica), localizado na estrutura molecular do receptor 7TM, ocorre uma mudança na estrutura tridimensional do receptor que promove ativação da proteína G intracelular heterotrimérica, que está inativada na forma de $GDP\alpha\beta\gamma$. Porém, a interação do ligante com o receptor promove a dissociação do GDP, que rapidamente se liga ao

GTP induzindo uma mudança conformacional que culmina na dissociação da proteína G em suas subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$, que possuem diferentes ações e vias de sinalização celular (HILGER et al., 2018).

A subunidade $G\alpha$ possui quatro famílias com diferentes ações: i) G_s , responsável por estimular adenilil ciclase e conseqüente promover o aumento nos níveis de cAMP, ativação de proteína quinase A (PKA) e indução de sinalização celular; ii) G_i/o , que inibe adenilil ciclase e diminui os níveis de cAMP; iii) $G_{q/11}$, ativa fosfolipase β ($PLC\beta$), que ativa segundos mensageiros como o inositol fosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) que culminam em ativação de sinalização celular; iii) $G_{12/13}$, ativa o fator de troca de nucleotídeos de guanina (RhoGEF), que também promove sinalização celular. Entretanto, os GPCRs podem estimular mais de uma subfamília de proteína $G\alpha$ (GACASAN et al., 2018).

Além da ativação da subunidade $G\alpha$ e suas famílias, pode ocorrer ainda a ativação da subunidade $G\beta\gamma$ e arrestinas. Quando ativada, a subunidade $G\beta\gamma$ recruta as GRKs que atuam fosforilando a porção C terminal do receptor 7TM e conseqüente regulação da proteína G, canais de potássio de retificação interna, canais de cálcio voltagem dependente e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Além disso, a $G\beta\gamma$ pode recrutar arrestina, uma proteína adaptadora que pode sofrer mudança conformacional pela ação da $G\beta\gamma$ ou pela ativação de um receptor 7TM que ativa arrestina (GPCR-arrestina), que por sua vez, promove a internalização do receptor e o leva à via de degradação lisossomal ou à reciclagem por meio do retorno do receptor à membrana celular (GACASAN et al., 2018; HILGER et al., 2018).

Um exemplo de GPCR que possui pelo menos 2 tipos de sinalização intracelular diferentes são os receptores de melanocortina do tipo 3 e 4 (MC3 e MC4R), pertencentes à classe A rodopsina, presente no núcleo paraventricular do hipotálamo. Esses receptores recrutam a subunidade $G\alpha$ (s, q e 11) quando ativado pelo seu agonista α -MSH, contudo, o neuropeptídeo AgRP atua como antagonista do MC4R, promovendo mudança conformacional que leva ao recrutamento da proteína β Arrestina 2 e internalização do receptor, ao invés de recrutar uma proteína G (Anderson et al., 2016). Portanto, o mesmo receptor acopla diferentes tipos de proteínas intracelulares a partir da interação com seu agonista ou antagonista.

A família de GPCRs da classe A compreende uma das famílias mais estudadas, tanto pelo grande número de receptores (719), quanto pela grande diversidade de receptores, capazes de reconhecer diferentes tipos de ligantes, como peptídeos, proteínas, lipídios e aminas. Entretanto, existe uma subfamília de receptores da classe A, os receptores órfãos, que recebem esse nome pois, não existe, ou ainda não foi identificado um ligante endógeno para esse receptor (CHUNG et al., 2008).

Essa subclasse de receptores, oferece grande potencial exploratório principalmente para o sistema nervoso central, uma vez que, muitos desses receptores órfãos estão presentes em diversas áreas, como hipófise, hipocampo, núcleo striatum, hipotálamo e mesencéfalo. Devido a sua localização, alguns estudos têm mostrado que esses receptores estão envolvidos nas principais doenças neurológicas, como ansiedade, depressão, Alzheimer, Parkinson e epilepsia (ALAVI et al., 2018). Entretanto, alguns desses receptores, localizados no hipotálamo, podem participar ativamente do comportamento alimentar e homeostase energética.

GPCRs Como Alvos Terapêuticos

Além de atuarem no reconhecimento de hormônios, peptídeos e moléculas extra e intracelulares, alguns receptores 7TM podem ainda reconhecer subprodutos do metabolismo celular, e assim, ativar processos fisiológicos. O papel dos GPCRs no reconhecimento de metabólitos, e as vias de sinalização que são ativadas, tem sido investigado em diferentes tecidos metabolicamente ativos, como o tecido adiposo (HUSTED et a., 2017). Nessa perspectiva, Johansen e colaboradores (2021) mostraram que a super expressão do GPR3, no tecido adiposo marrom, promoveu termogênese (aumento significativo de *Ucp1*), gasto energético e reduziu a quantidade de tecido adiposo branco epididimal e inguinal em camundongos. Nesse estudo, foi pontuado que o mecanismo de termogênese mediado pelo GPR3 independe do tônus simpático e adrenérgico.

Além do tecido adiposo, o hipotálamo também atua reconhecendo subprodutos do metabolismo, por meio de GPCRs. Os receptores de ácidos graxos de cadeia curta GPR41 (Free Fatty Acids 3-FFA3) e o GPR43 (Free Fatty Acids 2-FFA2), podem ser ativados por diferentes tipos de ligantes (acetato, propionato e butirato) no mesmo tecido ou podem estar expressos em tecidos diferentes. Essa característica faz dos

GPCRs potentes candidatos a alvos terapêuticos em diferentes tipos de distúrbios do metabolismo (HUSTED et al., 2017).

Um estudo conduzido por Dragano e colaboradores (2017), mostrou que os GPR40 e GPR120, localizados no núcleo arqueado do hipotálamo, estão distribuídos em diferentes populações de neurônios e células da glia. Essa expressão restrita a tipos celulares específicos, faz com que esses receptores tenham funções distintas, uma vez que a ativação seletiva do GPR120, por meio de seu agonista específico, TUG1197, atenuou os sinais pró inflamatórios (redução de TNF alfa e IL1 beta), ao passo que, o agonismo do GPR40 promoveu redução no peso corporal e aumento da transcrição gênica de *POMC*.

Nessa perspectiva, em 2020, Zhang e colaboradores caracterizaram o GPR 136 (opsina-OPN5), um receptor da subfamília das opsinas, que é ativado por luz violeta e está presente em neurônios sensíveis ao calor e ao frio, localizados na área pré optica (POA) do hipotálamo. Por meio da injeção de traçadores neuronais, foi mostrado que os neurônios excitatórios que expressam *Opn5* no POA se conectam com neurônios localizados em áreas relacionadas com o controle da termorregulação e termogênese. A inibição quimiogênica, por meio de DREADDs, resulta em aumento significativo da temperatura do tecido adiposo e termogênese, sugerindo um efeito termogênico a partir da inibição desse circuito. Desse modo, os GPCRs presentes no hipotálamo emergem como possíveis alvos terapêuticos, uma vez que, a partir de ensaios de inibição ou ativação via agonistas seletivos, promovem mudanças fenotípicas.

Assim, as abordagens farmacológicas desenvolvidas recentemente para tratamento da obesidade e diabetes tipo 2 têm por base reduzir o apetite e aumentar o gasto energético. Para tanto, são utilizados fármacos que atuam no sistema nervoso central, regulando o comportamento alimentar e a homeostase energética, ou que atuam em tecidos periféricos, como o trato gastrointestinal, que por sua vez se comunica com sistema melanocortina hipotalâmico, afetando o equilíbrio energético, a ingestão alimentar e assim provendo benefícios no controle e redução do peso corporal dos indivíduos (COOKE e BLOOM, 2006).

Existem cinco principais medicamentos de ação central aprovados pelo FDA (fentermina, combinação de fentermina/topiramato de liberação prolongada, lorcaserina, combinação de naltrexona/bupropiona de liberação sustentada e liraglutida) e usados

para tratamento da obesidade. Todos esses fármacos disponíveis atuam direta ou indiretamente em GPCRs presentes no sistema melanocortina hipotalâmico controlando o apetite e redução do peso corporal. Entretanto, devido aos efeitos colaterais, principalmente no sistema cardiovascular (aumento na frequência cardíaca e pressão sanguínea), alguns desses fármacos, como o topiramato, devem ser prescritos para uso a curto prazo e administrados em combinação com outros fármacos, de modo a reduzir efeitos colaterais e potencializar a redução de peso corporal (SRIVASTANA e APOVIAN, 2018).

Os mecanismos pelos quais esses fármacos atuam envolvem a modulação direta de GPCRs no sistema melanocortina hipotalâmico ou pela modulação de neurônios que são responsáveis por produzir neuropeptídeos que regulam o comportamento alimentar e o peso corporal. O topiramato, por exemplo, atua em receptores de NPY 1 e 5, e os efeitos indiretos culminam no aumento da inibição do neurotransmissor GABA, um potente indutor da ingestão alimentar. Outros fármacos, como a bupropiona e a naltrexona, que atuam em conjunto, promovendo aumento nos níveis de *POMC*, redução do apetite e potenciação dos efeitos do alfa MSH (COULTER et al., 2019).

Além disso, os tratamentos convencionais da obesidade têm sido direcionados para uma das principais classes de fármacos, os agonistas dos receptores de GLP-1. Produzido pelo trato gastrointestinal em resposta a ingestão de alimentos, esse hormônio incretínico (GLP1) tem a capacidade de estimular a produção de insulina de modo dependente de glicose em situações hiperglicemiantes. Assim, os agonistas de GLP-1R, semaglutida e a liraglutida, oferecem grande capacidade e segurança, no manejo da redução do peso corporal dos indivíduos (NAUCK et al., 2021).

Uma classe importante de moléculas capazes que potencializar a ação dos agonistas, são os moduladores alostéricos. Essas moléculas se ligam em regiões diferentes das regiões ortostéricas (locais específicos dos GPCRs onde os agonistas se ligam). A partir dessa ligação é possível que ocorra mudança conformacional e potencialização da ativação das mesmas vias de sinalização intracelular ativadas pelo agonista. Logo, quando uma molécula é capaz de se ligar em uma região alostérica (região diferente da ortostérica) e aumentar a afinidade ou a eficácia de um ligante ortostérico, é chamado de modulador alostérico positivo (PAM), enquanto o modulador alostérico negativo (NAM) diminui a afinidade ou a eficácia do ligante ortostérico (GRUNDMANN et al., 2021).

Apesar dos avanços recentes, ainda não existem tratamentos farmacológicos absolutamente efetivos para o tratamento da obesidade. Os alvos terapêuticos baseados em GPCRs, bem como seus agonistas e moduladores alostéricos, emergem como candidatos com grande potencial terapêutico para controle da homeostase energética, peso corporal e regulação adequada do comportamento alimentar. Desse modo, nosso estudo visou caracterizar dois novos GPCRs presentes no sistema melanocortina hipotalâmico, responsivos ao consumo de dieta hiperlipídica e os efeitos mediados pelo tratamento central com moduladores alostéricos no comportamento alimentar. Assim, nosso estudo mostrou a importância de novos participantes no sistema melanocortina capazes de influenciar o comportamento alimentar e controle do peso corporal.

JUSTIFICATIVA

Os dados epidemiológicos mostram que a prevalência de obesidade e sobrepeso vem crescendo de forma rápida em todo o mundo. Um dos principais fatores responsáveis pelo ganho de peso corporal está relacionado ao consumo excessivo de alimentos ricos em ácidos graxos saturados, que afetam a homeostase do sistema melanocortina hipotalâmico, promovendo o desequilíbrio energético que culmina com ganho de peso e obesidade.

O funcionamento do sistema melanocortina hipotalâmico é mantido por receptores acoplados à proteína G presentes em neurônios de primeira ordem e neurônios de segunda ordem (localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo) que atuam coordenando e mantendo a homeostase energética, o peso corporal e o comportamento alimentar.

Os principais fármacos disponíveis e mais utilizados para manejo da obesidade e diabetes Melitus tipo 2, são baseados em mecanismos celulares que utilizam GPCRs localizados tanto no hipotálamo como em outras áreas do sistema nervoso central relacionadas com o controle da ingestão alimentar. Além dos receptores, moléculas específicas que ativam de modo ortostérico, como agonistas e antagonistas, e moduladores alostéricos têm emergido como opções farmacológicas de ativação dos GPCRs reduzindo efeitos colaterais e potencializando os efeitos benéficos.

Contudo, a terapia farmacológica atual para tratamento e manejo da obesidade ainda é incapaz de conter os avanços e a prevalência mundial da doença. Os fármacos disponíveis que utilizam GPCRs, como alvos terapêuticos não são específicos, uma vez que os receptores alvos estão distribuídos em populações neuronais distintas e não restritos a tipos celulares específicos. Além disso, existem outros tipos de GPCRs presentes no sistema melanocortina que são órfãos de ligantes e, que podem contribuir com a manutenção da homeostase energética e o comportamento alimentar. Desse modo, é necessário explorar novos GPCRs, sendo que os receptores órfãos são potentes alvos para a terapêutica.

OBJETIVOS

GERAL

Caracterizar GPCRs órfãos hipotalâmicos que são modulados por intervenções dietéticas (jejum e dieta hiperlipídica) e que podem participar da regulação do comportamento alimentar e homeostase energética.

ESPECÍFICOS

- Avaliar a modulação do GPR68, GPR139 e GPR162 hipotalâmicos frente ao consumo de dieta hiperlipídica e privação de nutrientes;
- Caracterizar a presença e distribuição celular do GPR68 e GPR139 no núcleo arqueado do hipotálamo de camundongos;
- Avaliar o efeito da modulação alostérica do GPR68 diretamente no núcleo arqueado do hipotálamo, no controle da ingestão alimentar de camundongos.
- Avaliar o efeito da repressão gênica do GPR139 (por meio de partícula lentiviral) no núcleo arqueado do hipotálamo de camundongos no controle da homeostase energética e peso corporal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Experimentos Utilizando Bases de Dados

Os experimentos de bioinformática foram conduzidos utilizando bases de dados públicas e gratuitas disponíveis. Para tanto, foram utilizadas as seguintes bases de dados: <https://gpcrdb.org/> e <https://www.genecards.org/>. A partir das bases de dados de GPCRs, foram formuladas comparações de sequências por similaridade estrutural de receptores e organizadas em um gráfico de árvores filogenética, que mostraram, além da similaridade estrutural, quais as subunidades de proteína G era recrutada no mecanismo de ação já descrito. Para a nomenclatura dos receptores, foi utilizado o International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR). Para os gráficos em forma de Heat Map, utilizamos os valores de sequenciamento gênico (RNAseq) obtidos a partir da base de dados www.genecards.org/. Foi analisado cada valor de expressão gênica dos 81 GPCRs órfãos da classe A presentes no hipotálamo e esses valores foram organizados em forma de heatmap (figura 1C).

Experimentos in vivo utilizando Camundongos (C57BL/6J)

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6J Unib com cinco semanas de idade. Os camundongos foram obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Unicamp (CEMIB/UNICAMP). Todos os experimentos utilizando camundongos foram iniciados após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com os seguintes números de protocolos: 4927-1/2018 e 5717-1/2021. Os camundongos foram então alocados em nosso biotério em caixas individuais sob condições controladas e padronizadas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de 22 ± 2 °C, com água e alimentação *ad libitum*.

Para os experimentos utilizando shRNA, foi aprovado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) o seguinte protocolo: 7526/2021 Processo SEI no. 01245.003524/2021-85, de acordo com todas as normas vigentes. Os animais geneticamente modificados utilizados foram: AgRP-IRES-Cre camundongo (AgRP^{tm1(cre)}Lowl/J, Jackson Laboratories) foi cruzado com o camundongo Cre-inducível tdTomato (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J, Jackson Laboratories); POMC-Cre, foi utilizado um adenovírus associado Cre-dependente e

cruzado com camundongo com o gene GFP-reportado com Cre-inducible GFP-reporter (The Jackson Laboratory) com o CEUA: #4985-1.

RT-PCR

A extração de RNA total foi realizada segundo método do reagente Trizol (Invitrogen Corporation, CA, USA). Para a produção do cDNA, foi usado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sendo a concentração final do cDNA de 3,0 µg. Este cDNA foi diluído segundo a concentração necessária para a amplificação eficiente de cada gene. A quantificação dos genes de interesse foi feita por PCR real time (7500 detection system, Applied Biosystems) utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems). Neste sistema é utilizado um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. O gene *GAPDH* Mouse (TaqMan™ – Applied Biosystems), foi utilizado como controle endógeno da reação, o qual normaliza a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. Os *primers* utilizados estão na tabela 1 e foram adquiridos da Integrated DNA Technologies (IDT). Para cada PCR foi usado 40 ng de RNA de transcrito reverso de acordo com as recomendações do TaqMan PCR mastermix (Applied Biosystems). A análise dos dados do PCR em tempo real foi determinada utilizando o Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

GENE	CÓDIGO
<i>AgRP</i>	Mm00475829
<i>Cart</i>	Mm00489086_m1
<i>Gapdh</i>	Mm. PT. 39a. 1
<i>Gpr68</i>	Mm. PT. 58.42531755
<i>Gpr139</i>	Mm. PT. 58.16381055
<i>Gpr162</i>	Mm. PT. 58.11811239
<i>Npy</i>	Mm00445771_m1
<i>POMC</i>	Mm 00435874

Tabela 1: Primers utilizados. Integrated DNA Technologies (IDT).

Imunofluorescência

Os animais foram anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina (Kensol-Koning, 10 mg/Kg), cloridrato de quetamina (Vetaset-Fort Dodge, 50 mg/Kg) e diazepam (5 mg/Kg). Após perda dos reflexos podálico e palpebral, foi conduzida a perfusão transcardíaca com solução fixadora de paraformaldeído 4% em PB 0,1M. Após isso, foi extraído o tecido de interesse, no caso hipotálamo, e então congelado em solução Tissue Tek a -30°C (O.C.T Compound, FR/118ml, Sakura-4583). Após congelamento, as amostras foram cortadas em criostato obtendo cortes ultrafinos (20µm de espessura) e os cortes capturados em lâminas histológicas para processamento de imunofluorescência. Então, as lâminas foram climatizadas em temperatura ambiente, depois o tecido foi imerso em PB 0,01M para retirada do meio de inclusão. Em seguida, foram incubadas, em câmara úmida, com 150 µl de solução de albumina bovina 3% em PB 0,01M, pH 7,4 por 1 hora e 30 minutos. Após este período, os anticorpos primários anti-GPR139 (Sigma SAB-4500335), anti-GPR68 (Invitrogen-720277), anti-GFAP (Santa Cruz 166481), anti-Iba1 (Abcam 5076) e anti-Vimentina (Santa Cruz 373717) foram aplicados e incubados durante o período de 12 horas em temperatura de 4°C (geladeira). Após incubação com anticorpo primário, as amostras foram lavadas em PB 0,01M (3x de 5 minutos) e incubadas com anticorpo secundário fluorescente, ao abrigo da luz, (FITC ou AlexaFluor) por 2 hora em temperatura ambiente. Em sequência, os espécimes foram lavados em PB 0,01M, pH 7,4 e montados com lamínula em glicerol/DAPI ou com outro marcador de núcleo celular TO-PRO3 (), para posterior fotodocumentação em microscópio confocal Leica TCS SP5 II.

Ingestão Alimentar e Ganho de Peso Corporal

A composição das dietas utilizadas para alimentação dos camundongos é mostrada na tabela abaixo:

INGREDIENTES	CONTROLE (American Institution of Nutrition) 1Kg	HIPERLIPÍDICA- 1Kg
Amido	467,5g	115,5g
Caseína	200,0g	200,0g
Amido de milho dextrinizado	132,0g	132,0g
Sacarose	100,0g	100,0g

Óleo de soja	40,0g	40,0g
Banha de porco	-	312,0g
Celulose (microfibras)	50,0g	50,0g
Mistura de Minerais	35,0g	35,0g
Mistura de Vitaminas	10,0g	10,0g
L-cistina	1,8g	1,8g
Bitartarato de Colina	2,5g	2,5g
TOTAL	1000,0g	1000,0g

Tabela 3: Composição da dieta padrão para roedores e dieta hiperlipídica.

Os animais foram alimentados com dietas padrão para roedores de laboratório (Chow) ou dieta hiperlipídica (HFD 60%). O consumo alimentar e peso corporal dos camundongos foi avaliado semanalmente, sendo calculado o ganho total de peso no período e o consumo total de ração.

Moduladores Alostéricos

Para o tratamento com os moduladores alostéricos positivos (PAM) e negativos (NAM), optamos por utilizar o modulador alostérico específico do GPR68, ogerina. Para tanto, foram obtidos de modo comercial pela empresa Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Ogerina, CAS-No 1309198-71-7 (número do produto: SML1482) e seu controle negativo CAS-No 1125453-08-8 (número do produto: SML1483). Ambos moduladores alostéricos foram diluídos em solução salina 0.9% em DMSO 1% por concentração final de 10 μ M. Como controle, foi utilizada a solução veículo composta apenas por solução salina 0.9% + DMSO 1%.

Ensaio de repressão gênica e Estereotaxia

Nos experimentos de repressão gênica utilizamos partículas lentivirais com short hair pin (shRNA-GPR139), capaz de reprimir e reduzir a expressão gênica do *Gpr139*. Para tanto, foi utilizado a seguinte partícula lentiviral comercial obtida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) sob código de referência NM_001024138 e TRCN 0000177463 e partícula controle Scramble (MISSION pLKO.1-puro Non-Target shRNA control, SHC016V-1EA) com o código de referência 07181827MN.

Após os camundongos terem sido anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina (Kensol-Koning, 10 mg/Kg), cloridrato de quetamina (Vetaset-Fort Dodge, 50 mg/Kg) e diazepam (5 mg/Kg), foram checados os reflexos podálico e palpebral e garantido que os camundongos estavam anestesiados, os camundongos foram então posicionados no equipamento estereotáxico (Stoelting CO. Illinois 60191, USA) e então foi conduzida a microinjeção bilateral (lado esquerdo e lado direito) no núcleo arqueado do hipotálamo de acordo com as seguintes coordenadas estereotáxicas: AP (antero-posterior -1.7mm), LL (latero lateral \pm 0.3 mm) e DP (profundidade ou crânio-caudal -5.6 mm), de acordo com os estudos prévios de Moura-Assis e colaboradores, 2021.

Para os experimentos utilizando moduladores alostéricos (descritos anteriormente), foram utilizadas as seguintes coordenadas estereotáxicas para acessar o ventrículo lateral (microinjeção intracerebroventricular-ICV). A partir do Bregma temos: AP (antero-posterior -0.34 mm), LL (latero lateral +1.0 mm) e DP (profundidade ou crânio-caudal -2.2 mm), de acordo com o trabalho de Nogueira e colaboradores, 2020.

Avaliação do peso corporal e ingestão alimentar

Os experimentos que avaliaram o consumo alimentar dos camundongos e o peso corporal foram realizados durante o ciclo claro, entre 8:00 e 10:00 da manhã e sempre no mesmo dia da semana.

Para os experimentos de ingestão alimentar no grupo experimental tratado com os moduladores alostéricos, foi feito a partir da 12:00 até o final do ciclo claro (18:00 da tarde), o que compreendeu um total de 6 horas de avaliação realizada nos tempos de 0:00 horas após o estímulo com os moduladores alostéricos (sendo 12:00 o horário do ciclo circadiano), 2:00 horas após o estímulo (representa 14:00 no horário do ciclo circadiano), 6:00 horas após o estímulo (representa 18:00 no horário do ciclo circadiano) e por fim 18:00 horas após o estímulo (representa 6:00 no horário do ciclo circadiano).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média e erro padrão. Para comparar apenas dois grupos, foi utilizado o teste *t de Student* para dados não pareados, e quando

necessário, análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós teste de de *Tukey* para comparação múltipla de médias. Foi definido o nível de significância $P < 0,05$.

RESULTADOS PRELIMINARES

Identificação GPRCs Órfãos da Classe A Presentes no Hipotálamo Através de Bases de Dados.

Por meio de bases de dados de GPCRs (<https://gpcrdb.org/>), conduzimos experimentos virtuais em que foi possível agrupar os 81 receptores órfãos da classe A. Assim, decidimos investigar se alguns desses receptores órfãos poderiam estar presentes no sistema melanocortina hipotalâmico. Desse modo, foi feito um alinhamento de todos os receptores órfãos da classe A, baseado em critérios de similaridade estrutural entre os receptores órfãos e construído o gráfico mostrado na figura 1A. Nesse gráfico estão representados todos os 81 GPCRs órfãos com nomenclatura segundo a IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) e suas subunidades de proteína G. Assim, é possível notar que 29 GPCRs acoplam pelo menos um tipo de subunidade da proteína G e os 52 outros receptores não acoplam proteína G.

A figura 1B, mostra que dos 100% (em valores absolutos, 81) dos GPCRs órfãos, existem 96,29% (78) que estão expressos no hipotálamo, considerando os valores de expressão gênica obtidos a partir da análise da base de dados <https://www.genecards.org/>. Por meio dessa plataforma foi construído o *heatmap* (figura 1C) que mostra a quantificação em valores de fragmentos por mil de nucleotídeos por milhão de leituras mapeadas (FPKM). Dos 81 receptores, foram escolhidos 3 (setas na figura 1C), de acordo com seus valores de expressão gênica e sua presença e modulação em neurônios POMC e AGRP, segundo o estudo de Henry e colaboradores (2015). Assim, foram escolhidos o GPR162 (maior valor de expressão gênica), GPR68 e GPR139 para análise de expressão gênica em camundongos C57.

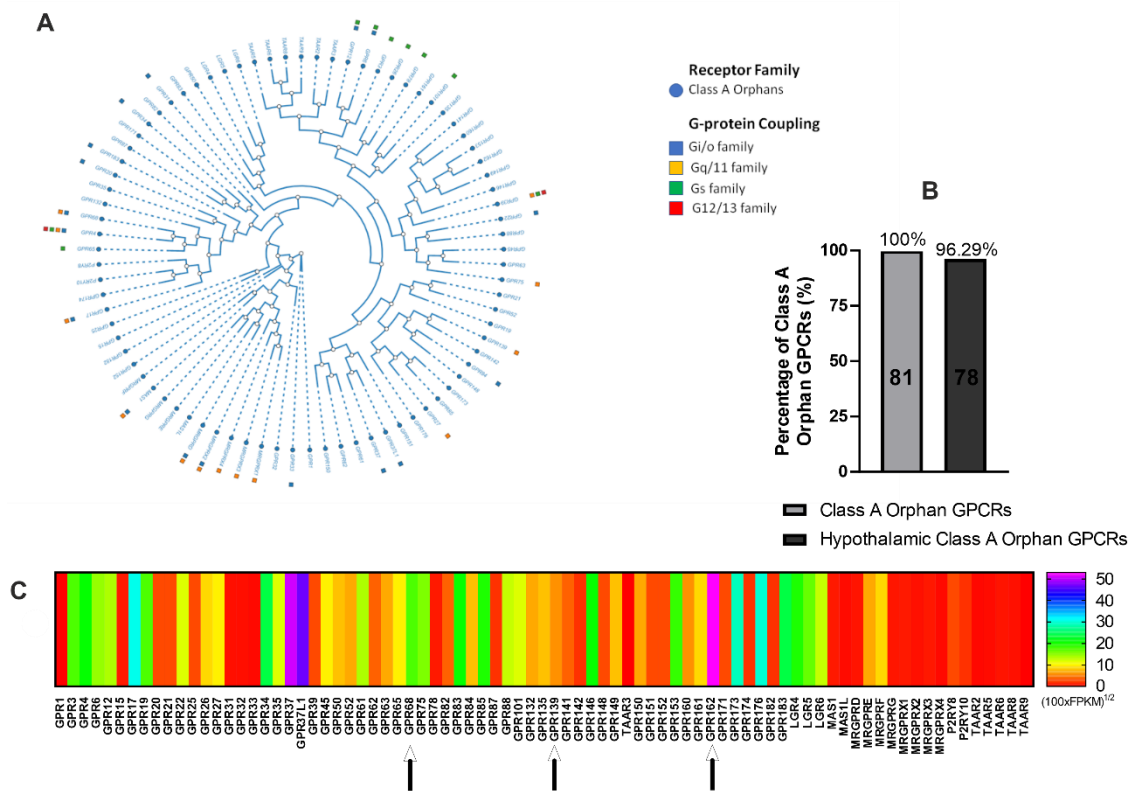


Figura 1: Explorando GPCRs órfãos no hipotálamo. A. Representação filogenética gráfica de GPCRs órfãos de classe A. B. Porcentagem de GPCRs de classe A órfãos expressos no hipotálamo de camundongo. C. *Heatmap* ilustrando o nível de expressão gênica de todos os GPCR órfãos da classe A no hipotálamo.

Expressão Gênica e Modulação dos GPRs 68, 139 e 162 no Hipotálamo de Camundongos C57 Alimentados com Dieta Hiperlipídica e Sob Privação de Nutrientes

As setas na figura 1C indicam os três GPCRs que foram analisados quanto à sua presença e modulação no hipotálamo de camundongos alimentados com HFD durante curtos períodos (de 1 até 28 dias de consumo) e submetidos a privação de nutrientes (0-24 horas). Em seguida, a figura 2A mostra que ambos os GPRs 68 e 139 foram modulados pelo consumo de HFD, sendo o GPR68 com aumento significativo de sua expressão gênica nos períodos de 7, 14 e 28 dias de consumo de dieta hiperlipídica, quando comparados com camundongos controle, alimentados com dieta padrão para roedores (figura 2A). O GPR139 teve aumento significativo apenas após 28 dias de consumo de dieta hiperlipídica (figura 2A).

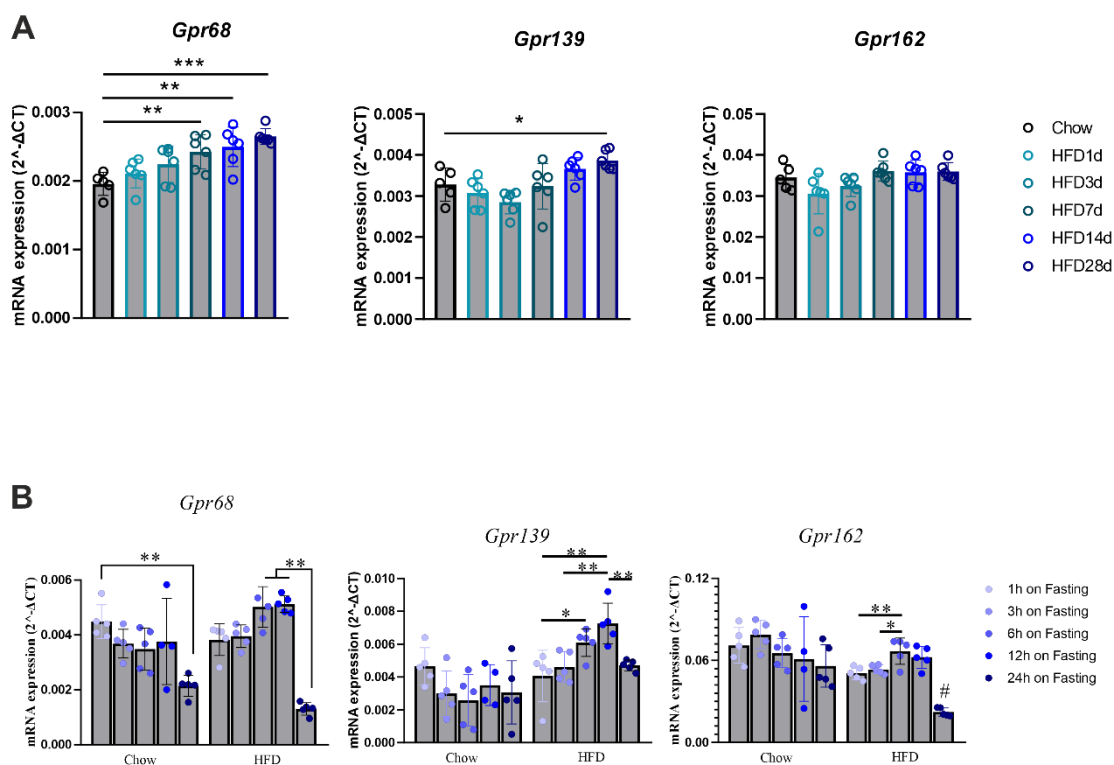


Figura 2: Modulação gênica dos GPRs 68, 139 e 162 hipotalâmicos em camundongos C57 alimentados com dieta hiperlipídica ou em privação de nutrientes. **A-**Expressão gênica hipotalâmica dos *Gpr68*, *Gpr139* e *Gpr162* em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura (HFD) por 0-28 dias. **B.** Expressão do transcrito hipotalâmico de *Gpr68*, *Gpr139* e *Gpr162* em camundongos alimentados com ração ou HFD e então submetidos a jejum de 0-24 h. Em A, n=5-6; Em B, n=4-5. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Desse modo, é possível notar que o GPR68 é regulado durante curtos períodos de alimentação com dieta hiperlipídica e o GPR139 apenas em períodos mais tardios (28 dias de consumo de dieta hiperlipídica).

Na figura 2B, é possível notar que o *gpr68* teve sua expressão gênica reduzida apenas após 24 horas de jejum no grupo de camundongos que foi alimentado com dieta padrão para roedores (*Chow*). Em contrapartida, o grupo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) mostrou um aumento nos períodos de 6 e 12 horas de jejum, seguido por uma redução significativa com 24 horas de jejum. Diferentemente do *gpr68*, os outros GPRs (*gpr139* e *gpr162*) não apresentaram modulação da expressão gênica no grupo alimentado com *chow*, porém, houve diferença significativa para os grupos alimentados com HFD, marcado por um aumento com 6 (*gpr139*) e 12 horas (*gpr139* e *gpr162*), e seguido por uma redução no período de 24 horas (figura 2B).

GPR 68 Está Presente em Células da Glia e Neurônios POMC e AgRP

Nossos resultados mostraram que o *gpr68* foi modulado tanto pelo consumo de HFD durante curtos períodos quanto pela privação de nutrientes em camundongos alimentados com *Chow* e HFD. Desse modo, decidimos caracterizar a localização desse receptor no núcleo arqueado do hipotálamo. Para tal, foi realizado um experimento de imunofluorescência com dupla marcação para colocalizar a presença desse receptor com células da glia e neurônios. A figura 3A mostra uma imunofluorescência para o Gpr68 e a proteína acidífera fibrilar da glia (GFAP). Em B é possível observar a colocalização do Gpr68 com a micróglia (Iba-1) e tanócitos (vimentina), na figura 3C. Desse modo, o Gpr68 está presente no núcleo arqueado do hipotálamo e está presente nos três tipos de células da glia analisados.

Para os ensaios de imunofluorescência com neurônios POMC e AgRP, foram utilizados camundongos transgênicos com gene reportado *gfp* para neurônios POMC (em verde), e o gene reportado em *tdTOMATO* para neurônios que expressam o neuropeptídeo *AgRP* (em vermelho). A figura 3D mostra a colocalização do Gpr68 com neurônios POMC presentes no parênquima do núcleo arqueado do hipotálamo. Note que existem neurônios POMC que não expressam o Gpr68. Na figura 3E, observa-se colocalização do Gpr68 com neurônios AgRP, porém, muitos neurônios não expressam esse receptor. Assim, o Gpr68 está distribuído tanto em neurônios POMC e AgRP quanto em células da glia.

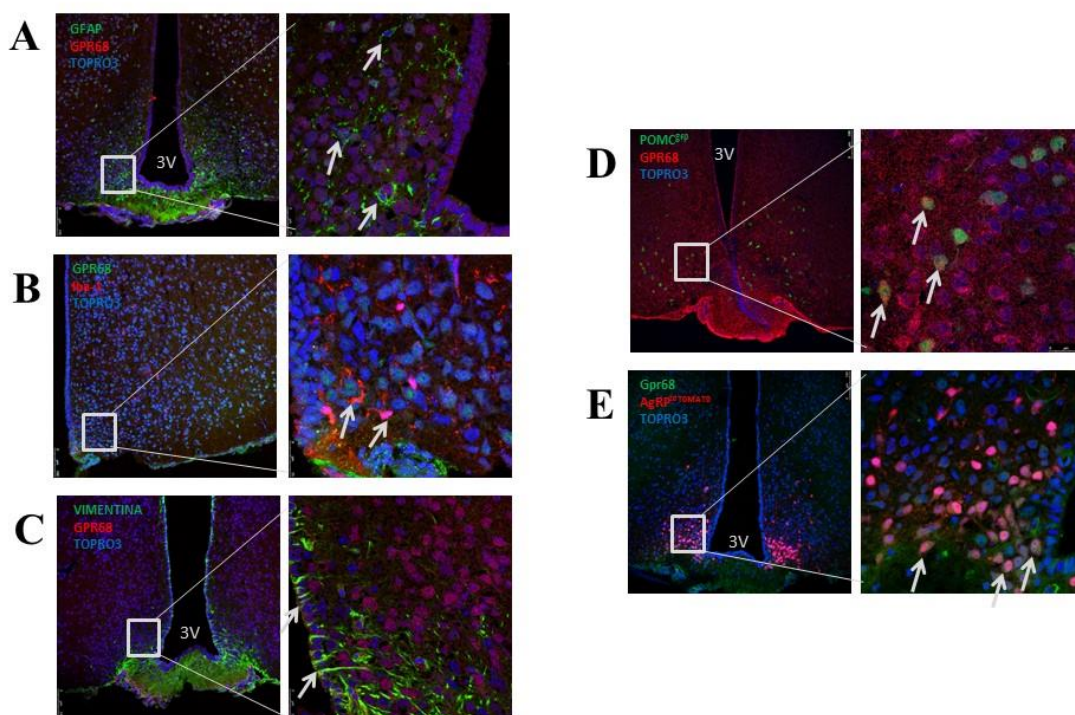


Figura 3: Imunofluorescência de hipotálamo de camundongos c57BL/6J. A-Colocalização do GPR68 com astrócitos (GFAP); B-GPR68 colocalizado com micróglia (Iba-1); C-GPR68 colocalizado com tanócitos (vimentina); D-GPR68 em neurônios POMC; E- GPR68 em neurônios AgRP. Cortes congelados frontais obtidos em criostato com 20 μ m de espessura; Objetiva de 20x para as imagens que possuem a referência 3V e objetiva de 40x (zoom 2.5 na área indicado pelo quadrado correspondente ao núcleo arqueado do hipotálamo); 3V- terceiro ventrículo do hipotálamo; n = 3.

Tratamento com Moduladores Alostéricos do GPR68

Para avançar na caracterização funcional do GPR68 hipotalâmico decidimos utilizar uma abordagem farmacológica com moduladores alostéricos positivos e negativos. Desse modo, foi utilizado o modulador alostérico positivo (PAM-*positive allosteric modulator*) e negativo (NAM-*negative allosteric modulator*), chamado Ogerina.

A figura 5 mostra o tratamento com veículo (5A), PAM (5B) e NAM (5C). Foi injetada uma única dose diretamente no ventrículo lateral do encéfalo e, após 1 hora da injeção, o encéfalo dos camundongos foi coletado e processado para análise por imunofluorescência para o marcador de atividade neuronal cFos.

Não houve diferença no padrão de marcação entre os grupos tratados com veículo, PAM e NAM. A análise qualitativa mostrou que o PAM teve maior quantidade de células positivas para o marcador cFos.

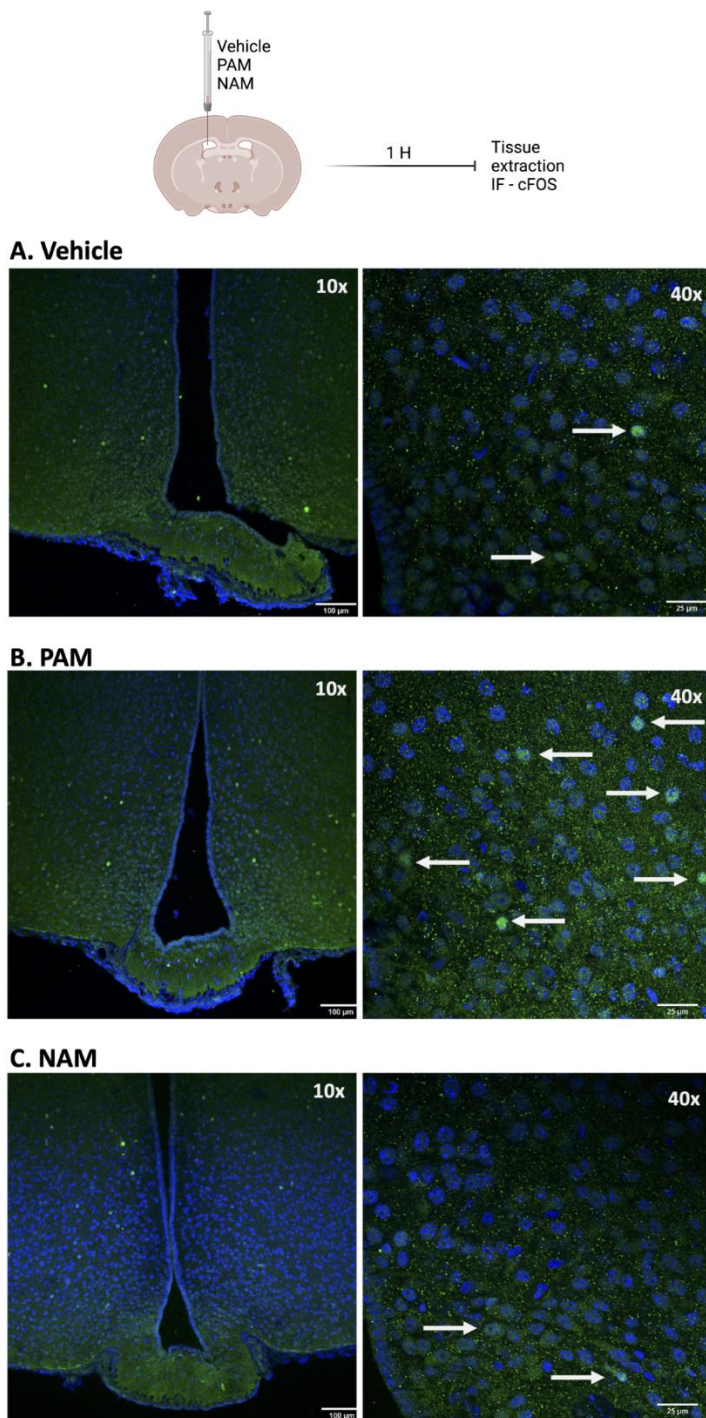


Figura 4. Ativação neuronal hipotalâmica por moduladores alostéricos do GPR68. Os camundongos foram submetidos a uma única injeção de 2 μ L de veículo, PAM ou NAM (concentração de 10 μ M) no ventrículo lateral seguido pelo ensaio de imunofluorescência para o marcador de ativação neuronal cFos no hipotálamo mediobasal. Imagem com objetiva de 10x mostra todo o hipotálamo

mediobasal e objetiva de 40x mostra o núcleo arqueado. As imagens são representativas de 1 experimento para cada condição. Em A-C, n=3.

Tratamento Intracerebroventricular (ICV) com Moduladores Alostéricos do GPR68 Modula a Expressão Gênica do Neuropeptídeo Cart

Os resultados obtidos na figura 5 mostram que o tratamento com moduladores alostéricos via ICV não promoveu aumento expressivo no marcador de atividade neuronal, contudo, houve uma redução significativa na expressão gênica do neuropeptídeo *Cart* (figura 6) quando administrado NAM via ICV. Os neuropeptídeos *POMC*, *AgRP* e *Npy* responsáveis pela manutenção do comportamento alimentar não foram modulados. Assim, o padrão de pouca ativação neuronal (figura 5) corrobora os resultados da figura 6 por não modular a expressão gênica de todos os neuropeptídeos.

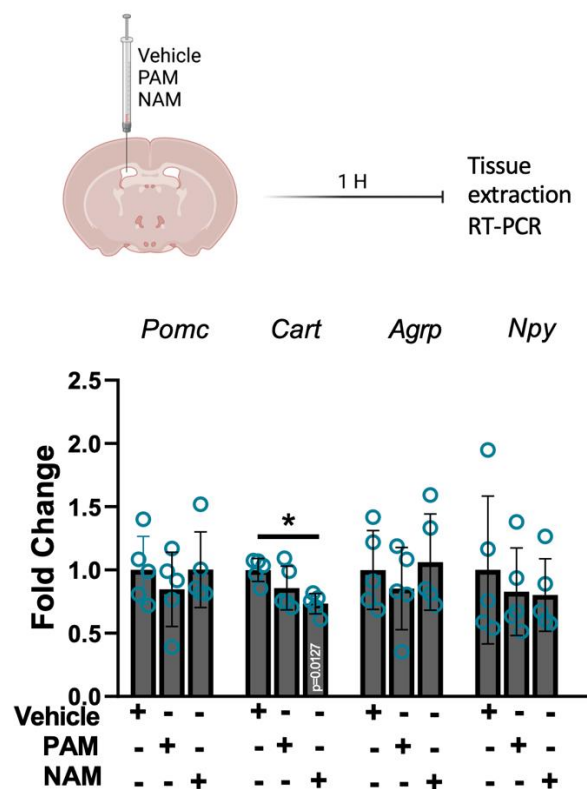


Figure 5. Efeito do tratamento dos moduladores alostéricos do GPR68 ICV na expressão gênica de neurotransmissores hipotalâmicos. Os camundongos foram submetidos a uma única injeção de veículo, PAM ou NAM (painel superior) no ventrículo lateral. Após 1 hora do estímulo o hipotálamo foi coletado e analisado a expressão de transcritos de neurotransmissores por PCR (painel inferior). Em todas as medições, n=5. *p<0,05.

Tratamento com Moduladores Alostéricos do GPR68 Direto no Núcleo Arqueado do Hipotálamo Modula a Expressão Gênica dos Neuropeptídeos Orexigênicos Agpr e Npy

Os resultados encontrados nas figuras 5 e 6 indicam que a via intracerebroventricular de administração dos moduladores alostéricos não foi eficiente em ativar uma resposta neuronal suficiente que culminasse na modulação da expressão gênica dos principais neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos. Porém, houve redução na expressão gênica de *Cart*.

Diante desses resultados, decidimos investigar se o tratamento direto no núcleo arqueado do hipotálamo, por meio de uma microinjeção bilateral no núcleo arqueado do hipotálamo, poderia modular a expressão gênica dos principais neuropeptídeos hipotalâmicos envolvidos no comportamento alimentar. Os resultados encontrados na figura 3 mostraram a presença e colocalização do GPR68 em células da glia e neurônios *POMC* e *AgRP* do núcleo arqueado.

Desse modo, foi conduzido um experimento em que foram injetados diretamente no núcleo arqueado do hipotálamo o veículo, PAM e NAM (figura 6A). Após uma hora da injeção, foi realizada análise da expressão gênica que revelou aumento significativo nos níveis de mRNA dos neuropeptídeos *AgRP* e *Npy* (figura 6B). Não houve diferença significativa nos níveis de *Cart* e tão pouco nos níveis de *POMC*. O modulador alostérico capaz de promover aumento na expressão gênica foi o modulador alostérico negativo (NAM).

De acordo com os resultados encontrados na figura 6B, elaboramos a hipótese de que o aumento significativo na expressão gênica de neuropeptídeos orexigênicos *AgRP* e *Npy* pode estar relacionado com uma mudança no comportamento alimentar, levando os camundongos a aumentarem o consumo alimentar. Para tanto, foi desenhado o experimento mostrado na figura 6C para avaliar a ingestão alimentar durante 18 horas, logo após a injeção bilateral do veículo e NAM no núcleo arqueado do hipotálamo, uma vez que, o NAM foi responsável por modular a expressão gênica.

Na figura 6D é mostrado um gráfico com a ingestão alimentar dos camundongos. Não houve diferença significativa durante as primeiras 2 horas após a injeção bilateral do modulador alostérico quando comparado com seu controle veículo

(figura 6D). Após 6 horas da introdução do NAM no núcleo arqueado do hipotálamo, houve aumento significativo na ingestão alimentar. Esse aumento significativo na ingestão alimentar se manteve durante as próximas 12 horas (ciclo escuro). No final das 18 horas de avaliação da ingestão alimentar, foi avaliada a expressão gênica dos principais neuropeptídeos envolvidos no comportamento alimentar (figura 6E). Assim, no final do período, não houve diferença entre os grupos, uma vez que, a figura 6D mostrou que todos os grupos ingeriram alguma quantidade de ração, fazendo com que fosse mantido em níveis basais dos neuropeptídeos.

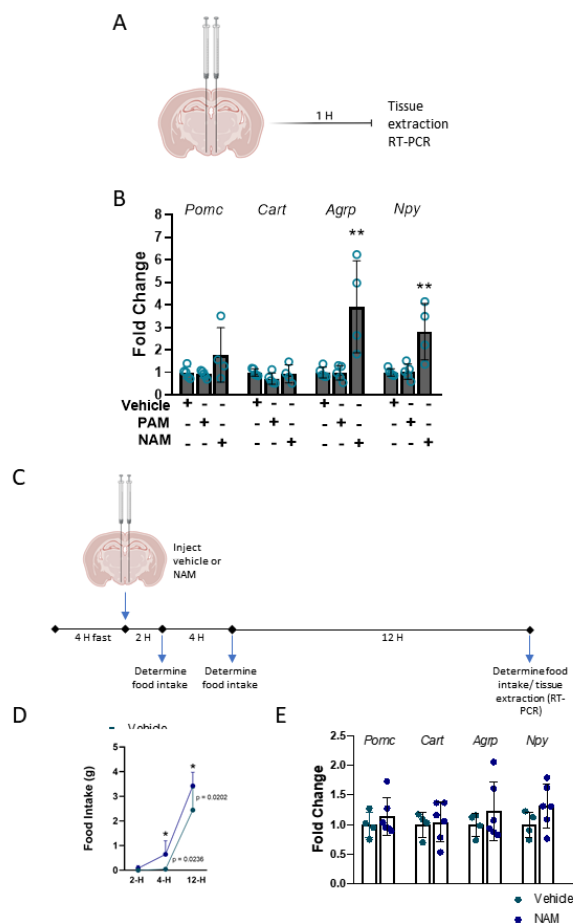


Figura 6. Efeito do modulador alostérico negativo do GPR68 na expressão gênica de neurotransmissores do núcleo arqueado e na ingestão alimentar. Os camundongos foram submetidos a uma injeção bilateral de veículo ou NAM (A) Esquema de injeção bilateral no núcleo arqueado e a expressão de transcritos de neurotransmissores foi determinada por PCR em espécimes obtidos após 1

hora (B). Os camundongos foram submetidos a injeção bilateral de veículo ou NAM (C) bilateralmente no núcleo arqueado e a ingestão alimentar foi determinada por um período de 18 h (D). A seguir, o hipotálamo foi obtido para a medida da expressão de transcritos de neurotransmissores por PCR nos espécimes obtidos (E). Em B, n=4-5; e **p<0,01. Em E, n=4-6; *p<0,05 e **p<0,01.

GPR 139 Está Presente Apenas em Neurônios POMC e AgRP

Nossos resultados mostraram que o *Gpr139* foi modulado pelo consumo de HFD durante 28 dias. Além disso, apenas o grupo de camundongos alimentados com HFD e submetidos a privação de nutrientes mostrou modulação da expressão gênica desse receptor. Diante disso, decidimos avaliar, por imunofluorescência, em quais tipos celulares o *Gpr139* está presente. Desse modo foram conduzidos ensaios de imunofluorescência para marcadores de células da glia, como GFAP (figura 7A), em que não houve colocalização do receptor com este tipo celular. O próximo passo foi avaliar a presença desse receptor em células da micróglia (figura 7B), que não mostraram colocalização. Depois disso, foi realizada dupla marcação para o *Gpr139* e o marcador de tanicitos (Vimentina), onde não houve colocalização (figura 7C).

Por meio dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação, foi possível identificar que o receptor *Gpr139* não está presente em nenhum tipo de células da glia analisadas. Assim, decidimos conduzir ensaios de imunofluorescência, utilizando camundongos transgênicos com gene reportado *gfp* para neurônios POMC (em verde), e o gene reportado em *tdTOMATO* para neurônios que expressam o neuropeptídeo AgRP (em vermelho). Desse modo, a figura 7D mostra que o *Gpr139* está presente em neurônios POMC, contudo, alguns neurônios não expressaram esse receptor. De modo similar ocorreu para a análise da marcação do *Gpr139* com neurônios AgRP, em que houve colocalização com neurônios AgRP, porém, alguns neurônios não expressaram o receptor (figura 7E).

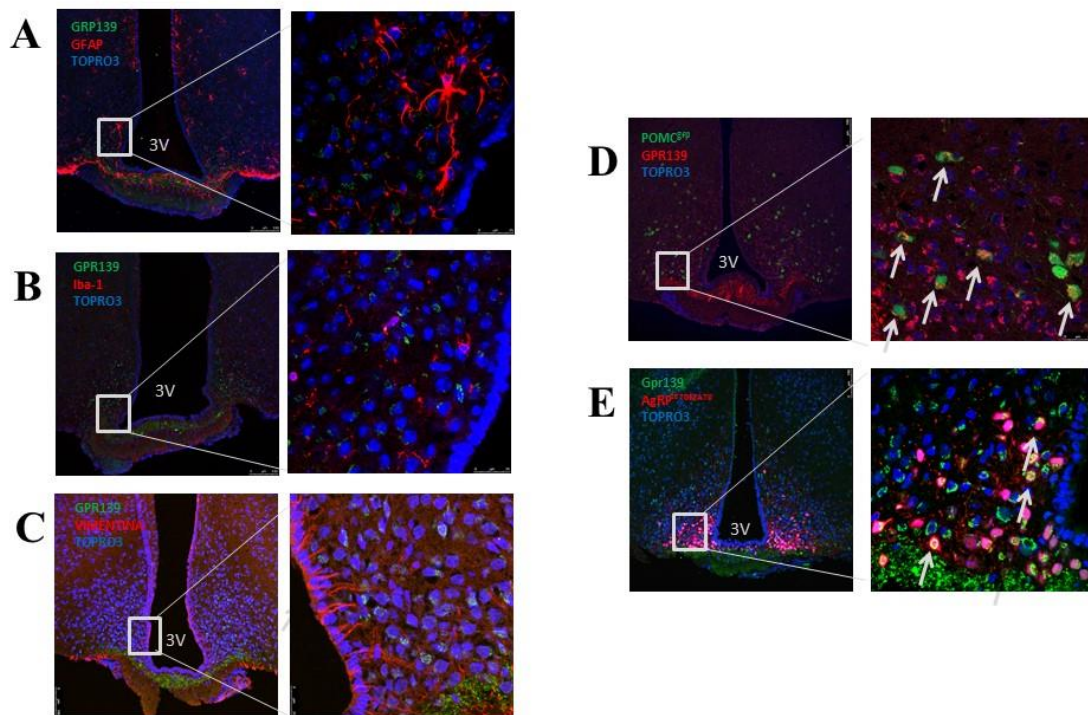


Figura 7: Imunofluorescência de hipotálamo de camundongos c57BL/6J. A-Marcação de GPR139 e astrócitos (GFAP); B-GPR139 e micrógliia (Iba-1); C-GPR139 e tãnicitos (vimentina); D- Neurônios POMC; E- Neurônios AgRP; Corte congelado frontal obtidos em criostato com 20 μ m de espessura; Objetiva de 20x para as imagens que possuem a referência 3V e objetiva de 40x (zoom 2.5 na área indicado pelo quadrado correspondente ao núcleo arqueado do hipotálamo); 3V- terceiro ventrículo do hipotálamo n = 3.

Teste de Eficiência de Lentivirus para Ensaio de Inibição Parcial do Gpr139

Para avaliar o papel do *Gpr139* no núcleo arqueado do hipotálamo, optamos por utilizar um lentivirus (*short hairpin*) capaz de reduzir a expressão proteica do *Gpr139*. Para tanto, foi injetado bilateralmente no núcleo arqueado do hipotálamo o controle (Scramble) ou a partícula lentiviral responsável por induzir a inibição parcial (knock down do Gpr139 ou KD-GPR139), formando dois grupos: Scramble e KD-GPR139. Após a microinjeção bilateral, os camundongos foram mantidos em dieta *Chow* durante 2 semanas, período em o que o lentivirus se torna eficiente em reduzir a expressão proteica do receptor. Desse modo, a figura 8 mostra que a partícula lentiviral utilizada

foi capaz de reduzir a expressão proteica do Gpr139 no núcleo arqueado do hipotálamo, área onde está localizado neurônios POMC e AgRP que expressam esse receptor.

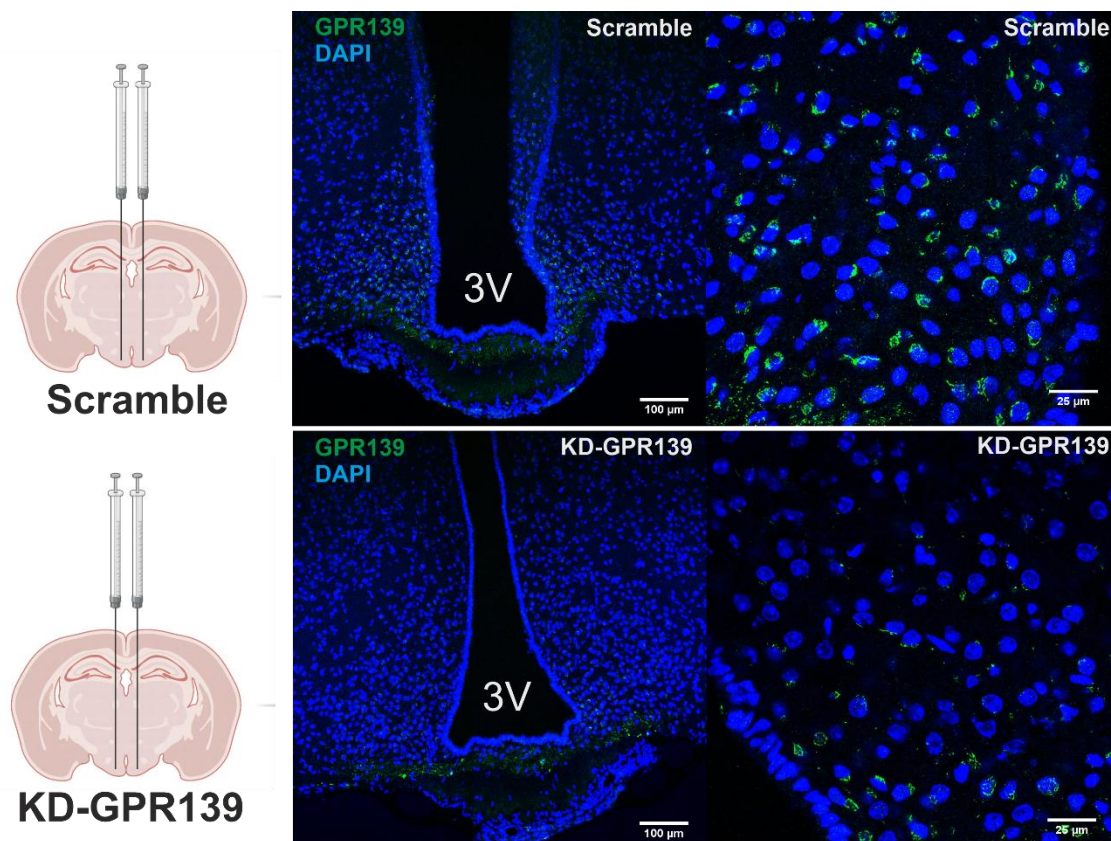


Figura 8: Imunofluorescência do núcleo arqueado do hipotálamo de camundongos submetidos ao teste de eficiência de lentivirus. Corte coronal congelado obtidos em criostato com 20µm de espessura; Objetiva de 10x para as imagens que possuem a referência terceiro ventrículo (3V) e objetiva de 40x (imagens à direita). As imagens são representativas de 1 experimento para cada condição. n=3;

Inibição Parcial do Gpr139 Tem Efeitos na Glicemia de Jejum

Após ter sido feita uma microinjeção bilateral no núcleo arqueado do hipotálamo, os camundongos divididos nos grupos Scramble (controle) e KD-GPR139 foram avaliados durante 6 semanas. No final desse período, foi mostrado que houve redução significativa da expressão gênica do *gpr139* (figura 9A), o que corrobora e valida o ensaio de inibição parcial. Além disso, houve redução significativa na glicemia de jejum (figura 9B) dos camundongos KD-GPR139 quando comparados com o grupo controle *Scramble*, ao final das 6 semanas de experimento. Porém, não houve diferença

significativa na expressão gênica dos principais neuropeptídeos hipotalâmicos (figura 9C).

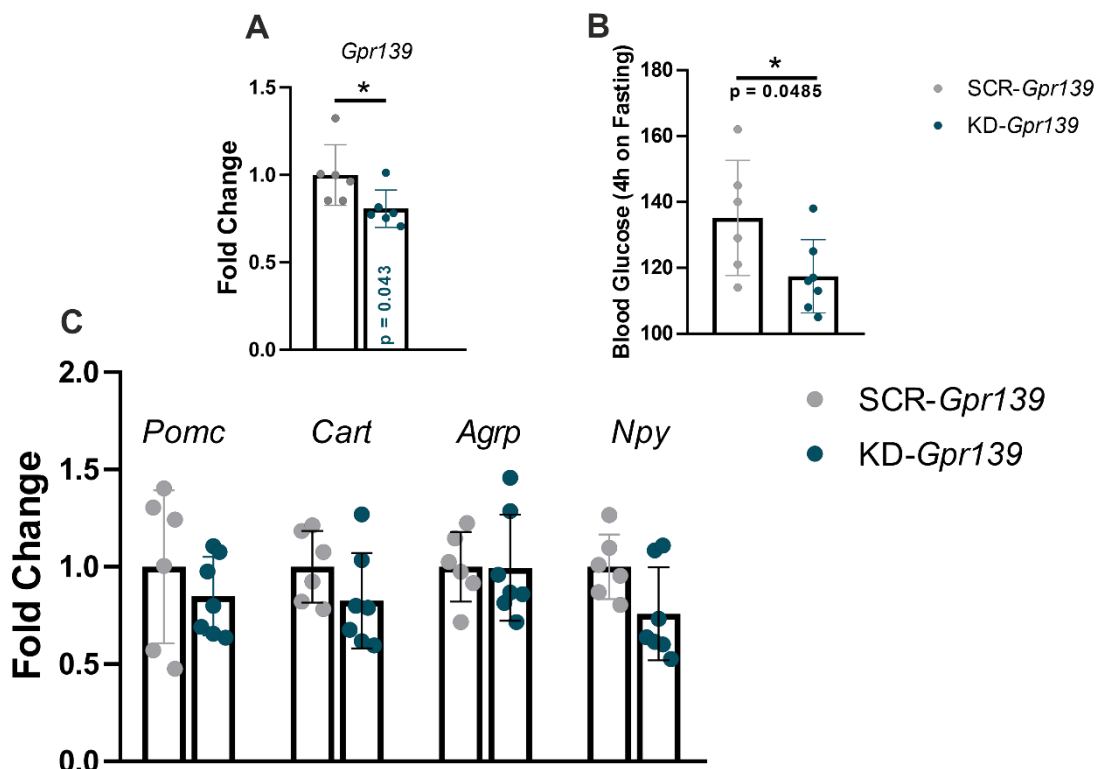


Figura 9: Efeito da inibição parcial do gpr139 afeta homeostase glicêmica sem modulação de neuropeptídeos. A- Validação do ensaio de inibição parcial mostrando que após 6 semanas a expressão gênica do GPR139 está significativamente reduzida; B-redução na glicemia de jejum no final das 6 semanas de experimento; C- análise da expressão gênica por RT-PCR de neuropeptídeos hipotalâmicos; *POMC*-pro opiomelanocortina; *Cart*- transcrito regulado por cocaína e anfetamina; *AgRP*- proteína relacionada ao Agouti; *Npy*- neuropeptídeo Y; A-C-Teste T, $p < 0.05$;

Inibição Parcial do Gpr139 Aumenta o Peso Corporal e Ingestão Alimentar Sem Alterar a Adiposidade Corporal

Após a administração das partículas lentivirais, Scramble e KD-GPR139, os camundongos foram mantidos em alimentação com dieta *Chow* durante 6 semanas, sendo as duas primeiras semanas o período de recuperação do procedimento cirúrgico e tempo hábil para que as partículas lentivirais fossem eficientes em reduzir a expressão proteica como mostrado na figura 8.

A figura 10A mostra o ganho de peso corporal dos camundongos ao longo das 6 semanas. Na quarta semana é possível notar que houve um aumento significativo no

peso corporal do grupo KD-GPR139 quando comparado com o grupo Scramble. Essa diferença se manteve nas 2 semanas subsequentes, porém, foi significativa apenas na sexta semana (figura 10A). Ao final das 6 semanas observou-se que a variação do peso corporal do grupo KD-GPR139 foi significativamente maior quando comparado com o grupo *Scramble*, como mostrado no gráfico de delta na figura 10C.

Durante o período de recuperação e eficiência da partícula lentiviral não houve diferença na quantidade de energia ingerida por dia (figura 10B), contudo, é possível notar que a partir da terceira semana após o tratamento com lentivirus, o grupo KD-GPR139 mostrou um aumento na ingestão calórica durante as 4 seguintes semanas. Esse aumento foi significativo na quarta e sexta semana (figura 10B).

Ao final das 6 semanas de experimento, os tecidos adiposos brancos localizados na região inguinal (WATing.) e na região epididimal (WATep.) foram dissecados e pesados. Desse modo, foi mostrado que não houve diferença significativa na quantidade em gramas de tecido adiposo acumulado nas regiões inguinal (figura 10D) e epididimal (figura 10E).

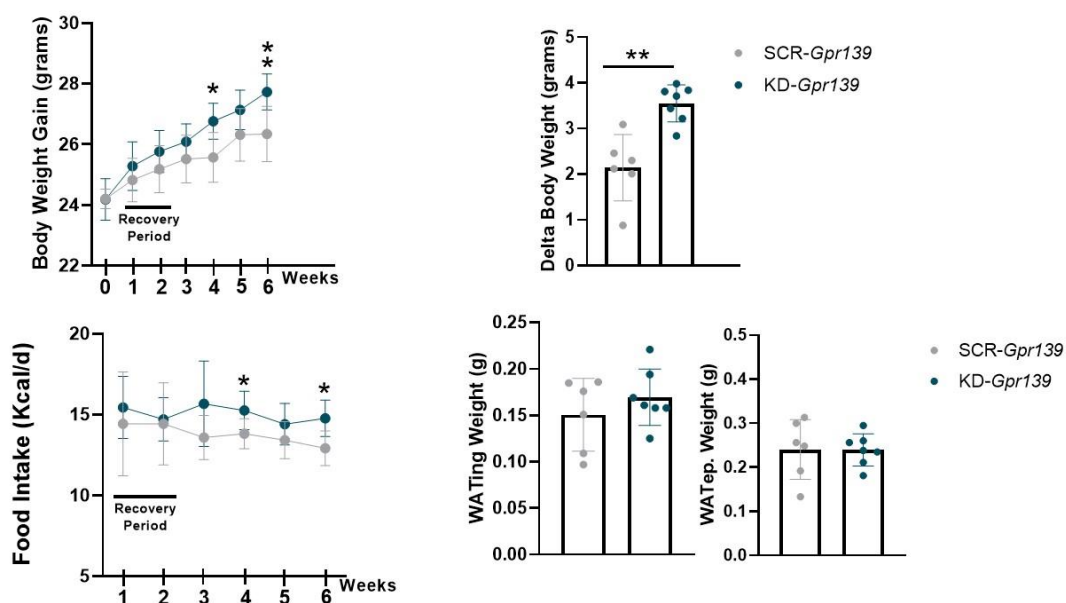


Figura 10: Inibição parcial do *gpr139* aumenta o peso corporal e a ingestão alimentar sem alterar a adiposidade. A- avaliação do ganho de peso corporal semanal ao longo das 6 semanas em dieta chow; B- avaliação da ingestão alimentar semanal; C- variação do peso corporal (delta) no início e fim do

experimento; D- peso em gramas da quantidade de tecido adiposo branco localizado na região inguinal; E- peso em gramas da quantidade de tecido adiposo branco localizado na região epididimal; n = 6-7, C57 machos; A-C-Teste T, $p < 0.05$;

DISCUSSÃO

Em nosso estudo, caracterizamos no sistema melanocortina hipotalâmico, em específico no núcleo arqueado do hipotálamo, dois novos GPCRs ainda não explorados no contexto da homeostase energética. Mostramos que esses receptores, embora estejam presentes em outros tecidos periféricos como baço, testículos, intestino delgado, cérebro e pulmão (GPR68) ou predominantemente em outras áreas do sistema nervoso central (GPR139), têm um papel relevante na manutenção, tanto do comportamento alimentar, quanto na homeostase energética e, participam ativamente do controle do comportamento alimentar e do peso corporal.

Vale ressaltar que inicialmente os experimentos de bioinformática serviram como ferramenta preliminar de seleção dos GPCRs. Assim, foram conduzidas análises utilizando bases de dados públicas para que pudéssemos alcançar todos os GPCRs órfãos da classe A e seu padrão de expressão gênica no tecido hipotalâmico. A partir do Heat Map, criado por análise na base de dados <https://www.genecards.org/> (figura 1C), selecionamos três receptores que, buscamos por trabalhos na literatura relacionados ao hipotálamo, e não encontramos estudos mostrando uma caracterização ou mesmo a participação desses receptores (GPR68 e GPR139) no sistema melanocortina hipotalâmico. Porém, havia estudos mostrando o envolvimento do GPR162 no sistema melanocortina hipotalâmico. Assim, optamos por estudar o papel dos GPCRs 68 e 139.

O próximo experimento preliminar que realizamos foi testar a capacidade dos estímulos dietéticos, tanto o consumo de dieta hiperlipídica, quanto o jejum (ausência total de nutrientes), em modular a expressão gênica do GPR68 e 139, uma vez que nosso estudo objetivou identificar novos GPCRs órfãos capazes de responder aos estímulos nutricionais e que participassem da regulação do comportamento alimentar e peso corporal. Assim, conduzimos os experimentos utilizando dieta hiperlipídica (figura 2A) e jejum (figura 2B). Segundo a figura 1C, o GPR162 possui grande expressão gênica no hipotálamo, assim decidimos avaliar se os dois estímulos dietéticos fossem capazes de modular a sua expressão gênica. Porém, devido aos trabalhos publicados por Caruso e colaboradores, 2014 e 2016, optamos por não estudar esse receptor.

Com base em nossos resultados, os receptores órfãos da classe A, GPR68 e GPR139 foram modulados tanto na privação de nutrientes, quanto no consumo de HFD. Entretanto, não encontramos mudança no padrão de expressão gênica para o GPR162

tanto em relação ao consumo de HFD (figura 2A), quanto em privação de nutrientes em camundongos alimentados com dieta padrão. Caruso e colaboradores (2014), mostraram que esse receptor está presente em áreas do SNC relacionadas com homeostase energética, como hipotálamo e em áreas hedônicas, como amígdala e área ventral tegumentar. A inibição parcial do GPR162, via ICV, revelou redução na ingestão alimentar, assim como redução no peso corporal (CARUSO et al., 2016).

Henry e colaboradores (2015), por meio de sequenciamento gênico, mostraram que o padrão de expressão gênica de diversas classes de GPCRs foram diferentemente expressos em neurônios *Agrp* e *Pomc* em camundongos submetidos ao estímulo de privação de nutrientes durante 24 horas. Um desses receptores, o *Gpr6* (receptor órfão da classe A), que teve aumento significativo no número de transcritos quando estimulado pela privação de nutrientes, quando superexpressado em neurônios *Agrp*, aumentou significativamente o peso corporal de camundongos durante o curto período de seis semanas de consumo de dieta padrão. A partir desse resultado, ficou evidente o papel dos GPCRs hipotalâmicos presentes em neurônios de primeira ordem no controle do peso corporal e homeostase energética em resposta a alterações no balanço energético. Além do *Gpr6* caracterizado por Henry e colaboradores (2015), observamos que nesse mesmo estudo, os mesmos GPCRs que selecionamos como novos participantes, foram modulados pelo período de jejum. Logo, esse estudo corroborou nossos indícios da participação do GPR68, GPR139 e GPR162 no sistema melanocortina hipotalâmico.

O grupo experimental alimentado com HFD previamente ao jejum mostrou significativa modulação na expressão gênica para os três GPCRs estudados (GPR68, GPR139 e GPR162) de acordo com a figura 2B. A modulação na expressão gênica dos três receptores, diante da HFD (dieta contendo 5,1 Kcal/g), mostrou uma semelhança entre os receptores, com aumento nos períodos de 6 e 12 horas de privação de nutrientes seguido por uma redução durante 24 horas (figura 2B-HFD). Assim, os efeitos da privação de nutrientes foram mais evidentes quando foi previamente ofertada uma dieta hiperlipídica, mostrando que o consumo durante curtos períodos de dieta hiperlipídica é responsável por alterar o padrão de expressão gênica hipotalâmico dos GPCRs avaliados.

O curto período de consumo de HFD, ativa uma resposta inflamatória no hipotálamo, marcada pelo aumento significativo na transcrição gênica e conteúdo

proteico de citocinas pró inflamatórias, como o TNF alfa, além de modular proteínas envolvidas no estresse do retículo endoplasmático (CARRARO et al., 2018). Nossos resultados mostraram que o GPR68 e o GRP139 foram modulados durante curtos períodos de alimentação com HFD e durante curtos períodos de privação de nutrientes, tanto em camundongos alimentados com dieta padrão (GPR68) quanto em HFD (GPR139 e GPR162). Porém, o tempo de consumo de dieta hiperlipídica capaz de promover sinais pró inflamatórios é mais curto do que o período em que os GPCRs foram modulados, sugerindo um efeito secundário ao processo inflamatório.

Entretanto, esses efeitos na produção de citocinas e ativação de proteínas de estresse de reticulo plasmático ocorrem mais precocemente (a partir de 6 horas até 3 dias) do que a modulação dos GPCRs (a partir de 7 dias). Assim, a modulação da expressão gênica dos GPCRs estudados ocorreu mais tardia ao período reportado pelo estudo de Carraro e colaboradores (2018), em relação ao aumento da transcrição gênica e proteica de citocinas pró-inflamatórias, indicando que esses receptores são modulados mais tardiamente.

O primeiro estudo que caracterizou o receptor 1 acoplado à proteína G de câncer de ovário (Ogr1 ou, GPR68 de acordo com a classificação de IUPHAR) mostrou que esse receptor esteve presente em uma linhagem de células de câncer de ovário e tecidos como, baço, testículos, porção inferior do intestino delgado, leucócitos periféricos, cérebro e pulmão, porém, ausente no tecido saudável de ovário, timo, próstata, fígado, músculo esquelético e pâncreas (XU e CASEY, 1996).

Anos mais tarde, Ludwig e colaboradores (2003) mostraram que o GPR68 está presente em osteoblastos e se torna ativo aumentando as concentrações de fosfato inositol em condições de pH extracelular 6.8. Em estado de pH alcalino, os íons hidrogênio se ligam aos resíduos de histidina estabilizando o estado inativo do GPR68, porém, com acidificação do meio (aumento na concentração de hidrogênio) extracelular ocorre uma destruição da estabilização inativa, passando para um estado ativo culminando na ativação de Gq, aumento de fosfolipase C, fosfatidil Inositol e consequente aumento nos níveis de cálcio intracelular (YUAN et al., 2014).

Com base em nossos resultados genotípicos e, considerando as características moleculares e estruturais do GPR68, decidimos conduzir alguns experimentos para investigar o papel do GPR68 no sistema melanocortina hipotalâmico. Nenhum estudo

mostrou a presença e colocalização desse receptor em diferentes tipos celulares no sistema melanocortina hipotalâmico. Um estudo conduzido por Xu e Casey, 1996 mostrou transcritos do GPR68 em baço, testículo, intestino delgado, leucócitos periféricos, cérebro, coração, pulmão, placenta e rim, porém, sem nenhuma distinção de áreas do sistema nervoso central. Em 2019, Wiley e colaboradores, por meio de base de dados, mostraram uma distribuição detalhada do GPR68 em diversas áreas do cérebro, entre as mais expressas, analisadas por transcritos por milhão, estão a glândula pituitária, cerebelo e hipotálamo.

De acordo com os achados reportados e em conformidade com nossos objetivos, mostramos, por meio de ensaios de imunofluorescência com dupla marcação, a presença e colocalização do GPR68 em células da glia (astrócitos, micróglia e tângios) e neurônios Pomc e Agrp (figura 3). Assim como no estudo de Dragano e colaboradores, (2017), que por meio de ensaios de imunofluorescência com dupla marcação, foi caracterizado o GPR40 e GPR120 no núcleo arqueado do hipotálamo.

Nesse estudo, foi mostrado que ambos os receptores estão presentes em diferentes tipos celulares, GPR40 localizados apenas em neurônios Pomc e Agrp, e GPR120 presente em células da micróglia. Embora os GPCRs 40 e 120 sejam receptores que reconhecem ácidos graxos polinsaturados, sua localização celular é diferente e, portanto, o efeito que cada receptor exerce também foi diferente, uma vez que a ativação seletiva de GPR120, culminou na redução de citocinas pró inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias, ao passo que, a ativação seletiva de GPR40 promoveu redução do peso corporal e aumento do neuropeptídeo Pomc.

De acordo com nossos resultados de imunofluorescência, o GPR68, presente em distintos tipos celulares no núcleo arqueado do hipotálamo, pode estar relacionado com a manutenção da homeostase energética, bem como envolvido no comportamento alimentar, uma vez que diferentes GPCRs que podem reconhecer o mesmo ligante têm efeitos distintos quando ativados separadamente e efeito somatório quando ativado por duplo agonista seletivo (Dragano et al., 2017). Assim, nossa próxima perspectiva de análise foi investigar qual o papel desse receptor, quando ativado por moduladores alostéricos positivos e negativos, no comportamento alimentar e homeostase energética. Para tanto, nos baseamos no trabalho de Dragano e colaboradores (2017), e realizamos um tratamento por meio de microinjeção intracerebroventricular direta no núcleo arqueado do hipotálamo.

Não houve diferença no padrão de ativação dos neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo, mostrado pelo marcador de ativação neuronal cFos, em resposta ao tratamento via ICV (figura 4). Como mencionado, o GPR68 está presente em diversas áreas do SNC, assim, quando ofertado via sistema ventricular, nosso tratamento afetou todas as áreas do SNC, uma vez que o sistema ventricular conecta todos os quatro ventrículos cerebrais em que circulam o líquido cefalorraquidiano banhando todas as áreas cerebrais e, assim, rapidamente difundindo o tratamento por todo SNC e não concentrando apenas no núcleo arqueado. Contudo, não foi avaliada a ativação neuronal em outras áreas cerebrais onde o GPR68 está expresso.

A abordagem via ICV permite difundir substâncias por todo SNC, principalmente núcleos hipotalâmicos que se localizam próximos às paredes ventriculares. Entretanto, Wardman e colaboradores, (2016) mostraram que a infusão via intraperitoneal (uma injeção de 3 mg/kg a cada 30 min, durante 1 hora) do agonista do GPR171 foi capaz de induzir aumento de aproximadamente 30% de células positivas para c-Fos no PVN, núcleo em que o GPR171 está expresso. O tempo de administração do agonista foi suficiente em induzir ativação de neurônios presentes no PVN em camundongos wild type. Contudo, não realizamos nenhum tratamento periférico acreditando que a biodisponibilidade dos moduladores alostéricos poderia atuar no Gpr68 presente em tecidos periféricos, e como nosso objetivo foi ativar no núcleo arqueado do hipotálamo, optamos pelo tratamento via SNC.

Com base no estudo de Krashes e colaboradores (2013), utilizando camundongos transgênicos, foi mostrado que a ativação farmacogenética de neurônios hipotalâmica ocorre logo após 30 min da administração intraperitoneal de N -óxido de clozapina (CNO). Além disso, em modelos animais quimiogeneticamente modificados, os estímulos intraperitoneais de CNO persistem até 2 horas após sua administração (KRASHES et al., 2011; KRASHES et al., 2014). Com base nesses estudos, decidimos avaliar a ativação neuronal por meio de um tratamento ICV, uma vez que, nosso receptor está localizado em tecidos periféricos, podendo ser ativado pelo tratamento sistêmico.

Como não houve diferença evidente na ativação neuronal, decidimos, avaliar se houve modulação dos principais neuropeptídeos envolvidos no controle do comportamento alimentar. Desse modo, conduzimos o mesmo experimento, porém, o hipotálamo foi coletado para análises de expressão gênica, que revelou apenas redução

significativa do neuropeptídeo *Cart* (figura 5) no tratamento com o modulador alostérico negativo (NAM). Nesse experimento, notamos que mesmo via ICV os efeitos dos moduladores alostéricos parecem não ser tão eficientes em promover modulação de neuropeptídeos hipotalâmicos. Diante desses resultados e de acordo com os critérios de especificidade do GPR68 e seu papel em diferentes tipos celulares e tecidos, optamos por fazer um tratamento direto no núcleo arqueado do hipotálamo, região do hipotálamo em que mostramos, por imunofluorescência, a presença desse receptor em diferentes tipos celulares.

Assim, decidimos avaliar a modulação gênica dos neuropeptídeos hipotalâmicos envolvidos no comportamento alimentar quando administrados os moduladores alostéricos diretamente no núcleo arqueado do hipotálamo. Desse modo, foi possível mostrar que o modulador alostérico negativo foi capaz de aumentar significativamente a transcrição gênica dos neuropeptídeos *Agrp* e *Npy* (figura 6B). A partir do aumento significativo dos neuropeptídeos *Agrp* e *Npy*, questionamos se o tratamento seria capaz em evocar um comportamento de fome e consumo alimentar. Para tanto, decidimos avaliar o comportamento alimentar por meio da ingestão alimentar dos camundongos tratados com NAM durante as últimas 6 horas de ciclo claro (tempos 0, 2 e 4 horas) e as 12 horas de ciclo escuro (figura 6C). Como mostrado na figura 6D, o tratamento com NAM aumentou significativamente o consumo alimentar quando comparado com o grupo controle.

Neurônios *Agrp* estão presentes no núcleo arqueado do hipotálamo, secretam os neuropeptídeos *Agrp*, *Npy* e GABA, quando ativados em situações de déficit energético promovendo o consumo alimentar. Em situações de privação de nutrientes, em que os níveis de leptina e insulina são reduzidos e os níveis de grelina são aumentados, ocorre ativação dos neurônios *Agrp*, que atuam em diversos circuitos extrahipotalâmicos e intrahipotalâmicos, inibindo neurônios *Pomc* e antagonizando o receptor MC4R em neurônios localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo. Com isso, ocorre aumento na ingestão alimentar e redução no gasto energético (HAN e XIA, 2018).

O aumento significativo na ingestão alimentar no grupo tratado com NAM, mostrou que o alosterismo negativo do GPR68 foi capaz de induzir uma mudança no comportamento alimentar dos camundongos, promovendo aumento na ingestão alimentar. Assim como reportado por Krashes e colaboradores (2011), a ativação quimiogênica de neurônios *Agrp*, por meio do uso de receptores desenhados

exclusivamente para serem ativados por uma droga, específica (designer receptors exclusively activated by designer drugs-DREADD), rapidamente induziu despolarização de neurônios *Agpr*, seguido por aumento significativo na ingestão alimentar (4 horas) durante a fase clara do ciclo circadiano.

Assim, em nossos resultados encontramos um efeito semelhante em relação ao consumo alimentar nas primeiras 6 horas durante o ciclo claro, após injeção do NAM. Esse efeito foi mantido durante o ciclo escuro (12 horas, figura 6D). Embora, no estudo de Krashes foi feita uma abordagem quimiogenética de ativação de neurônios *Agpr*, em nosso estudo, por meio da modulação alostérica farmacológica, houve aumento no consumo alimentar tanto nas primeiras horas após a administração do NAM, quanto no final do experimento.

Podemos observar que, diferentemente do tipo de ativação feita por Krashes e colaboradores (2011), nossa abordagem farmacológica mostrou ser eficiente em induzir aumento na ingestão alimentar, apesar de nem todos os neurônios *Agpr* expressarem o GPR68 (estudos de imunofluorescência na figura 3E). Neurônios *Agpr*, expressam o neuropeptídeo *Npy* que atua aumentando a ingestão alimentar. Além disso, os neurônios *Agpr* podem inibir neurônios *Pomc*, via o neurotransmissor GABA, potencializando a ingestão alimentar (KRASHES et al., 2013; WATERSON, M. J.; HORVATH, T. L., 2015).

Em nossos resultados, o aumento significativo de dois neuropeptídeos (*Agpr* e *Npy*), sem modulação da expressão gênica dos neuropeptídeos anorexigênicos (*Pomc* e *Cart*), indicou que o tratamento com NAM poderia induzir aumento na ingestão alimentar. Desse modo, os experimentos mostrados na figura 6D confirmam que nosso tratamento com NAM induziu aumento na ingestão alimentar, porém, não houve diferença na expressão gênica dos neuropeptídeos hipotalâmicos no final do experimento (figura 6E), uma vez que ambos os grupos estavam alimentados.

Por meio do tratamento intraperitoneal (IP), utilizando o agonista de GPR171, Wardman et al., (2016), mostraram que a administração periférica do agonista MS0015203 aumenta significativamente a ingestão alimentar acumulativa nas 2, 4 e 8 horas após administração do agonista. Esse achado vai ao encontro dos nossos resultados mostrados na figura 6, porém, ofertamos o modulador alostérico direto no núcleo arqueado do hipotálamo e testamos em animais alimentados submetidos a jejum

por 4 horas, para avaliar a capacidade do estímulo em induzir um comportamento alimentar hiperfágico.

Os efeitos sustentados do tratamento direto no núcleo arqueado do hipotálamo podem ser explicados pela capacidade do modulador alostérico em se ligar, em uma região não ortostérica (região diferente de onde ocorre a ligação específica do ligante endógeno) do GPR68 e manter a mudança conformacional induzida que potencializa os efeitos de agonismo. No estudo reportado por Cao e colaboradores (2021), foi mostrado que o alosterismo positivo do receptor metabotrópico de glutamato, induz a estabilidade e aumento no tempo de estado ativo do receptor, o que confere maior eficácia e atividade do receptor para o efeito do agonista. Assim, em nossos últimos resultados, mostramos que o alosterismo negativo do GPR68 sustentou o aumento da ingestão alimentar durante todo o período de ciclo escuro (figura 6D tempo de 18 horas).

Presente apenas no SNC em áreas como núcleo caudado, putâmem, hipocampo, tálamo, hipotálamo, medula espinha e glândula pituitária, o GPR139, foi primeiro descrito por Matsuo e colaboradores (2005), porém, nenhuma caracterização no núcleo arqueado foi feita. A partir desse estudo, Sussens et al. (2006), reportaram a presença desse receptor no tecido nervoso pós natal e durante as fases do desenvolvimento do sistema nervoso central de camundongos. Além disso, mostraram que o GPR142, outro GPCR com 67% de homologia moleculares com o GPR139, está mais expresso em tecidos periféricos do que no sistema nervoso central.

De acordo com os estudos mencionados, encontramos em nossos resultados a expressão gênica do *Gpr139* no hipotálamo de camundongos (figura 2A), assim como descrito por Matsuo e colaboradores (2005) e Sussens e colaboradores (2006). Além disso, mostramos que o GPR139 está presente apenas em neurônios *Pomc* e *Agrp* (figura 7), localizados no núcleo arqueado do hipotálamo, entretanto, em nossos resultados, foi avaliado apenas o marcador GFAP e Iba-1 e não outros tipos de marcadores de micróglia ou mesmo de células do sistema imune. Em 2019, Wang e colaboradores, mostraram, por meio de hibridização *in situ*, que o receptor GPR139 está presente no núcleo arqueado do hipotálamo, porém, está colocalizado no mesmo tipo celular que expressa o receptor de dopamina 2 (DRD2). Portanto, em nossos resultados apresentados na figura 7, foi possível identificar o GPR139 no núcleo arqueado do hipotálamo, entretanto, não avaliamos colocalização com receptores D2.

Nesses experimentos de imunofluorescência, nosso objetivo foi discriminar em qual população celular do núcleo arqueado o GPR139 está presente. Desse modo, utilizamos camundongos com gene reportado para *Pomc* e *Agrp* e, identificamos a colocalização desse receptor apenas nessas duas populações de neurônios avaliados. O estudo reportado por Wang et al., (2019), mostrou a colocalização de dois receptores distintos colocalizados no mesmo tipo celular, porém, nesse estudo, não foi mostrado o tipo celular. Desse modo, nossos resultados mostram que a presença do GPR139 é exclusiva de neurônios *Pomc* e *Agrp*, de modo que esse padrão de localização neuronal ainda não foi descrito na literatura.

As primeiras evidências da participação do GPR139 no comportamento alimentar e homeostase energética, surgiram a partir dos estudos de Liu e colaboradores (2015) e Wagner et al. (2016). Nesses estudos foi possível identificar a presença do GPR139 na Habênula, área do sistema nervoso central envolvida no sistema anti-recompensa que emite inputs para o hipotálamo lateral e área pré optica anterior. Além dessa caracterização, foi pontuado que o GPR139 atua como sensor de aminoácidos essenciais (L-triptofano e L-fenilalanina) no sistema nervoso central.

Em 2015, Dvorak e colaboradores identificaram o composto JNJ63533054, um potente agonista de alta afinidade, específico para o GPR139, e não para o GPR142 (receptor homólogo ao GPR139), com alta solubilidade em meio aquoso, boa permeabilidade celular e capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Esse composto, quando administrado via oral, reduziu a atividade locomotora espontânea de modo dose dependente (LIU et al., 2015). Assim, diante dos estudos que mostraram o envolvimento desse receptor na homeostase energética e seu papel da atividade locomotora, decidimos investigar qual o papel do GPR139 no núcleo arqueado do hipotálamo.

Para tanto, utilizamos de ensaios de inibição parcial, por meio de lentivirus short hair pin (shRNA) que expressa um RNA de interferência capaz de reduzir a transcrição gênica e proteica do GPR139, uma vez que esse tipo de abordagem molecular, utilizando vetores virais, tem sido muito utilizado em estudos de mapeamento de circuitos neurais, bem como, inibição e ativação de receptores presentes no sistema nervoso central (BOFILL-DE ROS e GU, 2016; NECTOW e NESTLER, 2020).

Decidimos avaliar a eficiência da partícula lentiviral, shRNA-GPR139, por meio de imunofluorescência, uma vez que foi injetada diretamente essa partícula no núcleo arqueado do hipotálamo, local onde mostramos a colocalização desse receptor em neurônios Pomc e Agrp (figura 7D e E) e, após 2 semanas da microinjeção, foi avaliada a capacidade do lentivirus em reduzir a expressão proteica do Gpr139. Como mostrado na figura 8, é notável observar uma redução na imunomarcagem para o GPR139 em relação ao grupo controle. Esse tipo de abordagem específica no núcleo arqueado do hipotálamo, tem sido utilizado para avaliar o efeito da inibição parcial de uma proteína localizada apenas em um núcleo ou área. Desse modo, no estudo de Mendes e colaboradores (2018), é possível observar o mesmo tipo de abordagem, porém, utilizando um shRNA direcionado ao TGF- β 1 (transforming grow factor beta 1).

Depois de validar nosso modelo de inibição parcial do Gpr139 por microinjeção de shRNA no núcleo arqueado, decidimos avaliar o ganho de peso corporal e ingestão alimentar dos camundongos que receberam a partícula lentiviral quando comparado aos seus grupos controles. Desse modo, mostramos que nosso modelo de inibição parcial foi eficiente em manter a redução da expressão gênica do *gpr139* no final do experimento de 6 semanas (figura 9A), corroborando nossos dados de eficiência da partícula lentiviral. Depois disso, avaliamos o ganho de peso corporal bem como a ingestão alimentar dos camundongos KD-GPR139 (knockdown do Gpr139), e mostramos que durante o curto período de 4 semanas houve um aumento significativo no peso corporal, seguido pelo aumento no consumo alimentar.

Os efeitos no controle e manutenção adequados do peso corporal e ingestão alimentar são mediados por neurônios de primeira ordem localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (MORTON et. al., 2006). Em nossos resultados, mostramos que o GPR139 está colocalizado apenas em neurônios Pomc e Agrp, que são responsáveis pela manutenção da homeostase energética e controle do peso e ingestão alimentar. Logo, nosso experimento de repressão gênica do *Gpr139* afetou diretamente a capacidade homeostática do hipotálamo em manter o controle adequado do peso corporal e da ingestão alimentar (figura 10A-C), resultando em desequilíbrio energético sem alterar a quantidade de massa adiposa (figura 10D e E).

O mecanismo de ação do GPR139, quando ativado, envolve predominantemente o recrutamento da subunidade Gs da proteína G heterotrimérica (HU et al., 2009). O papel dessa subunidade no hipotálamo está relacionado com

controle do gasto energético e ativação do tecido adiposo marrom, uma vez que camundongos alelos maternos knockout para Gs no núcleo dorsomedial do hipotálamo desenvolvem obesidade com ganho de massa magra e massa adiposa, redução no gasto energético e redução de genes termogênicos como *Ucp1* e *Pgc1a* (CHEN et al., 2017).

Em nossos resultados encontramos que a inibição parcial desse receptor resultou em aumento no peso corporal (figura 10C) sem aumentar a quantidade de tecido adiposo inguinal (figura 10D) e epididimal (figura 10E). Não foi avaliada a via de sinalização intracelular envolvida com a inibição parcial desse receptor, contudo, acreditamos que o ganho de peso pode estar relacionado com o aumento da massa magra dos camundongos, porém, não foi avaliada a densidade corporal dos camundongos.

Em nossos resultados, foi possível mostrar que o Gpr68 parece ser um receptor importante no controle da ingestão alimentar, uma vez que, apenas por meio da regulação alostérica negativa direta no núcleo arqueado do hipotálamo, houve aumento significativo na ingestão alimentar de camundongos. Esse efeito fisiológico, provavelmente condiz com nossos resultados, que mostraram aumento da expressão gênica dos neuropeptídeos orexigênicos *Agrp* e *Npy*. Além disso, o padrão de expressão desse receptor, que tanto em neurônios de primeira ordem orexigênicos/anorexigênicos, quanto pelas células da glia, integram o circuito neural do sistema melanocortina hipotalâmico, presente no núcleo arqueado do hipotálamo, especializado em receber estímulos hormonais e nutricionais periféricos e converter em neuropeptídeos que controlam a homeostase energética e comportamento alimentar.

O GPR139, predominantemente expresso em neurônios do núcleo arqueado, mostrou ser um novo participante do sistema melanocortina hipotalâmico e um possível alvo terapêutico para obesidade e doenças metabólicas. A repressão gênica desse receptor, levou a um fenótipo de pouco ganho de peso corporal, sem aumentar a massa adiposa, mas com redução dos níveis plasmáticos de glicemia. A partícula lentiviral utilizada funcionou de modo não seletivo para populações neuronais específicas, desse modo, parte dos efeitos pode estar relacionada à repressão gênica em neurônios *Pomc* e parte em neurônios *Agrp*, uma vez que essas populações neuronais atuam coordenando o comportamento alimentar e integrando circuitos intra e extra hipotalâmicos responsáveis por controlar a glicemia periférica.

Nosso estudo identificou dois novos potentes participantes do sistema melanocortina hipotalâmico relacionados com a manutenção do comportamento alimentar e controle do balanço energético. Contudo, ainda são necessários mais estudos utilizando diferentes abordagens farmacológica, moleculares e camundongos transgênicos, que visem a ativação, repressão ou super expressão gênica do GPR68 e GPR139 em neurônios específicos.

CONCLUSÕES

A modulação alostérica do Gpr68 no núcleo arqueado do hipotálamo aumentou a expressão gênica dos neuropeptídeos orexigênicos *AgRP* e *Npy* com consequente aumento do consumo alimentar.

O GPR139 é predominantemente expresso em neurônios hipotalâmicos (POMC e AgRP) e sua repressão gênica, por lentivirus injetado direto no núcleo arqueado do hipotálamo, promove ganho de peso corporal em decorrência do aumento na ingestão alimentar.

Este estudo identificou dois GPCRs expressos no hipotálamo, os quais tem participação direta na regulação do balanço energético do organismo. Estudos futuros podem explorar o potencial de compostos para modulação e ativação desses receptores com vistas ao desenvolvimento de fármacos para o tratamento de obesidade e outras doenças metabólicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, E. J. P., Çakir, I., Carrington, S. J., Cone, R. D., Ghamari-Langroudi, M., Gillyard, T., Gimenez, L. E., & Litt, M. J. (2016). Regulation of feeding and energy homeostasis by α -MSH. *Journal of Molecular Endocrinology*, *56*(4), T157–T174. <https://doi.org/10.1530/JME-16-0014>
- Alavi, M. S., Shamsizadeh, A., Azhdari-Zarmehri, H., & Roohbakhsh, A. (2018). Orphan G protein-coupled receptors: The role in CNS disorders. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *98*(December 2017), 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.056>
- Araujo, E. P., Moraes, J. C., Cintra, D. E., & Velloso, L. A. (2016). Mechanisms in endocrinology: Hypothalamic inflammation and nutrition. *European Journal of Endocrinology*, *175*(3), R97–R105. <https://doi.org/10.1530/EJE-15-1207>
- Atasoy, D., Nicholas Betley, J., Su, H. H., & Sternson, S. M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*, *488*(7410), 172–177. <https://doi.org/10.1038/nature11270>
- Azam, S., Haque, M. E., Jakaria, M., Choi, D.-K., Jo, S.-H., Kim, I.-S., & Choi, D.-K. (2020). G-Protein-Coupled Receptors in CNS: A Potential Neurodegenerative Disorders and Associated. *Cells*, *9*, 506.
- Betley, J. N., Cao, Z. F. H., Ritola, K. D., & Sternson, S. M. (2013). XParallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell*, *155*(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.002>
- Bofill-De Ros, X., & Gu, S. (2016). Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods*, *103*, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.04.003>
- Cao, A. M., Quast, R. B., Fatemi, F., Rondard, P., Pin, J. P., & Margeat, E. (2021). Allosteric modulators enhance agonist efficacy by increasing the residence time of a GPCR in the active state. *Nature Communications*, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25620-5>
- Carraro, R. S., Souza, G. F., Solon, C., Razolli, D. S., Chausse, B., Barbizan, R.,

Victorio, S. C., & Velloso, L. A. (2018). Hypothalamic mitochondrial abnormalities occur downstream of inflammation in diet-induced obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *460*, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.029>

Caruso, V., Hägglund, M. G., Badiali, L., Bagchi, S., Roshanbin, S., Ahmad, T., Schiöth, H. B., & Fredriksson, R. (2014). The G protein-coupled receptor GPR162 is widely distributed in the CNS and highly expressed in the hypothalamus and in hedonic feeding areas. *Gene*, *553*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.042>

Caruso, V., Sreedharan, S., Carlini, V. P., Jacobsson, J. A., Haitina, T., Hammer, J., Stephansson, O., Crona, F., Sommer, W. H., Risérus, U., Lannfelt, L., Marcus, C., Heilig, M., de Barioglio, S. R., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2016). mRNA GPR162 changes are associated with decreased food intake in rat, and its human genetic variants with impairments in glucose homeostasis in two Swedish cohorts. *Gene*, *581*(2), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.01.044>

Chen, M., Shrestha, Y. B., Podyma, B., Cui, Z., Naglieri, B., Sun, H., Ho, T., Wilson, E. A., Li, Y. Q., Gavrilova, O., & Weinstein, L. S. (2017). Gs α deficiency in the dorsomedial hypothalamus underlies obesity associated with Gs α mutations. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(2), 500–510. <https://doi.org/10.1172/JCI88622>

Chen, Y., Lin, Y.-C., Zimmerman, C. A., Essner, R. A., & Knight, Z. A. (2016). Hunger neurons drive feeding through a sustained, positive reinforcement signal. <https://doi.org/10.7554/eLife.18640.001>

Cooke, D., & Bloom, S. (2006). The obesity pipeline: Current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, *5*(11), 919–931. <https://doi.org/10.1038/nrd2136>

De Vallière, C., Wang, Y., Eloranta, J. J., Vidal, S., Clay, I., Spalinger, M. R., Tcymbarevich, I., Terhalle, A., Ludwig, M. G., Suply, T., Fried, M., Kullak-Ublick, G. A., Frey-Wagner, I., Scharl, M., Seuwen, K., Wagner, C. A., & Rogler, G. (2015). G protein-coupled pH-sensing receptor OGR1 is a regulator of intestinal

inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(6), 1269–1281. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000375>

Dragano, N. R. V., Solon, C., Ramalho, A. F., de Moura, R. F., Razolli, D. S., Christiansen, E., Azevedo, C., Ulven, T., & Velloso, L. A. (2017). Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0869-7>

Dvorak, C. A., Coate, H., Nepomuceno, D., Wennerholm, M., Kuei, C., Lord, B., Woody, D., Bonaventure, P., Liu, C., Lovenberg, T., & Carruthers, N. I. (2015). Identification and SAR of Glycine Benzamides as Potent Agonists for the GPR139 Receptor. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 6(9), 1015–1018. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00247>

Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology*, 63(6), 1256–1272. <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256>

Frick, K. K., Krieger, N. S., Nehrke, K., & Bushinsky, D. A. (2009). Metabolic acidosis increases intracellular calcium in bone cells through activation of the proton receptor OGR1. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(2), 305–313. <https://doi.org/10.1359/jbmr.081015>

Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., De Fonseca, F. R., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G., & Piomelli, D. (2003). Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature*, 425(6953), 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature01921>

Gacasan, S. B., Baker, D. L., & Parrill, A. L. (2017). G protein-coupled receptors: The evolution of structural insight. *AIMS Biophysics*, 4(3), 491–527. <https://doi.org/10.3934/BIOPHY.2017.3.491>

Grundmann, M., Bender, E., Schamberger, J., & Eitner, F. (2021). Pharmacology of free fatty acid receptors and their allosteric modulators. *International Journal of*

Molecular Sciences, 22(4), 1–38. <https://doi.org/10.3390/ijms22041763>

Hall, K. D., Ayuketah, A., Brychta, R., Cai, H., Cassimatis, T., Chen, K. Y., Chung, S. T., Costa, E., Courville, A., Darcey, V., Fletcher, L. A., Forde, C. G., Gharib, A. M., Guo, J., Howard, R., Joseph, P. V., McGehee, S., Ouwerkerk, R., Raising, K., ... Zhou, M. (2019). Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell Metabolism*, 30(1), 67-77.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.008>

Hall, K. D., & Guo, J. (2017). Obesity Energetics: Body Weight Regulation and the Effects of Diet Composition. *Gastroenterology*, 152(7), 1718-1727.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.052>

Hall, K. D., Heymsfield, S. B., Kemnitz, J. W., Klein, S., Schoeller, D. A., & Speakman, J. R. (2012). Energy balance and its components: Implications for body weight regulation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95(4), 989–994. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.036350>

Han, Y., Xia, G., & Wu, Q. (2018). Functional interrogation of the AgRP neural circuits in control of appetite, body weight, and behaviors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1090, 1–16. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1286-1_1

Hilger, D., Masureel, M., & Kobilka, B. K. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(1), 4–12. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7>

Hu, L. A., Tang, P. M., Eslahi, N. K., Zhou, T., Barbosa, J., & Liu, Q. (2009). Identification of surrogate agonists and antagonists for orphan g-protein-coupled receptor GPR139. *Journal of Biomolecular Screening*, 14(7), 789–797. <https://doi.org/10.1177/1087057109335744>

Husted, A. S., Trauelsen, M., Rudenko, O., Hjorth, S. A., & Schwartz, T. W. (2017). GPCR-Mediated Signaling of Metabolites. *Cell Metabolism*, 25(4), 777–796. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.008>

- Jennings, J. H., Ung, R. L., Resendez, S. L., Stamatakis, A. M., Taylor, J. G., Huang, J., Veleta, K., Katak, P. A., Aita, M., Shilling-Scriver, K., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., Otte, S., & Stuber, G. D. (2015). Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell*, *160*(3), 516–527. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.026>
- Kim, K. S., Seeley, R. J., & Sandoval, D. A. (2018). Signalling from the periphery to the brain that regulates energy homeostasis. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(4), 185–196. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.8>
- Krashes, M. J., Koda, S., Ye, C. P., Rogan, S. C., Adams, A. C., Cusher, D. S., Maratos-Flier, E., Roth, B. L., & Lowell, B. B. (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(4), 1424–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI46229>
- Krashes, M. J., Lowell, B. B., & Garfield, A. S. (2016). Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis. *Nature Neuroscience*, *19*(2), 206–219. <https://doi.org/10.1038/nn.4202>
- Krashes, M. J., Shah, B. P., Koda, S., & Lowell, B. B. (2013). Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. *Cell Metabolism*, *18*(4), 588–595. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.009>
- Krashes, M. J., Shah, B. P., Madara, J. C., Olson, D. P., Strohlic, D. E., Garfield, A. S., Vong, L., Pei, H., Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Liberles, S. D., & Lowell, B. B. (2014). An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature*, *507*(7491), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature12956>
- Liu, C., Bonaventure, P., Lee, G., Nepomuceno, D., Kuei, C., Wu, J., Li, Q., Joseph, V., Sutton, S. W., Eckert, W., Yao, X., Yieh, L., Dvorak, C., Carruthers, N., Coate, H., Yun, S., Dugovic, C., Harrington, A., & Lovenberg, T. W. (2015). GPR139, an orphan receptor highly enriched in the habenula and septum, is activated by the essential amino acids L-tryptophan and L-phenylalanine. *Molecular Pharmacology*, *88*(5), 911–925.

<https://doi.org/10.1124/mol.115.100412>

M. Christopher, A. M. L. S. (2016). The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications: HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *176*(1), 100–106. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0596>.

Matsuo, A., Matsumoto, S. I., Nagano, M., Masumoto, K. H., Takasaki, J., Matsumoto, M., Kobori, M., Katoh, M., & Shigeyoshi, Y. (2005). Molecular cloning and characterization of a novel Gq-coupled orphan receptor GPRg1 exclusively expressed in the central nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *331*(1), 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.174>

Mendes, N. F., Gaspar, J. M., Lima-Júnior, J. C., Donato, J., Velloso, L. A., & Araújo, E. P. (2018). TGF- β 1 down-regulation in the mediobasal hypothalamus attenuates hypothalamic inflammation and protects against diet-induced obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *85*, 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.04.005>

Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, *443*(7109), 289–295. <https://doi.org/10.1038/nature05026>

Moubarac, J.-C., Parra, D. C., Cannon, G., & Monteiro, C. A. (2014). Food Classification Systems Based on Food Processing: Significance and Implications for Policies and Actions: A Systematic Literature Review and Assessment. *Current Obesity Reports*, *3*(2), 256–272. <https://doi.org/10.1007/s13679-014-0092-0>

Moura-Assis, A., Nogueira, P. A. S., de-Lima-Junior, J. C., Simabuco, F. M., Gaspar, J. M., Donato, J., & Velloso, L. A. (2021). TLR4-interactor with leucine-rich repeats (TRIL) is involved in diet-induced hypothalamic inflammation. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97291-7>

Müller, T. D., Müller, A., Yi, C. X., Habegger, K. M., Meyer, C. W., Gaylinn, B. D., Finan, B., Heppner, K., Trivedi, C., Bielohuby, M., Abplanalp, W., Meyer, F., Piechowski, C. L., Pratzka, J., Stemmer, K., Holland, J., Hembree, J., Bhardwaj, N., Raver, C., ... Tschöp, M. H. (2013). The orphan receptor Gpr83 regulates

systemic energy metabolism via ghrelin-dependent and ghrelin-independent mechanisms. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2968>

Nauck, M. A. (2020). The rollercoaster history of using physiological and pharmacological properties of incretin hormones to develop diabetes medications with a convincing benefit-risk relationship. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 103, 154031. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.154031>

Nauck, M. A., Quast, D. R., Wefers, J., & Meier, J. J. (2021). GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes – state-of-the-art. *Molecular Metabolism*, 46(October 2020), 101102. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101102>

Nectow, A. R., & Nestler, E. J. (2020). Viral tools for neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(12), 669–681. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-00382-z>

Okajima, F. (2013). Regulation of inflammation by extracellular acidification and proton-sensing GPCRs. *Cellular Signalling*, 25(11), 2263–2271. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.07.022>

Poti, J. M., Braga, B., Quin, B., & Qin, B. (2018). Ultra-processed food intake and obesity: What really matters for health – processing or nutrient content? *Current Obesity Reports*, 6(4), 420–431. <https://doi.org/10.1007/s13679-017-0285-4>. Ultra-processed

Razolli, D. S., De Araújo, T. M., Sant’Ana, M. R., Kirwan, P., Cintra, D. E., Merkle, F. T., & Velloso, L. A. (2020). Proopiomelanocortin Processing in the Hypothalamus Is Directly Regulated by Saturated Fat: Implications for the Development of Obesity. *Neuroendocrinology*, 110(1–2), 92–104. <https://doi.org/10.1159/000501023>

Ruth, M. R. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *Yearbook of Endocrinology*, 2012(1), 119–120. <https://doi.org/10.1016/j.yend.2012.04.031>

Schneider, J. W., Goetsch, S. C., Leng, X., Ludwig, S. M., Russell, J. L., Yang, C.

P., & Zhang, Q. J. (2012). Coupling hippocampal neurogenesis to brain pH through proneurogenic small molecules that regulate proton sensing G protein-coupled receptors. *ACS Chemical Neuroscience*, 3(7), 557–568. <https://doi.org/10.1021/cn300025a>

Srivastava, G., & Apovian, C. M. (2018). Current pharmacotherapy for obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(1), 12–24. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.122>

Sternson, S. M., & Atasoy, D. (2014). Agouti-related protein neuron circuits that regulate appetite. *Neuroendocrinology*, 100, 95–102. <https://doi.org/10.1159/000369072>

Stratford, T. R., & Wirtshafter, D. (2013). Injections of muscimol into the paraventricular thalamic nucleus, but not mediodorsal thalamic nuclei, induce feeding in rats. *Brain Research*, 1490, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.10.043>

Süsens, U., Hermans-Borgmeyer, I., Urny, J., & Schaller, H. C. (2006). Characterisation and differential expression of two very closely related G-protein-coupled receptors, GPR139 and GPR142, in mouse tissue and during mouse development. *Neuropharmacology*, 50(4), 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.11.003>

Sveidahl Johansen, O., Ma, T., Hansen, J. B., Markussen, L. K., Schreiber, R., Reverte-Salisa, L., Dong, H., Christensen, D. P., Sun, W., Gnad, T., Karavaeva, I., Nielsen, T. S., Kooijman, S., Cero, C., Dmytriyeva, O., Shen, Y., Razzoli, M., O'Brien, S. L., Kuipers, E. N., ... Gerhart-Hines, Z. (2021). Lipolysis drives expression of the constitutively active receptor GPR3 to induce adipose thermogenesis. *Cell*, 184(13), 3502-3518.e33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.037>

Tong, Q., Ye, C. P., Jones, J. E., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2008). Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature Neuroscience*, 11(9), 998–1000. <https://doi.org/10.1038/nn.2167>

Tse, L. H., & Wong, Y. H. (2019). GPCRs in autocrine and paracrine regulations.

Frontiers in Endocrinology, 10(JULY), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00428>

Van de Sande-Lee, S., & Velloso, L. A. (2012). Disfunção hipotalâmica na obesidade TT - Hypothalamic dysfunction in obesity. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 56(6), 341–350.

Wagner, F., Bernard, R., Derst, C., French, L., & Veh, R. W. (2016). Microarray analysis of transcripts with elevated expressions in the rat medial or lateral habenula suggest fast GABAergic excitation in the medial habenula and habenular involvement in the regulation of feeding and energy balance. *Brain Structure and Function*, 221(9), 4663–4689. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1195-z>

Wang, L., Lee, G., Kuei, C., Yao, X., Harrington, A., Bonaventure, P., Lovenberg, T. W., & Liu, C. (2019). GPR139 and Dopamine D2 Receptor Co-express in the Same Cells of the Brain and May Functionally Interact. *Frontiers in Neuroscience*, 13(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00281>

Waterson, M. J., & Horvath, T. L. (2015). Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metabolism*, 22(6), 962–970. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.026>

Wiley, S. Z., Sriram, K., Salmerón, C., & Insel, P. A. (2019). GPR68: An emerging drug target in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030559>

Xu, Y., & Casey, G. (1996). Identification of human OGR1, a novel G protein-coupled receptor that maps to chromosome 14. *Genomics*, 35(2), 397–402. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0377>

Yuan, F. L., Zhao, M. D., Jiang, L. B., Wang, H. R., Cao, L., Zhou, X. G., Li, X. L., & Dong, J. (2014). Molecular actions of ovarian cancer g protein-coupled receptor 1 caused by extracellular acidification in bone. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22365–22373. <https://doi.org/10.3390/ijms151222365>

Zhang, K. X., D'Souza, S., Upton, B. A., Kernodle, S., Vemaraju, S., Nayak, G., Gaitonde, K. D., Holt, A. L., Linne, C. D., Smith, A. N., Petts, N. T., Batie, M.,

Mukherjee, R., Tiwari, D., Buhr, E. D., Van Gelder, R. N., Gross, C., Sweeney, A., Sanchez-Gurmaches, J., ... Lang, R. A. (2020). Violet-light suppression of thermogenesis by opsin 5 hypothalamic neurons. *Nature*, 585(7825), 420–425. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2683-0>

ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **IDENTIFICAÇÃO DE GPCRs ENVOLVIDOS NO DESEQUILÍBRIO DO SISTEMA MELANOCORTINA EM RESPOSTA À ACIDOS GRAXOS SATURADOS**, registrada com o nº **4927-1/2018**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Lício Augusto Velloso e Pedro Augusto Silva Nogueira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **13 de agosto de 2018**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/07/2018-01/12/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	13/08/2018-01/12/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	340
Idade/Peso:	04 semanas / 20g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Sinalização Celular, NMCE, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 13 de agosto de 2018.

Prof. Dr. Wagner José Favaro
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **EFEITOS DOS AGONISTAS SELETIVOS DE GPCRs 68 E 139 NO SISTEMA MELANOCORTINA HIPOTALÂMICO DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS**, registrada com o nº **5717-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Licio Augusto Velloso e Pedro Augusto Silva Nogueira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **18/03/2021**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/05/2021 a 11/11/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/03/2021 a 11/11/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / c57BL/6Junib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / c57BL/6Junib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / c57BL/6Junib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / c57BL/6Junib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / c57BL/6Junib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / c57BL/6Junib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 20.00 Gramas

EXTRATO PRÉVIO Nº 7526/2021

A Coordenação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05; do Artigo 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05 e do Artigo 5º, inciso IV da Resolução Normativa Nº 1, de 20 de Junho de 2006 e Portaria Nº 4128/2020/SEI-MCTI de 30 de novembro de 2020, torna público que encontra-se em análise o processo a seguir discriminado:

Processo SEI nº: 01245.003524/2021-85

Requerente: Instituto de Biologia- IB/ UNICAMP

CQB: 069/98

Assunto: Solicitação de parecer para projeto de pesquisa.

Ementa: O Presidente da Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Biologia- IB/ UNICAMP, Dr. José Luiz Proença Módena, solicita emissão de parecer técnico para o projeto de pesquisa denominado: "Identificação de GPCRs envolvidos no desequilíbrio do sistema melanocortina em resposta à ácidos graxos saturados" a ser executado em instalações credenciadas no CQB da instituição. O processo será analisado de acordo com as normativas legais vigentes e um parecer deverá ser emitido.

A CTNBio esclarece que este extrato prévio não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

A CTNBio informa que o público terá trinta dias para se manifestar sobre o presente pleito, a partir da data de sua publicação, exceto se o regime de urgência for aplicado a este processo. Informações complementares ou solicitações de maiores informações sobre o processo acima listado deverão ser encaminhadas via FALABR, através do link <https://www.gov.br/acessoainformacao/pt-br>

RUBENS JOSÉ DO NASCIMENTO

Coordenador da CTNBio

Substituto