

**PAPEL DA SUBUNIDADE ALFA 7 DO RECEPTOR NICOTÍNICO COLINÉRGICO  
( $\alpha 7nAChR$ ) HIPOTALÂMICO NA MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE  
ENERGÉTICA EM CAMUNDONGOS**

Marco Antônio Fischetti Ferreira<sup>1</sup>, Wenícios Ferreira Chaves<sup>2</sup>, Suleyma de Oliveira Costa<sup>2</sup>,  
Priscilla Karla Fernandes Lopes<sup>2</sup>, Marcio Alberto Torsoni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Nutrição, Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, Limeira - SP;

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, UNICAMP, Limeira - SP.

**INTRODUÇÃO**

A subunidade alfa 7 do receptor nicotínico colinérgico ( $\alpha 7nAChR$ ) é expressa em diferentes tipos celulares do sistema nervoso central (microglia e neurônios) e em diferentes regiões do cérebro. No hipotálamo, sua ativação ou inibição farmacológica, por exemplo, pode modular a expressão de neuropeptídeos relacionados a homeostase energética, como a pró-opiomelanocortina (POMC). Esse último, quando clivado, origina o hormônio estimulante de alfa-melanócitos ( $\alpha MSH$ ) que promove a redução da ingestão alimentar e, concomitantemente, favorece o gasto energético por modular a atividade dos tecidos periféricos, que também estão relacionados com o controle glicêmico. Adicionalmente, a leptina é uma adipocina secretada na periferia por meio dos adipócitos, contudo, sua ação central está envolvida na resposta anorexígena por neurônios POMC. Nesse sentido, a subunidade  $\alpha 7nAChR$ , assim como a leptina, age através da via de sinalização JAK2/STAT3, indicando uma relação entre si. Assim, o presente estudo se justificou pela necessidade de entender como o  $\alpha 7nAChR$  expresso em neurônios hipotalâmicos POMC podem modular a homeostase energética, através de modelos experimentais robustos.

**OBJETIVOS:**

Avaliar o papel da subunidade  $\alpha 7nAChR$  em neurônios POMC hipotalâmicos na manutenção da homeostase energética em camundongos.

### Objetivos específicos:

#### Na 4<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de vida investigar:

- A evolução do peso corporal semanalmente;
- A ingestão alimentar e o gasto energético por respirometria;
- A expressão gênica de neuropeptídeos hipotalâmicos (NPY, AgRP e POMC) após desafio de jejum;

#### Na 8<sup>a</sup> semana de vida:

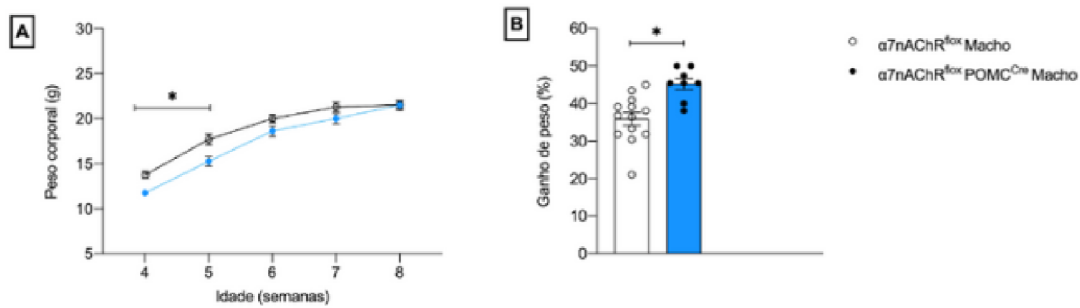
- A resposta hipotalâmica ao estímulo com leptina via intraperitoneal.

### Materiais e Métodos

Portanto, foram utilizados camundongos machos que apresentaram ou não a deleção da subunidade  $\alpha 7nAChR$  em neurônios POMC, obtidos através do sistema de recombinação *Cre-Lox*. Esse método permite a edição genética sítio-específica em animais, sendo confirmadas através de genotipagem. Na 4<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> semanas de vida foram aferidos o gasto energético, expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos e resposta à leptina intraperitoneal. O peso corporal dos animais será acompanhado semanalmente. Para mensurar o gasto energético dos animais será utilizada a calorimetria indireta em respirômetro *Oxymax-CLAMS* (Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA) durante 24h. Enquanto, a expressão gênica dos neuropeptídeos (POMC, NPY e AgRP) e resposta à leptina (pSTAT3), sendo determinadas através de RT-qPCR e *westernblotting*, respectivamente. Os experimentos foram previamente aprovados pelo CEUA, sob registro nº 5553-1/2020.

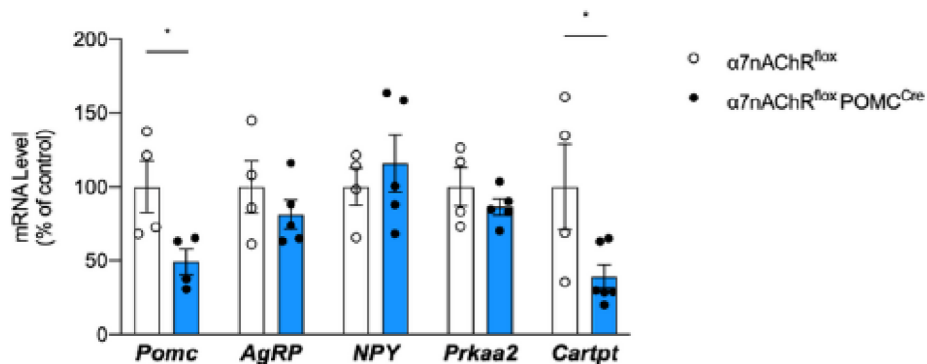
### Resultados

Em relação ao peso corporal, os animais do grupo  $\alpha 7nAChR^{fllox}POMC^{cre}$  (*Knockout*) apresentaram redução no peso corporal na 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semana de vida (**Fig. 1A**), equiparado ao controle a partir da 6<sup>a</sup> semana de vida. Contudo, tiveram maior ganho de peso corporal se comparado ao grupo controle (**Fig. 1B**).



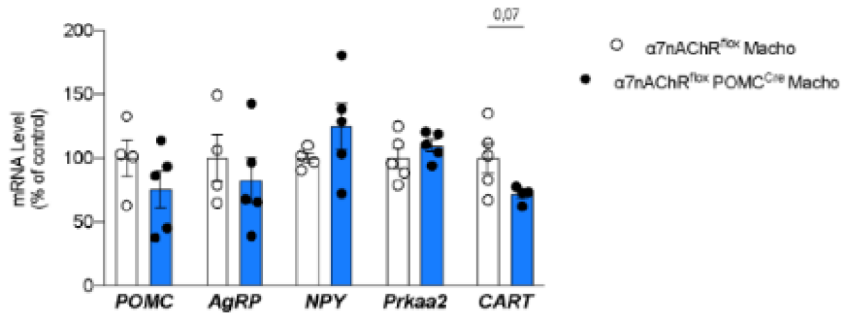
**Fig 1. Evolução e ganho de peso corporal de camundongos.** O peso corporal (1A) foi avaliado semanalmente da 4<sup>o</sup> a 8<sup>o</sup> semana de vida (n= 8 - 13). O ganho de peso corporal (2A) foi determinado por meio da equação (Ganho de peso = [Peso final - Peso inicial]/ peso final x 100) ao final da 8<sup>o</sup> semana. Foi aplicado o teste T de student não pareado para a comparação entre grupos. O nível de significância foi mantido em  $p < 0,05$ .

Durante a 4<sup>o</sup> semana de vida dos animais, houve uma redução na expressão dos neuropeptídeos *Pomc* e *Cartpt* nos animais do grupo *knockout* em comparação ao controle. Essa redução nos neuropeptídeos anorexígenos pode se relacionar com o aumento do ganho de peso observado na figura anterior, em consequência ao balanço energético positivo.



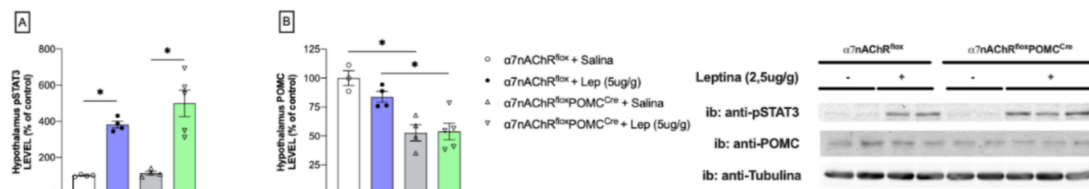
**Fig 2. Expressão gênica de neuropeptídeos no hipotálamo na 4<sup>a</sup> semana de vida.** Os animais expostos à dieta controle foram eutanasiados em jejum e a expressão gênica foi determinada através de RT-qPCR (n= 4-5). A quantidade de mRNA foi normalizada através do GAPDH. Teste t de student não pareado foi utilizado para comparação entre grupos. O nível de significância foi mantido em  $p < 0,05$ .

Assim como observado anteriormente, os animais *knockout* apresentaram uma redução na expressão do neuropeptídeo anorexígeno *Cartpt* no hipotálamo, na 8<sup>o</sup> semana de vida (Fig. 3).



**Fig 3. Expressão gênica de neuropeptídeos no hipotálamo na 8ª semana de vida.** Os animais expostos à dieta controle foram eutanasiados em jejum e a expressão gênica foi determinada através de RT-qPCR (n= 4-5). A quantidade de mRNA foi normalizada através do GAPDH. Teste t de student não pareado foi utilizado para comparação entre grupos. O nível de significância foi mantido em  $p < 0,05$ .

Nas análises de *Western Blotting*, percebe-se que o estímulo de leptina por via intraperitoneal promoveu a fosforilação de STAT3 (**Fig. 4A**). Apesar disso, a deleção causou uma redução da acetilação de STAT3 (dado não apresentado), e um menor conteúdo proteico do POMC (**Fig. 4B**). Assim, a deleção da subunidade alfa 7 em neurônios POMC traz prejuízos na manutenção do balanço energético, independente do estímulo da leptina.



**Figura 4. Resposta hipotalâmica dos animais submetidos ao estímulo intraperitoneal com leptina.** Os animais foram mantidos em jejum prévio de 12 horas e posteriormente estimulados com leptina (2,5 ug/g de peso) por via intraperitoneal. Os animais foram eutanasiados 30 min após o estímulo, tendo retirado o hipotálamo. Foram avaliadas a expressão proteica de pSTAT3 e POMC, sendo normalizadas pela tubulina. ANOVA two-way com ou sem pós teste de Bonferroni foi aplicada para comparação entre grupos. \* $p < 0,05$

O experimento de respirometria já foi realizado, porém os dados estão em análise para compor o relatório final desta proposta.

### Conclusão

Diante do exposto, concluímos que a deleção desta subunidade alfa 7 nos neurônios POMC presentes no hipotálamo, afetou o balanço energético dos animais. Pois, houve maior ganho de peso corporal nos animais *knockout*, sendo relacionado com a menor expressão gênica dos neuropeptídeos anorexígenos, assim como o conteúdo proteico de POMC. Contudo, a deleção parece não comprometer a resposta anorexígena da leptina.