

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Alexandre Guimarães de Almeida Barros

**Regulação da homeostase energética pelo sistema dopaminérgico no modelo
*Caenorhabditis elegans***

Belo Horizonte

2010

Alexandre Guimarães de Almeida Barros

**Regulação da homeostase energética pelo sistema dopaminérgico no modelo
*Caenorhabditis elegans***

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina;
área de concentração: Medicina Molecular.**

Orientador: Marco Aurélio Romano-Silva

**Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina**

Belo Horizonte – 2010

Aos meus pais,
José Luiz e Maria de Lourdes.

Agradecimentos

Somos capazes de feitos que vão desde a desintegração do átomo até o lançamento de objetos tripulados ao espaço. Movida pela inquietação da alma, a ciência imita o sonho e redefine os limites do corpo. O conhecimento nos deixa mais próximos da fronteira infinita da imaginação, entretanto, compreendê-lo explicita nossa condição.

Agradeço a todos aqueles que me mostraram, de uma forma ou de outra, que o homem continua humano, com seus vícios e virtudes. Sou grato, em especial, aos meus pais, fonte inesgotável de amor, a Luzia e a Elza, sempre presentes, e aos mestres, Marco e Kaveh, por iluminarem os caminhos para ser um cientista.

Começo e fim, somos assim.

“Science is a way of thinking much more than it is a body of knowledge.”

Carl Sagan

Resumo

A regulação da homeostase energética, refletida no conteúdo de gordura, envolve uma complexa integração, por circuitos neuronais, de informações internas e externas sobre a demanda energética e a disponibilidade de alimentos. Evidências sugerem o neurotransmissor dopamina como importante componente na regulação do peso corporal. No geral, o sistema dopaminérgico tem sido associado a alterações no comportamento de busca pelo alimento e integração dos fatores relacionados à saciedade. Entretanto, lacunas ainda existem sobre os mecanismos através dos quais a dopamina regula a homeostase energética. Este trabalho mostrou que a sinalização dopaminérgica regula as reservas lipídicas no verme *Caenorhabditis elegans*. As análises revelaram que a regulação não é secundária a modificações no comportamento alimentar, movimento ou reprodução. Observou-se que o efeito de redução da reserva energética induzida pela dopamina foi dependente dos receptores dopaminérgicos e de algumas enzimas catalisadoras da oxidação lipídica. Em congruência com este fato, verificou-se que a dopamina aumenta o fluxo através das vias de oxidação lipídica. Os achados indicam uma função primária do sistema dopaminérgico na regulação do conteúdo lipídico, sugerindo que a dopamina ativa cascatas de sinalização que, no final, mobilizam os estoques periféricos de gordura.

Palavras-chave: dopamina, metabolismo, *Caenorhabditis elegans*, sistema dopaminérgico, homeostase energética.

Abstract

The regulation of energy balance, as reflected in fat content, involves an intricate interplay between neural mechanisms that respond to internal and external cues of energy demand and food availability. Compelling data have implicated the neurotransmitter dopamine as an important component of body weight regulation. Overall, the dopaminergic system has been linked to alteration in food seeking and satiety behaviors. However, the precise mechanisms through which dopamine regulates energy homeostasis remain poorly understood. Here, we show that dopamine signaling regulates fat reservoirs in *Caenorhabditis elegans*. Our analyses revealed that the metabolic modulation could not be accounted for by changes in animal feeding behavior, movement or reproductive rate. Instead, we found that the fat reducing effects of dopamine were dependent on dopaminergic receptors and a set of fat oxidation enzymes. Accordingly, we show that excess dopamine signaling causes increased rates of fat oxidation. Together, our findings reveal an ancient role for dopaminergic regulation of fat and suggest that dopamine signaling elicits this outcome through cascades that, ultimately, mobilizes peripheral fat storage depots.

Keywords: dopamine, metabolism, *Caenorhabditis elegans*, dopaminergic system, energetic homeostasis.

Lista de figuras

Figura 1 – Riscos relativos de morte por doença cardiovascular, câncer e outras causas relacionados com o índice de massa corporal.

Figura 2 – Mecanismo proposto para manutenção da homeostase energética.

Figura 3 – Efeito da administração de leptina em paciente com deficiência do hormônio.

Figura 4 – Diagrama mostrando a multiplicidade de sinais integrados pelo SNC.

Figura 5 – Representação de parte da circuitaria neuronal do sistema integrador de manutenção da homeostase energética no SNC.

Figura 6 – Os receptores dopaminérgicos e as vias de transdução de sinal.

Figura 7 – O verme *Caenorhabditis elegans*.

Figura 8 – Exposição à dopamina exógena reduz o conteúdo lipídico nos animais selvagens.

Figura 9 – A redução da gordura induzida pela dopamina é independente do estágio larval e condição de cultivo.

Figura 10 – A redução lipídica induzida pela dopamina requer a continua exposição ao neurotransmissor.

Figura 11 – A dopamina reduz a quantidade de triglicérides no verme selvagem.

Figura 12 – O efeito dopamina na homeostase energética depende dos receptores dopaminérgicos.

Figura 13 – Marcação com o corante *Sudan Black* dos mutantes com perda de função para os receptores dopaminérgicos DOP-1 e DOP-3.

Figura 14 – A redução lipídica induzida pela dopamina não é secundária a outros comportamentais.

Figura 15 – A redução dos estoques energéticos induzida pela dopamina depende da oxidação lipídica.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Classificação da obesidade baseada no Índice de Massa Corporal.

Tabela 2 – Cepas mutantes utilizadas.

Tabela 3 – Relação dos clones utilizados para o *screen* metabólico dopaminérgico

Lista de abreviaturas

α , β , γ -MSH (db/db) (ob/ob)	α , β , γ -Hormônio estimulador de melanócito “diabetic/diabetic” “obese/obese”
AADC	Decarboxilase de aminoácido aromático
AgRP	Proteína relacionada à agouti
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ATP	Trifosfato de adenosina
ATV	Área Tegmentar Ventral
BAR	Busca em Área Restrita
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	Albumina do soro bovino
BSR	“Basal Slowing Response”
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CATIE	“Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness”
CCK	Colecistocinina
CGC	“Caerhabbitis Genetic Center”
CHAPS	“3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate”
D1R	Receptor de dopamina D1
D2R	Receptor de dopamina D2
D3R	Receptor de dopamina D3
D4R	Receptor de dopamina D4
D5R	Receptor de dopamina D5
DAT	Transportador de dopamina
DIC	“Differential Interference Contrast”
DTT	“Dithiothreitol”
EDTA	“Ethylenediaminetetraacetic acid”
EGTA	“Ethylene-bis(oxyethylenenitrilo)tetraacetic acid”
EPM	Erro Padrão da Média
ESR	“Enhanced Slowing Response”
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFP	“Green Fluorescent Protein”
G _i	Proteína G da classe i
G _q	Proteína G da classe q
G _s	Proteína G da classe s
GTP	Trifosfato de guanosina
G _{αs}	Subunidade α da Proteína G da classe s
H ₂ O _{dd}	Água Destilada Deionizada

HEPES	<i>"4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid"</i>
ICV	Intracérebro-Ventricular
IMC	Índice de Massa Corporal
IPTG	<i>"Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside"</i>
KD	<i>"Knockdown"</i>
KO	<i>"Knockout"</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LHA	Área Hipotalâmica Lateral
MC3	Receptor de Melanocortina do tipo 3
MC4	Receptor de Melanocortina do tipo 4
MCH	Hormônio Concentrador de Melanina
NDM	Núcleo Dorso-medial
NHR	Receptor de Hormônio Nuclear
NPY	Neuropeptídeo Y
NSQ	Núcleo Supra-quiasmático
NVM	Núcleo Ventro-medial
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PIPES	<i>"1,4-Piperazinediethanesulfonic acid"</i>
PKA	Proteína quinase A
PLC-β	Fosfolipase C beta
POMC	Proopiomelanocortina
PTP1B	Fosfotirosina fosfatase 1B
PYY	Peptídeo YY
SN	Substância nigra
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS-3	Supressor da sinalização da citocina 3
SREBP	Proteína de ligação no elemento regulatório do esteroide
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TAG	Triglicérides
TCEP	<i>"tris(2-carboxyethyl)phosphine"</i>
TGF-β	Fator de crescimento tumoral beta
TGI	Trato Gastrointestinal
TH	Tirosina hidroxilase
TLC	Cromatografia de camada fina
TOR	Alvo da Rapamicina
TPH-1	Triptofano hidroxilase 1
TrkB	Receptor tirosina quinase B
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

Sumário

1	Introdução	14
1.1	Obesidade	14
1.1.1	Definição de obesidade	14
1.1.2	Prevalência	16
1.2	Homeostase energética e sua regulação	17
1.2.1	Regulação da homeostase energética: um processo ativo	18
1.2.2	Genética da homeostase energética	19
1.2.3	Sistema integrado de manutenção da homeostase energética	19
1.2.4	Sistema nervoso central: o maestro da homeostase energética	20
1.2.5	Sinais carreadores das informações metabólicas	21
1.2.6	Transdução e integração das informações metabólicas pelo SNC	27
1.3	Sistema dopaminérgico	35
1.3.1	Anatomia e fisiologia do sistema dopaminérgico nos mamíferos	36
1.3.2	Dopamina e a homeostase energética.....	39
1.3.3	Homeostase energética nos camundongos KO para a enzima tirosina hidroxilase	40
1.3.4	Neurônios dopaminérgicos monitoram o estado metabólico	42
1.3.5	Envolvimento do sistema dopaminérgico na recompensa e suas implicações para a homeostase energética.....	45
1.3.6	Receptores dopaminérgicos e a homeostase energética	47
1.3.7	Esquizofrenia, antipsicóticos e homeostase energética	49
1.3.8	A questão sobre a dopamina e o metabolismo.....	51
1.4	O modelo <i>Caenorhabditis elegans</i>	52
1.4.1	O sistema dopaminérgico no verme	54
1.4.1.1	Anatomia, síntese, armazenamento e recaptção.....	55
1.4.1.2	Comportamentos que envolvem o sistema dopaminérgico do verme	57
1.4.1.3	Receptores dopaminérgicos no verme.....	61
1.4.2	O verme: modelo para estudo do metabolismo	67
1.4.2.1	Composição lipídica.....	68
1.4.2.2	Síntese, degradação, absorção intestinal e transporte de ácidos graxos	68

1.4.2.3 Controle neuroendócrino e sensores do metabolismo.....	70
2 Objetivo	73
2.1 Objetivo geral	73
2.2 Objetivos específicos.....	73
3 Métodos.....	74
3.1 Manutenção e cultura do verme <i>C. elegans</i>	74
3.2 Tratamento com dopamina exógena.....	76
3.3 Ensaio de batimento faríngeo	77
3.4 Ensaio de movimento	77
3.5 Ensaio de defecação	78
3.6 Ensaio de reprodução.....	78
3.7 Marcação lipídica com corantes vitais e aquisição das imagens	79
3.8 Marcação de vermes fixados pelo Sudan Black.....	79
3.9 <i>Knockdown</i> por alimentação com RNA de interferência (RNAi).....	80
3.10 Extração lipídica e medição de triglicérides através de cromatografia de camada fina (TLC).....	81
3.11 Ensaio da velocidade de oxidação lipídica	83
3.12 Programas utilizados para análise de imagens e estatística	84
4 Resultados e discussão.....	85
4.1 Exposição crônica à dopamina exógena causa redução dos triglicérides no verme <i>C. elegans</i>	85
4.2 A síntese de dopamina regula o perfil lipídico no <i>C. elegans</i>	96
4.3 Receptores dopaminérgicos regulam os níveis de gordura no <i>C. elegans</i>	98
4.4 A redução do conteúdo lipídico pela dopamina exógena é dependente dos receptores dopaminérgicos	101
4.5 O efeito de redução lipídica pela dopamina não pode ser atribuído à alterações no comportamento.....	102
4.6 A dopamina causa redução dos estoques energéticos através do aumento da oxidação lipídica.....	105
4.7 Discussão final.....	108
5 Conclusão	112
6 Referências.....	114
Apêndice A	150

1 Introdução

1.1 Obesidade

A habilidade de estocar o excesso energético é essencial para a sobrevivência em ambiente onde a alimentação é intermitente. Os adipócitos são células adaptadas para armazenar o excesso calórico como triglicérides, liberando-os para uso em outros tecidos e órgãos quando necessário. O funcionamento do sistema é orquestrado por circuitos neuronais e eixos endócrinos, permitindo a sobrevivência por meses sem a ingestão de alimentos. Entretanto, a abundância atual de alimentos com alto valor energético, associada a hábitos de vida sedentários e influenciados, ainda, pela carga genética, torna distorcida a função do sistema de conservação de energia, resultando no acúmulo calórico excessivo, com consequências adversas para a saúde.

1.1.1 Definição de obesidade

Define-se obesidade como o aumento prejudicial da quantidade de gordura corporal. Entretanto, considerando-se que a adiposidade é uma medida de distribuição contínua com medição direta complexa, pode-se defini-la como excesso de peso corporal e não de gordura. Mesmo sendo arbitrária e imperfeita, esta definição distingue estado metabólico associado ao aumento da morbidade e mortalidade de várias doenças. Diabetes melito do tipo 2, doenças cardiovasculares, dislipidemias, resistência

à insulina, neoplasias e a mortalidade geral são exemplos de condições influenciadas pelo excesso de peso (Figura 1) (Ogden *et al.*, 2007).

O índice de massa corporal ($\text{IMC} = \text{peso (Kg)} / \text{altura}^2 \text{ (m)}$) é o método mais adotado para a expressão do peso corporal. Baseado em estudos epidemiológicos, determinou-se que IMC acima de 30 aumenta consideravelmente a morbidade e mortalidade associadas à várias condições, sendo este valor considerado o parâmetro antropológico para o diagnóstico de obesidade em ambos os sexos. Outros estudos mostraram que o aumento na morbidade e mortalidade já ocorre nos valores do IMC acima de 25, sugerindo que este ponto deve ser considerado. Atualmente, baseado nos valores do IMC, o peso corporal é agrupado da seguinte forma: $< 18.5 \text{ kg/m}^2$ baixo peso, entre 18.5 e 24.9 kg/m^2 peso normal, entre 25 e 29.9 kg/m^2 sobrepeso, $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ obesidade (Tabela 1) (Figura 1).

Valor do IMC	Classificação
Menor que 18,5	Baixo peso
18,5 a 24,99	Normal
25 a 29,99	Sobrepeso
Maior que 30	Obesidade

Tabela 1 – Classificação da obesidade baseada no Índice de Massa Corporal.

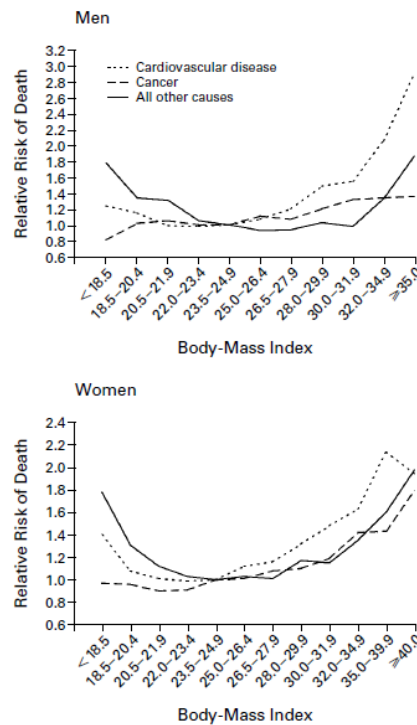


Figura 1 – Riscos relativos de morte por doença cardiovascular, câncer e outras causas relacionados com o índice de massa corporal.

Riscos relativos de morte por (···) doença cardiovascular, (--) câncer e (—) outras causas plotados contra o índice de massa corporal em ambos os sexos. Adaptado de Calle *et al.*, 1999.

1.1.2 Prevalência

O aumento na prevalência da obesidade é uma tendência da população mundial (Flier, 2004). Especificamente nos adultos americanos, mostrou-se o aumento na prevalência de sobrepeso e obesidade de 13% para 33% nos últimos 20 anos (Ogden *et al.*, 2006; Flegal *et al.*, 2002). Neste período, a análise da curva global de distribuição do IMC mostra achatamento associado a um deslocamento para a direita, o que indica aumento do peso corporal em todas as camadas da população (Ogden *et al.*, 2006;

Flegal *et al.*, 2002; Ogden *et al.*, 2007). A prevalência da obesidade difere entre as diversas etnias e sexo. Por exemplo, afrodescendentes, nativos americanos e mulheres têm maior tendência de aumento no IMC (Ogden *et al.*, 2006; Flegal *et al.*, 2002; Ogden *et al.*, 2007). Este fenômeno é observado em outros países do mundo, apesar da velocidade de ocorrência maior nos países desenvolvidos (Ogden *et al.*, 2007; James, 2008).

1.2 Homeostase energética e sua regulação

Independentemente das variações diárias entre a quantidade de energia ingerida e gasta pelo organismo, um balanço preciso iguala a quantidade de energia adquirida do ambiente, através da alimentação, com a utilizada para manutenção das necessidades fisiológicas essenciais e voluntárias. Este fenômeno é reflexo de um processo regulatório ativo, denominado homeostase energética (Schwartz *et al.*, 2000; Morton *et al.*, 2006). Através deste processo, a ingestão e o gasto calórico são balanceados e o estoque energético corporal mantido praticamente inalterado. A hiperfagia posterior a período de jejum ou a recuperação do peso perdido, voluntariamente ou não, para os níveis prévios são exemplos de como o processo regulatório é eficaz e robusto (Schwartz *et al.*, 2000; Morton *et al.*, 2006).

1.2.1 Regulação da homeostase energética: um processo ativo

Alterações do peso ocorrem em consequência da ingestão calórica superior ou inferior àquela requerida pelo organismo. Entretanto, adaptações fisiológicas às alterações do peso são robustas. O organismo é protegido contra a expansão ou redução do peso corporal causadas, por exemplo, por excessos alimentares ou doença, indicando que mecanismos adaptativos operam tanto para limitar o ganho como a perda de peso (Morton et al., 2006).

A avaliação do metabolismo energético em indivíduos obesos e magros revelou que a perda ou ganho de peso voluntários resultam em alterações compensatórias similares. Observou-se que o aumento ou redução em 10 % do peso original é acompanhado de 16 % de aumento ou 15 % de redução, respectivamente, no gasto energético total de 24 horas durante todo o período de manutenção voluntária do novo peso (Leibel et al., 1995). Não foram observadas alterações compensatórias no gasto energético quando a perda foi superior a 10% do peso original, o que sugere limite na atuação dos mecanismos adaptativos (Leibel et al., 1995). Sugere-se que o aumento ou redução do peso corporal desencadeiam modificações adaptativas no gasto calórico, através da modulação do gasto energético basal ou ativo, objetivando trazer o estoque energético corporal para o nível anterior (Leibel et al., 1995). O fato da resposta adaptativa ser semelhante em indivíduos obesos ou magros, sugere sistema regulatório único atuando para manter a composição corporal.

Resumindo, alterações substanciais no peso resultam em estado metabólico anormal, que é detectado por mecanismos regulatórios responsáveis pela manutenção da homeostase energética. As respostas à variação do peso envolvem mudanças no comportamento alimentar e motor e no gasto energético basal. Isto é consistente com um sistema integrado de manutenção do estoque energético corporal (Leibel, 2008; Berthoud, 2002).

1.2.2 Genética da homeostase energética

Embora alterações ambientais, como mudanças no padrão dietético e de atividade física, tenham contribuído peremptoriamente para o aumento na prevalência do ganho de peso, é importante considerar a hereditariedade deste fenômeno (Barsh *et al.*, 2000; Farooqi e O'Rahilly, 2008; Rankinen e Bouchard, 2006). A contribuição genética nos distúrbios do peso foi estabelecida através de análises familiares, estudos com gêmeos e crianças adotadas e análises populacionais. Acredita-se que a carga genética contribua entre 50% e 90% para o fenótipo (Barsh *et al.*, 2000; Farooqi e O'Rahilly, 2008; Rankinen e Bouchard, 2006).

Análise de síndromes raras, caracterizadas por obesidade extrema, elucidou a participação de várias moléculas no controle da homeostase energética. Alguns exemplos são o hormônio leptina e seu receptor, o sistema das melanocortinas e a via de sinalização do fator neurotrófico cerebral (do inglês "*Brain-derived Neurotrophic Factor*" (BDNF)). Alterações genéticas brandas nestes e em outros genes foram ligadas ao quadro poligênico da obesidade comum (Barsh *et al.*, 2000; Farooqi e O'Rahilly, 2008; Rankinen e Bouchard, 2006). Conclui-se que as abordagens genéticas são importantes no entendimento da patogênese do ganho de peso.

1.2.3 Sistema integrado de manutenção da homeostase energética

A multiplicidade de sinais redundantes carreando informações metabólicas e a natureza dinâmica da oferta e demanda de energia sugerem a existência de sistema integrador, responsável pela coordenação das respostas para manutenção do balanço energético. O "*set point*" metabólico do sistema é influenciado por fatores genéticos,

ambientais, do desenvolvimento, do ritmo circadiano e circanual, do ciclo de vida e lactação, indicando ampla flexibilidade do mesmo (Leibel, 2008; Berthoud, 2002). A disfunção do sistema de integração pode ocorrer como resultado de anormalidades em vários dos seus componentes ou mesmo devido à alteração do próprio “*set point*” metabólico (Leibel, 2008).

Estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças como anorexia ou obesidade, que envolvam mudanças na ingestão calórica ou no gasto energético, desencadeiam respostas compensatórias coordenadas pelo sistema integrativo. Isto explica a recidiva da obesidade em aproximadamente 95% dos pacientes obesos que emagreceram voluntariamente com sucesso por curto período de tempo (Wing e Phelan, 2005; Leibel, 2008). Entretanto, a manutenção da terapêutica por período prolongado está associada à baixa recidiva, o que indica plasticidade do “*set point*” energético (Wing e Phelan, 2005). Sugere-se que o entendimento do sistema regulatório, nos estados alterados do metabolismo energético e suas causas, permitiria a identificação dos mecanismos moleculares responsáveis pelo mesmo e, conseqüentemente, o desenvolvimento de métodos eficazes para modificá-lo (Leibel, 2008; Berthoud, 2002).

1.2.4 Sistema nervoso central: o maestro da homeostase energética

A regulação do gasto e da ingestão calórica e o monitoramento do estoque energético corporal são fundamentais para a manutenção da homeostase energética. Estudos envolvendo lesões em áreas cerebrais específicas elucidaram a importância do Sistema Nervoso Central (SNC) como centro da integração e regulação da homeostase energética (Seeley e Woods, 2003; Leibel, 2008). Observou-se que lesões no hipotálamo ventromedial resultaram em hiperfagia e obesidade em ratos. Lesões similares no hipotálamo lateral resultaram em anorexia e perda de peso. Em humanos,

lesões nas mesmas regiões resultam em fenótipos parecidos (Leibel, 2008; Berthoud, 2002; Seeley e Woods, 2003; Morton *et al.*, 2006).

A integração dos sinais referentes ao estado metabólico e a elaboração das respostas adaptativas para a manutenção da homeostase energética estão distribuídas por uma rede neuronal que envolve estruturas do tronco encefálico, sistema límbico, córtex e hipotálamo (Seeley e Woods, 2003; Morton *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2000). Propõe-se que, através de fatores hormonais e sinais neurais aferentes, as informações sobre o estado nutricional são disponibilizadas para o SNC, que as integra com informações cognitivas, visuais, olfatórias e gustatórias, e elabora respostas que mantêm a homeostase energética (Figura 2) (Morton *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2000).

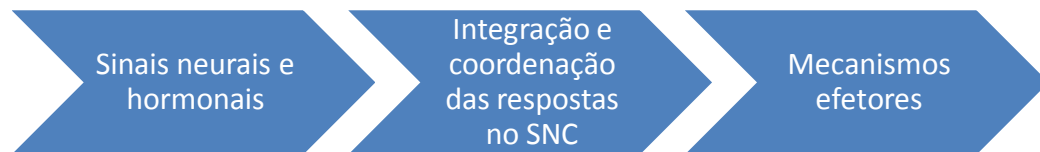


Figura 2 – Mecanismo proposto para manutenção da homeostase energética.

Através de sinais neurais e fatores hormonais, informações sobre o estado metabólico corporal e disponibilidade de fontes alimentares são integradas no sistema nervoso central (SNC), que coordena os mecanismos efetores, mantendo, dessa forma, o balanço energético.

1.2.5 Sinais carreadores das informações metabólicas

O tecido adiposo é o principal sítio de reserva energética. Foi sugerido que sinais inibitórios gerados em proporção à quantidade de gordura corporal agiriam em alças de “*feedback*” negativo para o SNC, reduzindo, assim, a ingestão calórica. Outros

postularam a insulina como sinal indicador do nível energético corporal (Seeley e Woods, 2003; Morton *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2000). Experimentos parabióticos nas cepas de camundongos, fenotipicamente obesos, “*obese*” (*ob/ob*) e “*diabetic*” (*db/db*), e em ratos e macacos indicaram a presença de um fator circulante cuja concentração era proporcional à quantidade de gordura (Friedman e Halaas, 1998). Foi proposto também que sinais metabólicos, derivados, por exemplo, do trato gastrointestinal, proveriam informações para o SNC resultando no término da refeição (Berthoud, 2002; Leibel, 2008). Estas evidências e especulações impulsionaram a identificação de vários fatores peptídicos e hormônios circulantes que funcionam como sinais metabólicos.

O SNC integra cinco tipos de sinais fisiológicos para a manutenção da homeostase energética: sinais derivados do tecido adiposo, provenientes do trato gastrointestinal (TGI), das glândulas endócrinas, elaborados a partir dos nutrientes circulantes e sinais gerados no próprio SNC através do sistema de recompensa e órgãos sensoriais (Morton *et al.*, 2006).

Os estudos nos modelos de camundongos obesos, *ob/ob* e *db/db*, revelaram que camundongos *ob/ob* eram deficientes em um fator circulante, enquanto camundongos *db/db* produziam o fator em excesso, mas não respondiam ao mesmo (Friedman e Halaas, 1998). Demonstrou-se que os camundongos *ob/ob* carregam mutação, com perda de função, no gene *ob*, posteriormente identificado como codificador do hormônio peptídico leptina, produzido com aparente exclusividade no tecido adiposo (Tartaglia *et al.*, 1995). A concentração de leptina circulante é proporcional à quantidade de tecido adiposo. Sua administração nos camundongos *ob/ob* reverte o fenótipo de obesidade, hiperfagia, hipotermia, atividade motora reduzida e outras anormalidades neuroendócrinas e imunológicas (Freidman e Halaas, 1998). No gene humano, mutações com perda de função, apesar de raras, levam à síndrome semelhante àquela observada nos camundongos *ob/ob* (Figura 3) (Farooqi e O’Rahilly, 2006). Da mesma forma, a administração de leptina exógena reverte o quadro (Farooqi e O’Rahilly, 2006). A íntima relação do hormônio com a quantidade de tecido adiposo é observada ainda no processo de envelhecimento dos roedores, que é acompanhado de redução na

expressão do receptor de leptina hipotalâmico e aumento do pâncreas adiposo. Mais ainda, a administração de leptina reverte o estado metabólico alterado dos pacientes com lipodistrofia, síndrome marcado pela ausência do tecido adiposo (Oral, 2002; Coll *et al.*, 2007; Seeley e Woods, 2003; Leibel, 2008). Sugere-se assim que a leptina sinaliza nas vias de informação utilizadas pelo SNC para monitorar o estado metabólico e suas transições (Friedman e Halaas, 1998).



Figura 3 – Efeito da administração de leptina em paciente com deficiência do hormônio.

A administração de leptina recombinante reverte o fenótipo da síndrome de deficiência de leptina, marcado, principalmente, pela obesidade. Adaptado de Farooqi e O'Rahilly, 2006.

A multiplicidade das vias do controle metabólico integradas no SNC são evidenciadas no fato da leptina ser relativamente ineficaz em reduzir a ingestão calórica e a gordura corporal em camundongos com obesidade induzida pela dieta, embora seja eficaz em roedores deficientes no hormônio ou com peso normal. De maneira semelhante, a administração de leptina em pacientes obesos comuns resulta em pequeno e variável efeito sobre o peso corporal (Friedman e Halaas, 1998). Estas observações levaram à formulação do conceito de “resistência a leptina”, que sugere

falha da regulação energética nas formas comuns de obesidade. Os mecanismos propostos incluem alteração do transporte hormonal pela barreira hematoencefálica e alterações das vias de sinalização, como mudanças na expressão das proteínas SOCS-3 e PTP1B, que estão relacionadas com a sensibilidade ao hormônio (Munzberg e Myers, 2005; Margetic *et al.*, 2002). Outros fatores, como adiponectina e interleucina-6, são secretados pelo tecido adiposo. Entretanto, o papel destes na regulação da homeostase energética ainda é motivo de debate (Coll *et al.*, 2007).

Os sinais provenientes do TGI agem diretamente no SNC ou através da modulação da atividade de neurônios sensoriais. Serão revisadas a função de três peptídeos relacionados com a homeostase energética, lembrando que outros fatores podem estar relacionados.

A colecistocinina (CCK) é um peptídeo intestinal secretado pelas células enteroendócrinas do duodeno e jejuno em resposta aos ácidos graxos da dieta. Liga-se nos receptores dos terminais vagais aferentes e funciona como sinal de saciedade (Chaudhri *et al.*, 2006). A administração periférica do hormônio levou à ativação de neurônios no núcleo do trato solitário. O peptídeo é ineficaz em reduzir a ingestão de alimentos nos camundongos “*knockout*” (KO) para o receptor de melanocortina 4 (MC4), sugerindo que a sinalização através do receptor é necessária para a saciedade induzida pela CCK (Coll *et al.*, 2007).

O peptídeo YY (PYY) é uma sequência de 36 aminoácidos secretada pelas células endócrinas L do intestino, em duas formas PYY₁₋₃₆ e PYY₃₋₃₆. O PYY₃₋₃₆ é agonista específico dos receptores Y2 (Cone, 2005). Seus níveis estão baixos durante o jejum e aumentam rapidamente no período pós-prandial. A administração periférica reduz a ingestão calórica e sua concentração aumenta em doenças associadas à perda de peso (Coll *et al.*, 2007). Foi proposto que o PYY₃₋₃₆ aumentaria a atividade de neurônios melanocortinérgicos hipotalâmicos, diminuindo dessa forma a ingestão calórica. Entretanto, a inibição da alimentação induzida pelo peptídeo foi observada em camundongos KO para o receptor MC4 e para o gene precursor das melanocortinas, tornando o modelo improvável (Halatchev *et al.*, 2004). O PYY₃₋₃₆ também ativa neurônios no tronco encefálico, sugerindo a ação através de outros sítios no SNC

(Cone, 2005). Observou-se que indivíduos com sobrepeso têm redução na concentração do PYY₃₋₃₆ pós-prandial e que seu nível é elevado após cirurgia bariátrica, o que explicaria parcialmente o sucesso na manutenção do peso a longo prazo pelo procedimento (Le Roux *et al.*, 2006).

A grelina é um peptídeo de 28 aminoácidos secretado por células presentes nas glândulas oxínticas do estômago. Sua expressão e secreção aumentam com a perda de peso, jejum e hipoglicemia (Coll *et al.*, 2007; Cummings *et al.* 2001). A administração periférica aumenta o apetite e reduz a utilização de gordura, o que é inibido por antagonistas dos receptores para o neuropeptídeo “neuropeptídeo-Y” (NPY) e nos camundongos KO para NPY (Cone, 2005). Sugere-se que a grelina atua como sinal entérico envolvido na homeostase energética, sendo singular, até o momento, na capacidade de estimular o apetite. Entretanto, camundongos KO para o peptídeo ou seu receptor não apresentaram redução no peso. Apesar disso, ratos vacinados contra o peptídeo grelina têm menor ganho de peso comparado aos controles (Coll *et al.*, 2007).

Dentre os fatores produzidos por glândulas endócrinas, a insulina é sintetizada pelas células β -pancreáticas e secretada em resposta a alterações no fluxo de energia celular (Seeley e Woods, 2003). Detectou-se que a concentração plasmática média de insulina em animais magros é mais baixa que nos obesos e, apesar da ampla variação nos níveis do hormônio em resposta à ingestão de nutrientes, a área total da curva de concentração de insulina em 24 h é indicativa da quantidade de energia armazenada no tecido adiposo (Seeley e Woods, 2003). O hormônio cruza a barreira hematoencefálica e seus receptores estão presentes no SNC, em especial no núcleo arqueado do hipotálamo (Seeley e Woods, 2003). A administração sistêmica desencadeia a entrada de glicose no tecido muscular e adiposo. Já a administração no SNC reduz a ingestão de alimentos e o peso corporal em roedores (Air *et al.*, 2002; Chavez *et al.*, 1995). A inativação do receptor de insulina no SNC resulta no aumento da ingestão calórica, acúmulo de gordura e susceptibilidade para o ganho de peso induzido pela dieta (Bruning *et al.*, 2000). Camundongos “*knockdown*” (KD) para os receptores de insulina hipotalâmicos apresentaram rápido início de hiperfagia associada ao aumento da

expressão do NPY e da proteína relacionada à proteína agouti (AgRP), enquanto a administração central do hormônio reduziu a expressão dos neuropeptídeos citados no animal selvagem (Cone, 2005; Obici *et al.*, 2002). Sugere-se que a insulina, juntamente com a leptina, sinaliza o nível da reserva energética do organismo para o SNC.

Os níveis circulantes de corticóides também afetam o apetite. A insuficiência adrenal é marcada pela anorexia, enquanto o excesso de corticóides causa hiperfagia. A adrenalectomia reverte o fenótipo obeso nos camundongos *ob/ob*, normaliza o aumento na expressão de AgRP e a redução da expressão do gene precursor das melanocortinas, restaurando o tônus do sistema melanocortinérgico (Coll *et al.*, 2007).

Os esteróides gonadais também têm papel na modulação da homeostase energética. Mostrou-se que o estradiol é capaz de aumentar o número de sinapses excitatórias no corpo dos neurônios hipotalâmicos que expressam o gene precursor das melanocortinas, resultando na redução da ingestão calórica e aumento do gasto energético (Gao *et al.*, 2007).

Informações sobre a homeostase energética são transmitidas, ainda, por outros sinais hormonais e neuronais, que carregam informações aparentemente redundantes.

Conclui-se que o SNC faz a transdução e integra vários sinais para elaborar as repostas necessárias à manutenção da homeostase energética (Figura 4). A integração, os mecanismos transdutores e a relevância funcional dos sinais metabólicos não estão completamente esclarecidos.

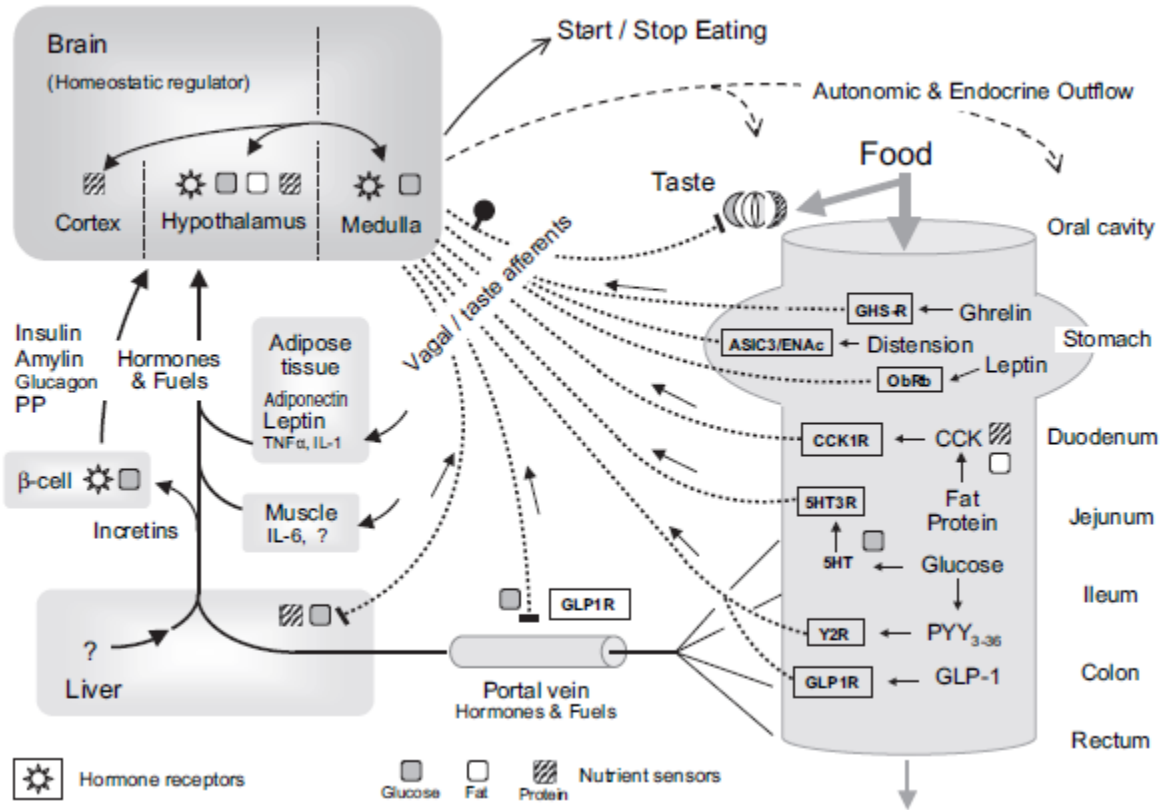


Figura 4 – Diagrama mostrando a multiplicidade de sinais integrados pelo SNC.

Adaptado de Berthoud e Morrison, 2008.

1.2.6 Transdução e integração das informações metabólicas pelo SNC

Esforços têm sido direcionados para a identificação e caracterização dos circuitos neuronais que fazem a transdução e integração dos sinais relacionados com a homeostase energética, assim como das respostas neuronais que desencadeiam as mudanças no comportamento alimentar e no metabolismo (Abizaid *et al.*, 2006). É necessário entender como a crescente lista de neurotransmissores e neuropeptídeos

relacionados com a homeostase energética está organizada para que se esclareça a patogênese das alterações metabólicas (Seeley e Woods, 2003).

O hipotálamo está envolvido no controle da ingestão de líquidos, no comportamento sexual, defensivo e agressivo, na regulação da temperatura corporal, dos eixos neuroendócrinos e do sistema imunológico (Berthoud 2002). O envolvimento de várias regiões hipotalâmicas na regulação da homeostase energética foi demonstrado através dos estudos de lesões cerebrais específicas que revelaram que a destruição dos núcleos hipotalâmicos ventromedial, paraventricular e dorsomedial induzia à hiperfagia, enquanto a lesão do hipotálamo lateral reduzia a ingestão alimentar (Abizaid *et al.*, 2006). Entre os vários núcleos hipotalâmicos, dois grupos neuronais no núcleo arqueado foram relacionados ao balanço energético.

A ativação de uma destas populações leva à redução da ingestão calórica e ao aumento do gasto energético. Estes neurônios expressam o gene precursor das melanocortinas, pró-opiomelanocortina (POMC), e o gene “transcrito regulado pela cocaína-anfetamina” (CART). A proteína precursora POMC é clivada nos hormônios estimuladores de melanócitos (α , β , γ -MSH), hormônio adrenocorticotrófico e β -endorfina (Cone, 2005). A administração no SNC da α e β -MSH leva à redução da ingestão calórica e do peso corporal, além de aumentar o gasto energético em animais, através da ligação nos receptores de melanocortina 3 (MC3) e 4 (Lee *et al.*, 2006). A ausência dos peptídeos derivados do POMC leva ao desenvolvimento de fenótipo caracterizado por hiperfagia e obesidade em camundongos (Coll, 2004). Sugere-se que o sistema melanocortinérgico funciona como um dos transdutores centrais dos sinais relacionados com o metabolismo (Cone, 2005). Nos roedores com perdas de função dos genes codificadores para POMC e receptores MC4 e MC3 observa-se fenótipo obeso. Já os pacientes com mutações de perda de função no gene POMC desenvolvem insuficiência adrenal, obesidade e cabelos ruivos, o que demonstra o papel do sistema melanocortinérgico humano no controle metabólico e na estimulação da produção de melanina (Vaisse *et al.*, 1998). Ainda, a haploinsuficiência do gene para o receptor MC4 é a causa mais comum de obesidade monogênica em humanos (Farooqi *et al.*, 2000; Farooqi e O’Rahilly, 2006). Assim, esta população neuronal está

associada à estado energético favorável e o fenótipo desencadeado pela sua ativação ocorre através do sistema melanocortinérgico. A atividade deste grupo neuronal está relacionada com a sensação de saciedade (Berthoud, 2002).

A ativação da outra população neuronal resulta em fenótipo caracterizado por hiperfagia, ganho de peso e redução no gasto energético total. Estes neurônios expressam NPY e AgRP. Observou-se que a administração central de NPY estimula o consumo calórico enquanto reduz o gasto energético em camundongos (Seeley e Woods, 2003). E mais, nos camundongos obesos *ob/ob* e *db/db*, como também nos animais em balanço energético negativo, a expressão de NPY está elevada no núcleo arqueado (Hahn *et al.*, 1998). Verificou-se que o padrão de atividade espontânea dos neurônios NPY/AgRP está elevado durante o jejum (Cone, 2005). A proteína AgRP é um antagonista de alta afinidade para os receptores MC3 e MC4, e no camundongo transgênico, expressando a proteína Agouti, homóloga à AgRP, observa-se o desenvolvimento de hiperfagia e obesidade (Cone, 2005). Dessa forma, esses neurônios estão associados à estado energético desfavorável, controlando outros circuitos neuronais, que desencadeiam a busca e o consumo de alimentos, e diminuindo a atividade do sistema melanocortinérgico. Entretanto, os camundongos KO para NPY ou AgRP ou ambos não exibiram os fenótipos metabólicos esperados a partir do modelo proposto (Erickson *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 2002; Wortley *et al.*, 2005). Postula-se a ocorrência de adaptações nos circuitos centrais associados ao metabolismo na ausência dessas moléculas. Estas observações levantam, ainda, questões sobre as funções dessas moléculas na regulação do balanço energético no adulto. Ao contrário dos camundongos KO, a morte seletiva dos neurônios NPY, em animais adultos, resulta em hipofagia e perda de peso (Gropp *et al.*, 2005; Luquet *et al.*, 2005; Flier, 2006). Consequentemente, sugere-se que o sistema de integração metabólica no SNC é susceptível à neuroplasticidade, fato evidenciado pela ausência de anormalidades quando as alterações moleculares estão presentes desde o início do desenvolvimento (Gropp *et al.*, 2005; Luquet *et al.*, 2005; Flier, 2006).

As duas populações neuronais descritas projetam para praticamente todas as regiões do hipotálamo e, também, para o núcleo accumbens, *striatum* dorsal, corpo

amígdaloide, regiões do tálamo e do tronco encefálico. Os neurônios que recebem as projeções, geralmente, expressam o receptor MC4 (Seeley e Woods, 2003; Morton *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2000; Coll *et al.*, 2007). Através do uso de técnicas neuroanatômicas, foi demonstrado que os neurônios que expressam NPY/AgRP projetam colaterais para os neurônios que expressam POMC no núcleo arqueado, inibindo-os através da liberação do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA) (Cowley *et al.*, 2001). Sugere-se que a unidirecionalidade das projeções dos neurônios NPY/AgRP para POMC representa organização evolutiva que favorece a inibição tônica dos sinais de saciedade, vantajoso em ambiente com escassez de alimento.

Demonstrou-se a presença de receptores funcionais para leptina, insulina, grelina, entre outros sinais carreadores de informações metabólicas periféricas, nessas populações neuronais no núcleo arqueado (Seeley e Woods, 2003; Morton *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2000; Coll *et al.*, 2007). Tal fato corrobora a função de transdução das informações metabólicas desses neurônios no SNC.

A leptina inibe os neurônios NPY/AgRP. O cruzamento dos camundongos *ob/ob* com camundongos KO para NPY levou à redução do fenótipo obeso do primeiro em aproximadamente 50% (Erickson *et al.*, 1996). O jejum eleva a expressão de NPY, o que é normalizado pela administração de leptina (Cone, 2005). Insulina e leptina estimulam a atividade dos neurônios que expressam POMC, enquanto o jejum diminui a expressão do gene, o que é revertido pela administração do segundo hormônio (Mizuno *et al.*, 1998; Cowley *et al.*, 2001; Niswender *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2002). Propõe-se que a ativação dos neurônios que expressam POMC pela leptina e insulina resulta na liberação de α -MSH que, através da ligação no receptor MC4, é necessário para a manifestação do fenótipo de redução da ingestão calórica e perda de peso. Consistente com isto, observou-se que os efeitos catabólicos da leptina e insulina são atenuados pelo pré-tratamento com baixas doses de antagonistas para as melanocortinas (Seeley *et al.*, 1997).

Estudos eletrofisiológicos mostraram que camundongos *ob/ob* têm aumento nas conexões excitatórias para os neurônios NPY/AgRP e diminuição nos neurônios POMC (Pinto, 2004; Coll *et al.*, 2007). Este padrão morfológico foi revertido pela administração

de leptina exógena. Observou-se também que o aumento na concentração de leptina durante o período pós-natal precoce é importante para o desenvolvimento neuronal hipotalâmico em camundongos (Pinto, 2004; Coll *et al.*, 2007). Levanta-se a hipótese da importância deste período do desenvolvimento para o adequado estabelecimento dos mecanismos reguladores e do “*set point*” da homeostase energética.

Os receptores para grelina são expressos nos neurônios NPY/AgRP (Shintani *et al.*, 2001; Nakazato *et al.*, 2001). Em ratos, doses farmacológicas do hormônio, administradas na periferia ou diretamente no hipotálamo, ativaram c-Fos, um marcador de atividade neuronal, nestes neurônios (Wang *et al.*, 2002). Os tratamentos também estimularam a ingestão calórica e o ganho de peso (Wang *et al.*, 2002). Sugere-se a inibição dos neurônios anorexigênicos POMC pela grelina através do aumento da liberação de GABA pelos colaterais dos neurônios NPY/AgRP (Cone, 2005). Entretanto, foi observado que a vagotomia reverte o fenótipo induzido pela grelina (Date *et al.*, 2002). Considerando que o nervo vago expressa receptores para o hormônio, talvez as projeções do núcleo do trato solitário para o hipotálamo sejam necessárias para a presença do fenótipo.

Juntamente com o núcleo arqueado, outros núcleos hipotalâmicos são importantes na transdução e integração dos sinais metabólicos no SNC.

A ativação de neurônios no núcleo ventromedial (NVM) do hipotálamo está relacionada com a inibição da alimentação e elevação do gasto energético basal (Dhillon *et al.*, 2006; Majdic *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). O NVM parece ser um núcleo que integra sinais orexigênicos e anorexigênicos no sistema de integração do SNC. Os neurônios no NVM expressam receptores para leptina e são ativados pela mesma (Dhillon *et al.*, 2006). A funcionalidade desta sinalização é observada nos animais KO condicionais para o receptor que exibem fenótipo obeso e hiperfágico (Dhillon *et al.*, 2006). Os neurônios no NVM são sensíveis também ao peptídeo orexigênico NPY. Através dos receptores Y1, o peptídeo diminui a excitabilidade dos neurônios e reduz o tônus anorexigênico do núcleo (Kumarnsit *et al.*, 2003; Chee *et al.*, 2010). Outra evidência da ligação do NVM com o metabolismo energético está na relação entre a expressão do BDNF e as alterações no estado metabólico. O BDNF é um fator de

crescimento da família das neurotrofinas que regula o desenvolvimento neuronal e a plasticidade sináptica através dos receptores tirosina kinase TrkB (Huang e Reichardt, 2001). Os camundongos heterozigotos para o gene do BDNF, com alelo mutado disfuncional, são obesos (Xu *et al.*, 2003; Lyons *et al.*, 1999). Já a administração central e periférica do fator diminuiu a ingestão calórica e aumentou o gasto energético nos camundongos *db/db* (Nonomura *et al.*, 2001). Observa-se uma redução de 60% nos níveis de expressão de BDNF no NVM de camundongos selvagens em jejum, e camundongos hipomorfos para o gene codificador de TrkB são obesos e hiperfágicos, com consumo calórico diário 75% maior que os controles (Xu *et al.*, 2003). Observou-se também que os níveis de BDNF estão reduzidos em camundongos transgênicos expressando a proteína agouti e nos camundongos KO para o receptor MC4, enquanto a administração de agonista para o receptor MC4 elevou os níveis do fator neurotrófico em camundongos (Xu *et al.*, 2003). Estas evidências sugerem que a via de sinalização do BDNF pode ser um componente através do qual o sistema melanocortinérgico regula o balanço energético. Postula-se que a expressão do BDNF no NVM, induzida pelo receptor MC4, é regulada por projeções dos neurônios POMC e NPY/AgRP do núcleo arqueado. Entretanto, ainda não se sabe quais neurônios expressando o receptor TrkB são responsáveis pela transdução do sinal do BDNF relacionado com o comportamento alimentar.

A lesão da área hipotalâmica lateral (LHA) resulta em quadro marcado por anorexia em animais (Seeley e Woods, 2003; Morton *et al.*, 2006; Berthoud, 2002). Duas populações neuronais foram identificadas na LHA. A primeira contém o peptídeo orexina, implicado no ciclo sono-vigília e na hiperfagia, e a segunda expressa o hormônio concentrador de melanina (MCH), também estimulador da ingestão calórica (Seeley e Woods, 2003; Morton *et al.*, 2006; Berthoud, 2002). A expressão de orexina, MCH e a atividade dos neurônios na LHA aumentam no jejum (Diano *et al.*, 2003). Camundongos KO para o gene codificador do MCH apresentam fenótipo de hipofagia e aumento do gasto metabólico (Shimada *et al.*, 1998).

O núcleo dorsomedial (NDM) do hipotálamo está envolvido com uma variedade de mecanismos regulatórios que incluem desde a modulação da secreção de

hormônios até o controle da temperatura corporal (Berthoud, 2002). Evidências sugerem ainda sua participação na homeostase energética. Este núcleo recebe projeções de áreas do hipotálamo e tronco encefálico sabidamente relacionadas com o comportamento alimentar e, quando lesionadas, resultam em hipofagia (Berthoud, 2002). Animais com acesso padronizado restritivo ao alimento apresentaram aumento na expressão de c-Fos no NDM quando comparado a animais alimentados *ad libitum*, o que sugere que a atividade neuronal do núcleo está envolvida na sincronização entre o ciclo circadiano e o padrão da alimentação (Gooley *et al.*, 2006).

O núcleo supraquiasmático (NSQ) hipotalâmico é o principal núcleo de controle do ciclo circadiano. Estudo recente observou que a mutação com perda de função do gene “*clock*”, amplamente expresso no NSQ, além das alterações no ciclo circadiano, também resulta em obesidade (Turek *et al.*, 2005).

O papel de outros núcleos hipotalâmicos na transdução dos sinais metabólicos, bem como na integração com os núcleos descritos e na organização das respostas efectoras, que mantêm a homeostase energética, ainda não está claro (Berthoud, 2002).

Além da transdução de sinais metabólicos carregados por hormônios e neuropeptídeos, alguns neurônios detectam e respondem a alterações no estado energético intracelular (Seeley e Woods, 2003; Morton *et al.*, 2006). Postula-se que alguns neurônios monitoram e respondem ao conjunto de combustíveis celulares – que refletem o estado metabólico global – e usam esta informação para influenciar o consumo de nutrientes e o gasto energético (Seeley e Woods, 2003). A administração intracérebro-ventricular (ICV) de ácido oleico (C18:1) inibe a ingestão calórica e a produção de glicose, e animais alimentados com dieta rica em gordura tornam-se resistentes aos efeitos anoréticos do ácido oleico (Obici *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2004). Ainda, a inibição central da enzima limitante da oxidação dos ácidos graxos, carnitina-palmitoiltransferase-1, também diminui a ingestão alimentar (Obici *et al.*, 2003). Já a enzima AMPK, ativada pelo aumento na concentração de AMP, que reflete o estado energético celular, também tem sido relacionada com a homeostase energética (Seeley e Woods, 2003). Desconhece-se, entretanto, quais são os neurônios

que funcionam como sensores de energia ou para quais outros neurônios eles projetam (Seeley e Woods, 2003).

Conclui-se que o balanço energético é mantido através da monitoração simultânea da quantidade de energia estocada no tecido adiposo e imediatamente disponível para as células, gerando respostas que evitam e, se preciso, corrigem alterações no estado metabólico (Seeley e Woods, 2003). O sistema de integração e resposta é complexo (Figura 5). O hipotálamo tem sido amplamente estudado e verificou-se que integra vários sinais humorais e neuronais importantes para a regulação do apetite e metabolismo.

Circuitos neuronais, classicamente relacionados a outras funções, também integram este sistema (Figura 5). O sistema dopaminérgico tem sido implicado na recompensa e nos aspectos motivacionais do comportamento alimentar. Evidências sugerem que sinais metabólicos, inicialmente relacionados à sinalização através do hipotálamo, como leptina, insulina e grelina, também modulam a função dos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos (Palmiter, 2007; Berthoud, 2002; Figlewicz *et al.*, 2003; Hommel *et al.*, 2006; Fulton *et al.*, 2006; Figlewicz *et al.*, 1994). Entretanto a função da dopamina na integração metabólica cerebral ainda não está completamente compreendida (Palmiter, 2007).

1.3.1 Anatomia e fisiologia do sistema dopaminérgico nos mamíferos

Os neurônios contendo dopamina estão agrupados em nove grupos celulares distribuídos entre o mesencéfalo e o tubérculo olfatório em humanos. Três grupos, contendo entre 400 e 600 mil neurônios, estão localizados bilateralmente no mesencéfalo. Suas projeções são agrupadas em três vias anatômicas e funcionalmente distintas: mesostriatal, mesolímbica e mesocortical. Os neurônios que compõem as vias mesolímbica e mesocortical têm seus corpos localizados na substância nigra (SN) *pars compacta* e, principalmente, na área tegmentar ventral (ATV), projetando para estruturas do sistema límbico e córtex, respectivamente. A via mesostriatal engloba células localizadas na SN *pars compacta* que projetam para o *striatum* dorsal, estando relacionada com a função motora. Os neurônios dopaminérgicos mesencefálicos projetam ainda para outras estruturas dos núcleos da base, entre elas o globo pálido ventral, o núcleo subtalâmico e a SN *pars reticulata* (Bjorklund e Dunnett, 2007).

Neurônios dopaminérgicos também estão localizados e projetam na via túbero-infundibular no hipotálamo. Detectou-se a co-localização com vários neuropeptídeos (hormônio liberador do hormônio de crescimento, neurotensina, galanina, encefalina e dinorfina) e com o neurotransmissor GABA. Postula-se que a atividade dopaminérgica hipotalâmica está relacionada com a regulação neuroendócrina (Bjorklund e Dunnett, 2007).

A dopamina é sintetizada no citosol dos terminais neuronais dopaminérgicos, em uma sequência de duas reações a partir do aminoácido tirosina. A primeira reação é limitante na síntese do neurotransmissor. Consiste na hidroxilação do anel aromático do aminoácido, catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH), formando o precursor L-DOPA e requer a coenzima tetra-hidrobiopterina. A segunda reação é catalisada pela enzima aminoácido aromático decarboxilase e remove o grupo carboxil da L-DOPA, produzindo dopamina que finaliza a síntese (Siegel *et al.*, 2005).

Logo após a síntese, a dopamina é transportada para dentro de vesículas sinápticas através de transporte ativo secundário a gradiente de prótons, mediado pelo

transportador vesicular de monoaminas. Em resposta à elevação na concentração de cálcio intracelular, as vesículas liberam o neurotransmissor que, então, pode se ligar nos seus receptores. O término da transmissão dopaminérgica ocorre, principalmente, através da recaptação do neurotransmissor, pelo transportador de dopamina (DAT), de volta para o terminal neuronal. O neurotransmissor é bombeado novamente para a vesícula sináptica para ser reutilizado ou é degradado pela enzima monoamina-oxidase (Siegel *et al.*, 2005). Parte da dopamina que se difunde da fenda sináptica ou é liberada da forma não clássica, chamada transmissão por volume, sofre degradação pela enzima catecol-O-metiltransferase (Rice, 2000).

Os efeitos da dopamina são mediados através da ligação em cinco subtipos de receptores. Todos possuem sete domínios transmembrana e são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G. Baseado em características estruturais e bioquímicas, os receptores são classificados em dois grupos D1-*like* e D2-*like* (Figura 6).

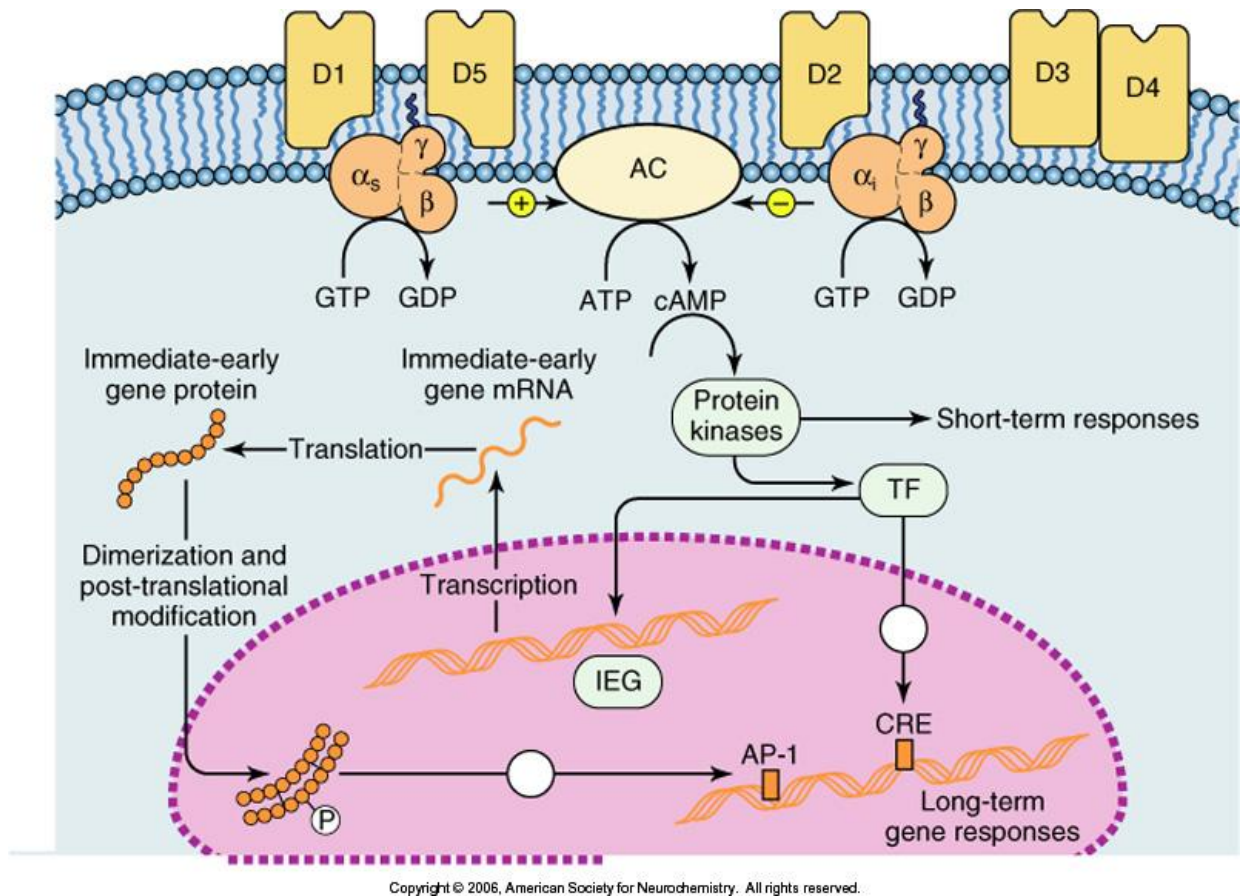


Figura 6 – Os receptores dopaminérgicos e as vias de transdução de sinal.

Adaptado de Siegel *et al.*, 2005.

O grupo D1-*like* inclui os receptores dopaminérgicos D1 (D1R) e D5 (D5R), que são acoplados à proteína G estimulatória (G_s) (Figura 6). A ativação dos receptores aumenta a atividade da enzima adenilato ciclase e, consequentemente, eleva a concentração de AMP-cíclico, que ativa a proteína quinase A (PKA). Os receptores D1-*like* modulam o funcionamento do córtex pré-frontal. Estão presentes também no corpo estriado, no hipotálamo e em outras regiões do córtex cerebral (Siegel *et al.*, 2005).

O grupo D2-*like* inclui os receptores dopaminérgicos D2 (D2R), nas isoformas longa e curta, D3 (D3R) e D4 (D4R). Os receptores são acoplados à proteína G inibitória (G_i) (Figura 6), que inibe a atividade da enzima adenilato ciclase.

Consequentemente, a ativação dos receptores reduz a concentração de AMP-cíclico e a atividade das enzimas dependentes deste segundo mensageiro. Os receptores D2-*like* são alvo dos fármacos antipsicóticos, o que sugere sua relação com processos cognitivos, motores e afetivos. Estão distribuídos no corpo estriado, córtex cerebral, tronco encefálico e na medula espinhal (Siegel *et al.*, 2005).

1.3.2 Dopamina e a homeostase energética

Evidências experimentais sugerem a participação do sistema dopaminérgico no controle da homeostase energética corporal (Palmiter, 2007; Figlewicz e Benoit, 2008; Figlewicz, 2003). Considerando que a dopamina está envolvida em vários comportamentos, é possível que a participação ocorra de diversas formas. A associação do sistema dopaminérgico com comportamentos motores, controle neuroendócrino e modulação do sistema de recompensa sugere meios através dos quais as respostas envolvidas na manutenção da homeostase energética podem ser moduladas. Mais ainda, evidências indicam que neurônios dopaminérgicos monitoram diretamente o estado metabólico do organismo através da transdução direta de sinais hormonais e indiretamente através de conexões com áreas envolvidas no controle metabólico no SNC (Palmiter, 2007; Figlewicz e Benoit, 2008; Figlewicz, 2003).

Mesmo com o amplo conhecimento sobre o sistema dopaminérgico, a transdução dos sinais metabólicos e as respostas e interações com outros circuitos neuronais envolvidos com a homeostase energética ainda não estão claras. O entendimento destas funções é necessário para a evolução do conhecimento sobre a patogênese e o avanço da terapêutica dos transtornos metabólicos e mentais.

1.3.3 Homeostase energética nos camundongos KO para a enzima tirosina hidroxilase

Camundongos KO para a enzima limitante na síntese de dopamina, TH, não produzem dopamina e apresentam fenótipo de hipofagia extrema, que resulta no óbito em algumas semanas (Szczyepka *et al.*, 1999a; Szczyepka *et al.*, 1999b; Zhou e Palmiter, 1995). Os animais sobrevivem através da suplementação com L-DOPA, que restaura nas primeiras horas os níveis de dopamina para aproximadamente 38% do normal, período em que os animais ingerem a maior parte das calorias diárias (Zhou e Palmiter, 1995; Szczyepka *et al.*, 1999a). Esses camundongos não respondem com aumento da ingestão calórica em situações desencadeantes do comportamento, como hipoglicemia ou administração do peptídeo PYY₃₋₃₆ (Hnasko *et al.*, 2004). Cruzados com os camundongos *ob/ob*, a ausência de dopamina reverte parcialmente o fenótipo de hiperfagia e obesidade (Szczyepka *et al.*, 2000). Estas evidências indicam que a ausência do neurotransmissor perturba a homeostase energética em camundongos.

Através do resgate da produção do neurotransmissor em sítios específicos, foram explorados os circuitos cerebrais envolvidos no controle da homeostase energética pelo sistema dopaminérgico.

O *striatum* ventral é uma região integrante do sistema de recompensa cerebral onde a liberação de dopamina, através da via mesolímbica, está relacionada com o grau de prazer dos comportamentos. Postula-se que a relação da dopamina com a homeostase energética possa ocorrer por esta via. Entretanto, o resgate da produção de dopamina no *striatum* ventral não reverteu o fenótipo anorético dos camundongos KO para TH (Szczyepka *et al.*, 2001). Da mesma forma, a lesão das fibras dopaminérgicas projetando para o *striatum* ventral não resultou em redução da ingestão calórica, entretanto reduziu a motivação dos animais para a busca do alimento (Salamone *et al.*, 2005). Isto indica a necessidade da sinalização dopaminérgica em outros núcleos para a normalidade do comportamento alimentar.

Classicamente, a projeção dos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos para o *striatum* dorsal está associada ao controle motor. Isto porque a sintomatologia da doença de Parkinson tem como substrato a degeneração dos neurônios dopaminérgicos projetando para esta área (Iversen e Iversen, 2007). A recuperação da produção de dopamina nas fibras projetando para o *striatum* dorsal resgatou a ingestão calórica nos camundongos KO para TH (Szczypka *et al.*, 2001). O resultado indica que o *striatum* dorsal e não ventral está relacionado com a modulação do comportamento alimentar pela dopamina. Entretanto, esses camundongos não normalizaram completamente o comportamento alimentar, permanecendo com ingestão calórica deficiente após o jejum e induzida por hipoglicemia (Hnasko *et al.*, 2006). Corroborar-se que a modulação do comportamento alimentar pelo sistema dopaminérgico envolve a sinalização através de vários núcleos.

Outra interpretação para o fenótipo observado nos camundongos deficientes na produção de dopamina envolve o fenômeno da neuroadaptação. Devido à ausência do neurotransmissor durante o desenvolvimento, funções antes moduladas pelo sistema dopaminérgico podem sofrer adaptação e serem assumidas por outros circuitos neuronais. Talvez o resgate do fenótipo, através da recuperação da produção de dopamina no *striatum* dorsal, não corresponda às suas funções fisiológicas no desenvolvimento normal.

A administração de anfetamina, cocaína, apomorfina e a inibição da recaptação de dopamina são manipulações que acentuam a sinalização no sistema dopaminérgico e que resultam na inibição da ingestão calórica (Palmiter, 2007). Apesar da hipótese de envolvimento do sistema dopaminérgico hipotalâmico no fenótipo, os camundongos KO para TH, com recuperação da atividade enzimática no *striatum* dorsal, apresentaram hipofagia induzida pela anfetamina e apomorfina, o que enfraquece o mecanismo sugerido (Cannon *et al.*, 2004; Sotak *et al.*, 2005). Talvez a liberação fásica de dopamina no *striatum* dorsal seja importante para a ingestão calórica, e a interrupção deste padrão pelos fármacos resulta em hipofagia (Floresco *et al.*, 2003). Entretanto, a ausência de hipofagia nos camundongos KO para o DAT indica algum outro mecanismo (Peciña *et al.*, 2003).

1.3.4 Neurônios dopaminérgicos monitoram o estado metabólico

Evidências recentes mostram que neurônios dopaminérgicos mesencefálicos expressam receptores para os hormônios leptina, insulina e grelina e que peptídeos hipotalâmicos, envolvidos na integração metabólica, como NPY, α -MSH, AgRP, orexina e MCH, modulam a atividade dos neurônios dopaminérgicos que projetam para o *striatum* ventral (Abizaid *et al.*, 2006; Jerlhag *et al.*, 2006; Wellman *et al.*, 2005; Figlewicz, 2003; Zigman *et al.*, 2006; Berthoud, 2002). Sugere-se que o sistema dopaminérgico é necessário para a homeostase energética, em especial nas respostas envolvendo o comportamento alimentar, situando-se como alvo dos sinais metabólicos e das projeções hipotalâmicas (Fulton *et al.*, 2000; Figlewicz, 2003).

Receptores para grelina são expressos e estimulam a atividade do sistema dopaminérgicos (Abizaid *et al.*, 2006). Nos camundongos KO para o receptor de leptina, os neurônios dopaminérgicos da ATV não aumentaram a atividade após a administração do hormônio, o que demonstra especificidade na ativação neuronal (Abizaid *et al.*, 2006). Observou-se também que a redução da expressão do receptor de grelina nestes neurônios reduz a ingestão calórica induzida pela grelina (Abizaid *et al.*, 2006). Já o aumento da ingestão calórica em animais, induzida pela grelina administrada na ATV, foi revertido pelo tratamento concomitante de antagonista específico para o receptor do hormônio (Toshinai *et al.*, 2003). Apesar das evidências apontarem para uma ação direta da grelina nos neurônios dopaminérgicos, estudos mostraram que a administração periférica do hormônio não levou ao aumento da ingestão calórica em camundongos deficientes em orexina, NPY, AgRP ou com bloqueio vagal (Luquet *et al.*, 2007; Date *et al.*, 2006). E mais, o tratamento com grelina aumentou o número de conexões excitatórias e diminuiu as inibitórias na ATV em camundongos, sugerindo que o aumento da atividade neuronal pode ser decorrente de processos plásticos (Abizaid *et al.*, 2006). Sugere-se que o efeito da grelina no comportamento alimentar depende de outras populações neuronais e não diretamente do sistema dopaminérgico, apesar de o mesmo responder diretamente ao hormônio.

A expressão de receptores de leptina foi observada em neurônios dopaminérgicos mesencefálicos, o que sugere a possibilidade de o sistema dopaminérgico também transduzir este sinal metabólico (Figlewicz *et al.*, 2003; Hommel *et al.*, 2006). O receptor de leptina ativa a cascata de sinalização JAK-STAT (Morton *et al.*, 2006). Mutações no gene que codifica a proteína componente da via STAT3 mimetizam o fenótipo dos camundongos *ob/ob* (Bates *et al.*, 2003). A análise da fosforilação do resíduo de tyr705 da proteína STAT3 mostrou que a injeção intraperitoneal ou direta de leptina na ATV eleva o nível de fosforilação da proteína nos neurônios dopaminérgicos, o que indica a funcionalidade dos receptores (Hommel *et al.*, 2006). A administração de leptina na ATV reduziu também a ingestão calórica em paralelo à diminuição da atividade dos neurônios dopaminérgicos nos ratos (Hommel *et al.*, 2006). A relação direta entre fenótipo hipofágico induzido pela leptina e o sistema dopaminérgico foi observada através do KD do gene para o receptor do hormônio nos neurônios dopaminérgicos da ATV de ratos. A redução da expressão do receptor levou ao aumento da ingestão calórica (Hommel *et al.*, 2006). Apesar do maior consumo de alimentos, os animais não ganharam peso, o que pode ser justificado pela maior movimentação noturna ou por alterações compensatórias no gasto energético basal. Os ratos apresentaram ainda maior preferência por solução de sacarose e por dieta palatável (Hommel *et al.*, 2006). Considerando que a regulação da ingestão calórica pela leptina envolve a modulação direta da função dos neurônios dopaminérgicos na ATV, sugere-se que a leptina sinaliza tanto através do hipotálamo como do sistema dopaminérgico para regular a homeostase energética nos roedores.

A administração de leptina nos camundongos *ob/ob* também aumentou a fosforilação da proteína STAT3 nos neurônios dopaminérgicos da ATV (Fulton *et al.*, 2006). Comparado com a fosforilação da proteína no hipotálamo, o aumento foi, em média, de 63% daquele observado no sítio clássico de ação do hormônio (Fulton *et al.*, 2006).

A relação entre as funções do sistema dopaminérgico e a leptina também foi testada através de um paradigma envolvendo as anfetaminas. Estas aumentam a concentração de dopamina extracelular, o que exacerba a atividade locomotora. Nos

camundongos *ob/ob*, o aumento da locomoção induzida pela anfetamina foi aproximadamente 36% menor comparado ao controle, o que foi revertido pela administração de leptina (Fulton *et al.*, 2006). Já a sensibilização a repetidas doses de anfetamina, que é sabidamente secundária à neuroadaptação dos neurônios dopaminérgicos, não ocorreu na ausência do hormônio (Fulton *et al.*, 2006), indicando que a leptina é importante para o funcionamento normal do sistema dopaminérgico.

Análises mostraram que a administração de leptina aumentou a quantidade e a atividade da enzima TH, o que sugere redução da síntese de dopamina nos camundongos *ob/ob*. A medição da quantidade de dopamina total e liberada no *striatum* ventral desses camundongos mostrou redução de 47% no neurotransmissor (Fulton *et al.*, 2006), demonstrando que o tônus leptinérgico é necessário para a síntese de quantidades adequadas de dopamina.

Entretanto, a quantidade reduzida de dopamina nos camundongos *ob/ob* pode ser consequência de adaptações ao fenótipo hiperfágico do animal ou, ainda, consequência do extremo fisiológico criado pela ausência total de leptina, não sendo observado em condições normais de variação na concentração de leptina. O fato da fosforilação de STAT3 na ATV de camundongos selvagens ser baixa sugere que a segunda hipótese pode ser parcialmente verdadeira. Assim, postula-se que a ação dos níveis circulantes de leptina nos neurônios dopaminérgicos é mínima (Palmiter, 2007).

No jejum os níveis circulantes de leptina e insulina estão reduzidos enquanto o de grelina aumenta. De acordo com as evidências apresentadas, este estado fisiológico aumentaria a atividade dos neurônios dopaminérgicos e consequentemente de liberação da dopamina. Entretanto, os níveis extracelulares de dopamina medidos no *striatum* ventral de ratos em jejum são similares ou menores quando comparados aos controles (Pothos *et al.*, 1995; Cadoni *et al.*, 2003). Ressalta-se que talvez o padrão de ativação dos neurônios dopaminérgicos e não a quantidade total de dopamina extracelular esteja relacionado com o comportamento alimentar, o que não é passível de verificação através dos experimentos por microdiálise atuais.

Ainda de acordo com as evidências expostas, considerando que a concentração circulante de leptina e insulina está elevada em animais obesos, espera-se uma redução na atividade dos neurônios dopaminérgicos e na concentração de dopamina extracelular. A análise dos camundongos *ob/ob* mostrou que, de fato, a atividade do sistema dopaminérgico está reduzida em animais obesos (Fulton *et al.*, 2006). Esses animais apresentaram também ingestão calórica acima dos controles, talvez uma forma de elevar o tônus dopaminérgico. Conclui-se que o sistema dopaminérgico é influenciado pelos estados nutricionais e transduz sinais metabólicos; entretanto a revelância funcional e a interação com o sistema de integração do metabolismo não estão completamente esclarecidas.

1.3.5 Envolvimento do sistema dopaminérgico na recompensa e suas implicações para a homeostase energética

O sistema de recompensa favorece comportamentos essenciais, como alimentação e sexo, atribuindo a estes grau intenso de prazer que incentiva a busca e consumação. Evidências sugerem que estados fisiológicos influenciam o processo, aumentando a percepção do prazer e o incentivo associado a determinado comportamento (Kelley e Berridge, 2002; Wise, 2002).

Observou-se que a injeção intraventricular de leptina ou insulina reduziu a preferência por local condicionado por alimento palatável em ratos (Figlewicz *et al.*, 2004). E ainda, a leptina reduziu a preferência por locais contendo peletes de sacarose, enquanto a insulina diminuiu a preferência pela ingestão de solução de sacarose (Sipols *et al.*, 2000; Figlewicz *et al.*, 2001). Os estudos utilizaram técnicas que avaliam o grau de recompensa associada ao comportamento, sugerindo, então, que ambos os hormônios influenciam o sistema de recompensa.

Demonstrou-se que o jejum aumenta em quatro vezes a ingestão de solução de sacarose em ratos, o que foi reduzido em 40% após a injeção intraventricular de insulina ou leptina. Ainda a alimentação pré-tratamento reverteu a redução observada na ingestão da solução de sacarose após administração de insulina ou leptina. Conclui-se que o tratamento agudo com os hormônios que mimetizam estado de abundância energética reduz a recompensa associada à sacarose (Figlewicz *et al.*, 2006).

Estas evidências sugerem a modulação do sistema de recompensa pelo estado metabólico corporal. O sistema dopaminérgico responde a sinais metabólicos e também é parte importante do sistema de recompensa. Dessa forma, é possível que as alterações observadas na homeostase energética causadas por disfunções da sinalização dopaminérgica, ocorram através da modulação da recompensa associada ao comportamento alimentar pelo neurotransmissor, assumindo que o alimento é um reforço estabelecido.

Neurônios dopaminérgicos na ATV do mesencéfalo, projetando para o *striatum* ventral, são implicados no processo de recompensa associado ao alimento, sexo e drogas de abuso (Volkow e Wise, 2005). Entretanto, como já discutido, o resgate da produção de dopamina nas fibras projetando para o *striatum* dorsal e não ventral de camundongos deficientes no neurotransmissor resgatou o fenótipo hipofágico (Szczypka *et al.*, 2001). Possivelmente, ou o substrato neuronal da recompensa associada ao alimento envolve também o *striatum* dorsal – lembrando que isto pode ser consequência de adaptações decorrentes da ausência de dopamina durante o desenvolvimento – ou o *striatum* ventral não é um fator essencial para o comportamento alimentar.

Através de análises de imagens geradas por tomografia de emissão de pósitrons (PET), observou-se que o consumo de alimentos está associado à liberação de dopamina no *striatum* dorsal e não ventral, sendo que a quantidade liberada relacionou-se com o prazer experimentado (Small *et al.*, 2003). Humanos hiperfágicos, com deficiência congênita de leptina, têm aumento da atividade neuronal, no *striatum* dorsal e ventral, em resposta à imagem de alimentos. Já a reposição hormonal atenuou a atividade *striatal*, diminuindo o grau de prazer da alimentação (Farooqi *et al.*, 2007). É

possível que exista uma diferença entre a circuitaria neuronal associada à ingestão calórica para aporte nutricional daquela relacionada com o prazer associado ao ato. As evidências sugerem que o sistema dopaminérgico participa de ambos os processos através de diferentes projeções.

1.3.6 Receptores dopaminérgicos e a homeostase energética

Observou-se que apesar dos camundongos KO para o receptor D1 serem menores que os controles e aparentemente doentes, não apresentaram alteração no peso corporal corrigido (Drago *et al.* 1994).

O antagonismo crônico do receptor D2 resultou em ganho de peso em camundongos (Cope *et al.*, 2005). Através da análise de imagens, observou-se que indivíduos obesos apresentam menor disponibilidade de receptores D2 no *striatum* (Wang *et al.*, 2001). Verificou-se, também, que a ativação do *striatum* dorsal induzida por alimentos de alta palatabilidade está reduzida em pacientes obesos (Stice *et al.*, 2008). Consistente com os achados, a hipofunção do *striatum* dorsal e o ganho de peso foram mais proeminentes nos indivíduos portadores do alelo TaqIA no locus gênico DRD2-ANKK1, que resulta na redução da expressão do receptor D2 striatal (Stice *et al.*, 2008). Inversamente, foi observado em indivíduos anoréticos ou com perda de peso resultante de cirurgia bariátrica aumento na densidade dos receptores D2 (Frank *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). Estas observações sugerem que déficit na ativação *striatal* modulada pelo sistema dopaminérgico e associada ao processo de recompensa, pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da obesidade. Sugere-se que o consumo compulsivo de alimentos palatáveis, ricos em energia, ocorreria para compensar a redução na atividade dopaminérgica com consequente hipossensibilidade do sistema de recompensa (Wang *et al.*, 2002).

Entretanto, não está claro se os déficits no processo de recompensa são constitutivos e precedem o desenvolvimento da obesidade ou se o consumo excessivo de alimentos palatáveis causa a disfunção no sistema de recompensa, que apenas contribuiria para o desenvolvimento do fenótipo.

JOHNSON e KENNY (2010) mostraram que o acesso irrestrito a dieta altamente palatável e rica em gordura resultou em hiperfagia e ganho de peso, acompanhado de redução progressiva da recompensa associada à estimulação elétrica do hipotálamo lateral em ratos (Johnson e Kenny, 2010). Este fenômeno pode ser explicado pela diminuição gradual da responsividade dos circuitos neuronais associados ao estímulo. Esta interpretação é consistente com estudos em que a restrição alimentar aumentou, enquanto a hiperfagia diminuiu a responsividade de ratos aos estímulos elétricos (Blundell e Herberg, 1968; Hoebel e Teitelbaum, 1962). Possivelmente as interações entre o sistema de recompensa e o estado metabólico estão conservadas na evolução e presentes nos humanos.

Observou-se também que durante regime irrestrito de acesso à dieta rica em gordura, os ratos apresentaram redução progressiva da quantidade de receptores D2 nos neurônios *striatais*, o que acompanhou o ganho de peso (Johnson e Kenny, 2010). Entretanto, ratos KD para o receptor D2 *striatal* não exibiram alteração da recompensa quando alimentados em dieta regular. Apesar disso, após mudança para dieta irrestrita e palatável, os ratos desenvolveram disfunção acentuada no sistema de recompensa (Johnson e Kenny, 2010). As observações sugerem que alterações do sistema dopaminérgico aumentam a vulnerabilidade à disfunção do sistema de recompensa induzida pela dieta. O acesso a alimentos palatáveis com alto teor energético é considerado fator de risco ambiental para a obesidade (Volkow e Wise, 2005). As alterações no sistema de recompensa observadas em ratos podem refletir uma adaptação na sensibilidade do sistema em oposição à sua estimulação excessiva por alimentos palatáveis (Johnson e Kenny, 2010). A hipofunção induzida pela dieta pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade através do aumento da motivação para o consumo de alimentos. Isto é consistente com a redução da atividade *striatal*

observada no consumo de alimento altamente palatável em pacientes obesos (Stice *et al.*, 2008).

A diminuição da expressão de receptores D2 *striatais* é uma resposta neuroadaptativa ao aumento da ingestão de alimentos palatáveis. Postula-se que as alterações na densidade do receptor D2 *striatal*, causadas por fatores genéticos ou alimentares, podem contribuir para a patogênese da obesidade. Entretanto, a observação da ausência de disfunção na recompensa ou hiperfagia em ratos KD para o receptor D2 *striatal*, em regime dietético regular, indica que apenas a alteração do sistema dopaminérgico não é suficiente para desencadear o fenômeno. Outras modificações resultantes do consumo da dieta de alta palatabilidade são necessárias para manifestação do fenótipo.

As evidências sugerem função do receptor D2 no controle da homeostase energética através da sinalização no sistema de recompensa. Entretanto, a dopamina sinaliza através de outros quatro receptores. Não foi observado fenótipo de ganho de peso nos camundongos KO para os outros receptores (Palmiter, 2007). Apesar disso, ainda não estão esclarecidos qual a importância das interações entre eles e se o fenótipo não está sendo mascarado por outros mais expressivos.

1.3.7 Esquizofrenia, antipsicóticos e homeostase energética

A esquizofrenia é uma síndrome debilitante que resulta em deficiência vitalícia e manifesta-se através de anormalidades na função mental e no comportamento. Inicia-se por volta da segunda ou terceira década de vida, e é caracterizada por sintomas positivos (delírios, alucinações e desorganização do pensamento), sintomas negativos (embotamento afetivo e social) e alterações cognitivas (disfunção da atenção, raciocínio e memória) (Lewis e Lieberman, 2000). Pacientes tratados adequadamente reduzem ou

mesmo remitem a sintomatologia, mas, em geral, as alterações cognitivas persistem (Robinson *et al.*, 1999).

Atualmente, os antipsicóticos são o principal recurso terapêutico e se classificam em primeira e segunda gerações (Kapur e Remington, 2001). Os antipsicóticos de primeira geração são antagonistas dos receptores D2. São eficazes no controle dos sintomas psicóticos, entretanto, apresentam efeitos colaterais extrapiramidais e discinesia tardia. Entre os fármacos da classe estão haloperidol e clorpromazina (Kapur e Remington, 2001). Os antipsicóticos de segunda geração possuem farmacodinâmica mais complexa. São antagonistas dos receptores D2, porém com menor afinidade comparados à classe anterior, e são também antagonistas de receptores serotoninérgicos, muscarínicos, adrenérgicos e histaminérgicos. Amisulprida, clozapina, olanzapina e risperidona estão entre os fármacos da classe (Kapur e Remington, 2001).

Os antipsicóticos não formam grupos homogêneos, diferindo na eficácia clínica e no perfil de efeitos colaterais (Leucht *et al.*, 2009). Atualmente, o custo anual da terapia com os antipsicóticos de segunda geração atinge a marca dos 7,5 bilhões de dólares e representa 90% do mercado americano (Lieberman *et al.*, 2005). A grande aceitação ocorre pela crença na melhor eficácia clínica com baixa incidência de efeitos colaterais extrapiramidais e discinéticos. Entretanto, estudos como o “*Clinical Antipsychotics Trial Intervention Effectiveness*” (CATIE) não observaram superioridade entre as duas classes, apesar da olanzapina destacar-se como fármaco de melhor eficácia global (Lieberman *et al.*, 2005). Estudo de meta-análise, com total de 21,533 pacientes, concluiu sobre a maior eficácia dos fármacos de segunda geração amisulprida, clozapina, olanzapina e risperidona (Leucht *et al.*, 2009; Nasrallah, 2008).

Alterações da homeostase energética estão associadas à terapêutica com os fármacos antipsicóticos. Embora os pacientes esquizofrênicos tenham maior prevalência nas doenças metabólicas em comparação com a população geral, o tratamento acentua esta tendência (Ryan *et al.*, 2003; Buse *et al.*, 2003). A obesidade é ainda mais frequente entre os pacientes tratados com antipsicóticos, principalmente de segunda geração (Newcomer *et al.*, 2007). Clozapina e olanzapina estão associadas ao maior ganho de peso, em média de 7 a 12 kg em um ano. A quetiapina e risperidona

causam ganho intermediário, enquanto a ziprasidona e aripiprazole estão associados ao menor ganho de peso da classe (Vestri *et al.*, 2007; Nasrallah, 2008; Newcomer *et al.*, 2007). O sistema dopaminérgico está no centro da patogênese e terapêutica da esquizofrenia. A maior propensão ao ganho de peso própria dos pacientes e a exacerbação ocasionada pelo uso dos fármacos indicam papel do sistema dopaminérgico no controle da homeostase energética.

1.3.8 A questão sobre a dopamina e o metabolismo

O sistema dopaminérgico faz parte do sistema de integração metabólica do SNC responsável por manter a homeostase energética corporal. Entretanto, as funções da dopamina no controle metabólico não são completamente compreendidas. Os modelos murinos sugerem que a redução da sinalização dopaminérgica resulta em hipofagia extrema. Apesar disso, a redução da sinalização através do receptor D2 está associada ao ganho de peso em humanos e participa da patogênese da disfunção no sistema de recompensa induzida pela dieta em ratos. Evidências indicam também que a cinética e o local de liberação do neurotransmissor estão relacionados com a modulação do metabolismo. O sistema dopaminérgico projeta para substratos neuronais diversos, influenciando vários comportamentos. Talvez os fenótipos observados nos modelos de roedores e em humanos explicitem a função mais expressiva da sinalização dopaminérgica em determinada condição. Como já discutido, a dopamina sinaliza através de cinco receptores, sendo que, até o momento, apenas a disfunção do receptor D2 tem sido associada aos distúrbios metabólicos.

Para ampliar o entendimento da função do sistema dopaminérgico na homeostase energética, sugere-se o estudo no verme *Caenorhabditis elegans*. O verme é um modelo invertebrado versátil que utiliza a dopamina como neurotransmissor e possui comportamentos simples. O entendimento das funções do sistema

dopaminérgico no *C. elegans* poderá elucidar novos mecanismos através dos quais a dopamina modula o balanço energético.

1.4 O modelo *Caenorhabditis elegans*

O verme *Caenorhabditis elegans* é um nematódeo pequeno, de vida livre, que habita solos úmidos, usa oxigênio atmosférico e bactérias como alimento. Foi introduzido por Sydney Brenner como modelo experimental para estudo do desenvolvimento e neurobiologia na década de 1970 (Figura 7) (Brenner, 1974).

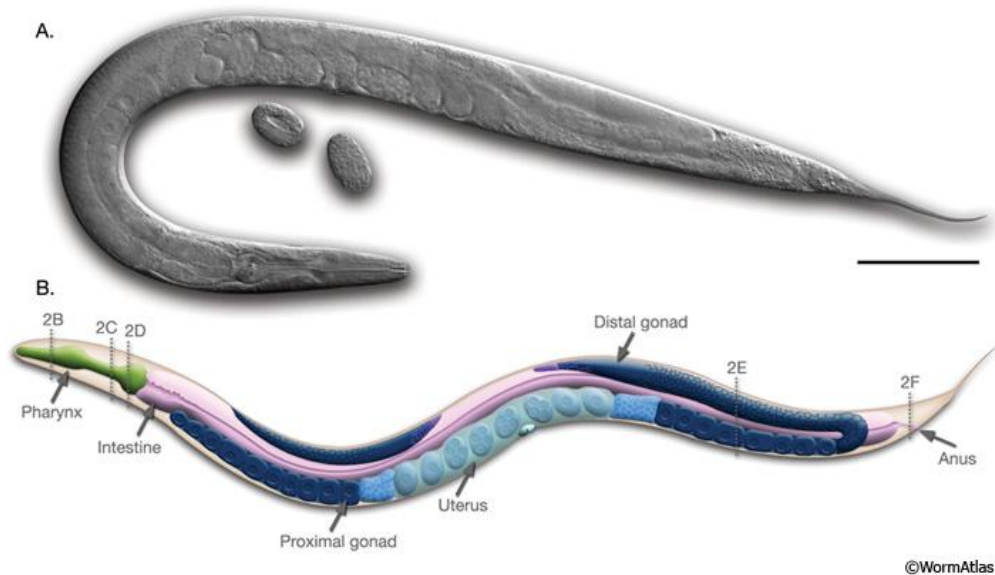


Figura 7 – O verme *Caenorhabditis elegans*.

Figura representativa do verme hermafrodita com algumas estruturas detalhadas. Adaptado de WormAtlas.

O verme é predominantemente hermafrodita e a reprodução por auto-fertilização torna fácil a manutenção de mutações gênicas. Tem ciclo de vida curto, composto por quatro estágios larvais e vida adulta, que dura aproximadamente 18 a 20 dias. Inicia a ovoposição após três dias a 20 °C e gera por volta de 300 progênes por animal. Seu cultivo é possível em laboratório utilizando placas contendo ágar e *Escherichia coli* como alimento. Características morfológicas, principalmente a transparência, permitem que técnicas não invasivas de visualização das estruturas celulares e de transcritos marcados com proteínas fluorescentes, mesmo que expressos em uma única célula, sejam empregadas.

O desenvolvimento celular é estereotipado e foi mapeado através da reconstrução de séries de microscopia eletrônica (White *et al.*, 1982). O genoma do verme foi o primeiro entre os organismos multicelulares a ser mapeado, sendo que conserva homologia de 60% a 80% com genes de mamíferos (Consortium, 1998). O genoma é composto de aproximadamente 20 mil genes distribuídos entre cinco pares de cromossomos autossomos e um par de cromossomos sexuais no verme hermafrodita, e apenas um cromossomo sexual no macho (Hodgkin, 2005). Devido ao conhecimento detalhado sobre a arquitetura genômica e a facilidade nas manipulações genéticas, centenas de alelos KO e linhagens transgênicas estão disponíveis englobando a maior parte dos genes do verme, o que permite análises detalhadas dos processos celulares.

O *C. elegans* é um organismo multicelular sofisticado, composto por 959 células que formam diferentes órgãos e tecidos no adulto hermafrodita. O sistema nervoso é o órgão mais complexo do verme. Compreende 302 neurônios e 56 células do tipo glia (Bargmann, 1998). Os neurônios estão concentrados principalmente no anel nervoso que circunda a faringe, na cadeia ou nervo corda ventral e na cauda. Os neurônios são classificados em sensoriais, motores, interneurônios ou de função mista baseado nas características morfológicas e funcionais conhecidas (Hall *et al.*, 2006). O verme sintetiza neurotransmissores presentes no SNC, incluindo serotonina, dopamina, glutamato, acetilcolina, GABA e numerosos neuropeptídeos (Bargmann, 1998). Proteínas da maquinaria sináptica como transportadores, enzimas de síntese e

receptores são conservadas quando comparadas com as presentes em mamíferos (Bargmann, 1998). O sistema nervoso do verme faz a integração e regulação das funções essenciais, controlando desenvolvimento, alimentação, movimento, metabolismo e reprodução (Rankin, 2002; de Bono e Maricq, 2005).

Embora seja um modelo avançado para o estudo de mecanismos moleculares, questiona-se até que ponto um verme pode ser usado como modelo de doenças humanas. Não existe correspondência direta entre as doenças humanas e os fenótipos do verme na maioria dos casos. É surreal esperar que um modelo invertebrado mimetize a patogênese das morbidades humanas. A principal vantagem do modelo é possibilitar o entendimento das interações moleculares, permitindo, dessa forma, pesquisas em modelos vertebrados ou clínicas mais embasadas. O *C. elegans* será modelo para os aspectos moleculares das doenças. Isto significa que havendo correspondentes moleculares no verme, semelhantes aos envolvidos em uma determinada doença humana, as interações poderão ser detalhadas e manipuladas e o conhecimento gerado aplicado no entendimento da doença. O modelo ainda tem a vantagem sobre técnicas *in vitro* e envolvendo culturas celulares, pois estuda as moléculas dentro do contexto multicelular e hierárquico (Kaletta e Hengartner, 2006).

1.4.1 O sistema dopaminérgico no verme

A presença de dopamina foi originalmente detectada no verme através de fluorescência induzida por formaldeído, e evidências sugerem sua função como neurotransmissor ou neuromodulador (Sulston *et al.*, 1975; Chase e Koelle, 2007). Análises genômicas e farmacológicas identificaram cinco receptores dopaminérgicos até o momento, sendo quatro ortólogos a receptores em mamíferos (Chase e Koelle, 2007; Ringstad *et al.*, 2009). E ainda, através da análise de fenótipos associados aos

mutantes para a maquinaria de síntese e receptores de dopamina, comportamentos específicos foram relacionados ao sistema dopaminérgico.

1.4.1.1 Anatomia, síntese, armazenamento e recaptação

Quatro pares de neurônios sintetizam dopamina no verme hermafrodita. Dois pares formam o grupo anterior, são os neurônios “*cephalic*” (CEP) ventrais, direito e esquerdo, e dorsais, direito e esquerdo. Seus corpos neuronais estão localizados no istmo entre o bulbo anterior e posterior, estando o grupo ventral à frente do anel nervoso e o dorsal à frente do bulbo posterior. Todos os neurônios CEP projetam estruturas parecidas com dendritos para a região anterior (nariz) do verme, onde terminam em contato com células especializadas, chamadas “*sheath*” e “*socket*”, formando uma terminação sensorial chamada “*Cephalic*”. Ambos projetam axônios para o anel nervoso, onde fazem contato entre eles e com outros neurônios. Entre os neurônios que o grupo CEP faz sinapse, estão incluídos neurônios importantes para a navegação e motricidade do verme (McDonald *et al.*, 2006; Sulston *et al.*, 1975).

O terceiro par de neurônios está localizado ventralmente, na parte de trás do bulbo posterior. São os neurônios “*deirid*” anterior (ADE) direito e esquerdo. Seus dendritos terminam num órgão sensorial localizado bilateralmente, na parte anterior do animal (cabeça), chamado deirídio anterior. As projeções axonais terminam no gânglio ventral, onde fazem conexão com outros neurônios envolvidos na resposta motora (McDonald *et al.*, 2006; Sulston *et al.*, 1975). O quarto e último par neuronal está localizado na região posterior do verme, entre a vulva e a cauda. São os neurônios “*deirid*” posterior (PDE) direito e esquerdo. Semelhante ao terceiro par, os neurônios do quarto par projetam estruturas parecidas com dendritos que terminam em um órgão sensorial chamado de deirídio posterior, localizado bilateralmente na região posterior do verme. Os axônios deste grupo neuronal projetam ao longo de uma estrutura chamada

nervo corda ventral, que percorre a região ventral do verme (McDonald *et al.*, 2006; Sulston *et al.*, 1975).

A bioquímica do sistema dopaminérgico no verme é semelhante à dos mamíferos. Através de técnicas genéticas foi identificada uma série de mutantes catecolaminérgicos (*cat*) que apresentaram redução da fluorescência induzida pelo formaldeído (Sulston *et al.*, 1975). A clonagem destes genes identificou proteínas que participam na síntese e armazenamento da dopamina no verme.

O gene *cat-2* codifica proteína homóloga à TH. Transgênicos expressando proteína GFP sob o controle do promotor de *cat-2* mostraram a presença da proteína nos neurônios dopaminérgicos, e a cepa mutante para o gene teve sua concentração de dopamina reduzida para aproximadamente 40% do normal (Lints e Emmons, 1999; Sanyal *et al.*, 2004). *Cat-2* codifica a proteína responsável pela catálise da hidroxilação do aminoácido tirosina formando L-DOPA, embora o verme seja capaz de sintetizar parcialmente dopamina na ausência da enzima.

Análise genética identificou que o gene *bas-1* codifica a enzima aminoácido aromático decarboxilase (AADC). Análise da expressão gênica revelou sua presença nos neurônios dopaminérgicos (Flames e Hobert, 2009; Nass e Blakely, 2003). Sugere-se que BAS-1 catalisa a decarboxilação da L-DOPA, formando dopamina.

O gene *cat-1* é homólogo ao VMAT, expresso em neurônios dopaminérgicos e codifica proteína que capta dopamina em modelo celular (Duerr *et al.*, 1999). Os mutantes *cat-1* não apresentam o padrão de acúmulo de dopamina normalmente observado nos terminais dopaminérgicos, fenótipo similar ao observado nos vermes selvagens tratados com reserpina, fármaco antagonista do VMAT em mamíferos (Sulston *et al.*, 1975). Transgênicos carregando a sequência selvagem do gene *cat-1* resgataram o déficit de fluorescência nos mutantes *cat-1* (Duerr *et al.*, 1999). *Cat-1* codifica a proteína responsável pelo transporte de dopamina do citosol para vesículas sinápticas.

Postulou-se que o término da transmissão dopaminérgica ocorreria, também, através da recaptação nos terminais neuronais. Análise genômica, utilizando como

base características estruturais da família de transportadores SLC6, que inclui o DAT humano, identificou gene codificador de proteína com aproximadamente 40% de homologia com o transportador de dopamina humano (Jayanthi *et al.*, 1998). Consistente com a predição molecular, células transfectadas com o cDNA correspondente captaram dopamina extracelular com cinética saturável, alta afinidade e antagonizável por inibidores clássicos do DAT humano, como cocaína e anfetaminas (Jayanthi *et al.*, 1998). Análise da expressão gênica mostrou a presença da proteína nos neurônios dopaminérgicos (Nass *et al.*, 2002). Sugere-se que o gene *dat-1* codifica o transportador de dopamina responsável pelo clareamento da dopamina liberada e, consequentemente, término da transmissão dopaminérgica no verme. Digno de nota, as análises farmacológicas envolvendo o DAT-1 mostram que a farmacodinâmica dos invertebrados difere em certos aspectos dos vertebrados. Por exemplo, os antidepressivos tricíclicos imipramina e desipramina, inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina em mamíferos, são potentes antagonistas de DAT-1 (Jayanthi *et al.*, 1998).

Dessa forma, o sistema dopaminérgico no verme utiliza processos de síntese e recaptação do neurotransmissor similar aos mamíferos. Da mesma forma, a liberação do neurotransmissor é consequência do aumento no cálcio intracelular, sendo que a dopamina liberada atua tanto em sinapses clássicas como através da transmissão por volume (Chase *et al.*, 2004).

1.4.1.2 Comportamentos que envolvem o sistema dopaminérgico do verme

O entendimento dos fenótipos relacionados com a dopamina é necessário para a definição de parâmetros simples mensuráveis para o estudo da sinalização. No verme, os comportamentos modulados pelo sistema dopaminérgico têm sido analisados em condições de redução ou aumento da sinalização dopaminérgica. Até o momento,

mostrou-se correlação entre a dopamina e os comportamentos motores, de ovoposição, defecação e de resposta a estímulos mecânicos.

Movimento

No verme, a exposição a 30 mM de dopamina causa paralisia reversível em um intervalo de 3 a 4 h (Schafer e Kenyon, 1995; Chase *et al.*, 2004). Mutantes com perda de função no gene *unc-2*, que codifica canal de cálcio sensível à voltagem, não se adaptam ao fenótipo (Schafer e Kenyon, 1995). Conclui-se que a dopamina reduz a movimentação no verme e que a adaptação e dessensibilização à ação do neurotransmissor depende da atividade do canal codificado por *unc-2* (Schafer e Kenyon, 1995).

“Basal slowing response”

Foi observado que o *C. elegans* reduz sua velocidade de locomoção quando entra em contato com o alimento (bactéria), fenótipo posteriormente desmembrado em dois, nomeados *“Basal slowing response”* (BSR) e *“Enhanced slowing response”* (ESR) (Sawin *et al.*, 2000). Verificou-se que a redução da locomoção é mediada pelos neurotransmissores dopamina e serotonina, dependendo da história alimentar prévia do animal. Em animais alimentados, a dopamina está envolvida na redução da movimentação (BSR), enquanto a serotonina é responsável pelo fenótipo mais intenso observado nos animais em jejum, que entram em contato com a bactéria (ESR) (Sawin *et al.*, 2000). Animais bem alimentados, mutantes para TH (*cat-2*), não reduzem a velocidade quando atingem a superfície bacteriana enquanto a suplementação com dopamina exógena resgata o fenótipo (Sawin *et al.*, 2000; Chase *et al.*, 2004). Através da ablação dos pares de neurônios dopaminérgicos, mostrou-se que a dopamina liberada pelos neurônios CEP, em resposta ao alimento, está relacionada com a redução da movimentação. Entretanto, a ablação do grupo neuronal CEP juntamente com o grupo ADE resgatou o fenótipo, o que sugere uma integração mais complexa dos sinais dopaminérgicos mediados por estes neurônios (Sawin *et al.*, 2000).

O fenótipo BSR pode ser desencadeado, também, por microesferas (Sephadex G-200) que mimetizam a estrutura física do tapete bacteriano (Sawin *et al.*, 2000). Isto

sugere que os neurônios dopaminérgicos são responsivos à estimulação mecânica. O que é consistente, também, com as características dos órgãos sensoriais formados pelos dendritos destes neurônios. E mais, as diferentes formas de modulação dopaminérgica do comportamento motor podem ser reminiscentes da modulação complexa observada nos vertebrados, possibilitando um modelo para seu estudo.

Busca em área restrita

Outro comportamento motor envolvendo o sistema dopaminérgico é chamado de “busca em área restrita” (BAR) (Hills *et al.*, 2004). O fenótipo consiste no aumento do número de curvas executadas pelo verme quando transportado da bactéria para uma área sem alimento, o que corresponde ao esgotamento da fonte alimentar no ambiente, com a manutenção temporária do animal naquela região. Após um período de tempo na área sem alimento, o número de curvas executadas é reduzido e a área de busca pelo alimento aumenta (Hills *et al.*, 2004). Interpreta-se que este comportamento evoluiu para manter o organismo próximo da área onde estava o alimento, o que estaria associado à maior probabilidade de outra fonte alimentar nas redondezas. O aumento da área de busca ao longo do tempo reflete que o mecanismo opera por determinado período de tempo. Em contraposição ao estímulo mecânico necessário para desencadear a BSR, apenas a bactéria foi capaz de desencadear a BAR (Hills *et al.*, 2004). Entretanto, a ablação dos neurônios dopaminérgicos reverteu a habilidade dos animais em aumentar a área de busca ao longo do tempo, indicando que a presença da dopamina, sináptica ou humoral, é necessária para o término da BAR. A ablação de neurônios dopaminérgicos específicos resultou em diferentes fenótipos, inclusive com aumento acentuado no número de curvas executadas pelo verme quando os grupos ADE e PDE foram eliminados simultaneamente (Hills *et al.*, 2004). Isto indica que sinais mediados por todos os grupos de neurônios dopaminérgicos interagem para o correto funcionamento da BAR.

Adaptação a estimulação mecânica

No verme, o toque na região anterior (nariz) ou o tapa na placa levam à inversão no sentido do movimento. Após uma série de toques ou tapas, o verme habitua ao

estímulo e não mais inverte o sentido do movimento (Rose e Rankin, 2001; Sanyal *et al.*, 2004). São vários os neurônios relacionados com este comportamento. Mutantes *cat-2* não se habituem à estimulação mecânica, o que pode ser resgatado pela exposição à dopamina exógena (Sanyal *et al.*, 2004). O fato de os neurônios dopaminérgicos não fazerem sinapse com todos os neurônios responsáveis por este fenótipo corrobora o funcionamento da dopamina através da transmissão por volume ou de maneira humoral (Sanyal *et al.*, 2004; Chase *et al.*, 2004).

Defecação

No *C. elegans*, um programa motor cíclico e estereotipado coordena eventos que envolvem o intestino, músculos e neurônios, resultando na expulsão do conteúdo intestinal. Cada ciclo de defecação está associado com flutuações nos níveis de cálcio intestinal e ocorre em intervalos de 45 a 50 segundos (Dal Santo *et al.*, 1999). A exposição a 30 mM de dopamina exógena diminuiu a frequência das contrações intestinais, resultando em ciclos de defecação intervalados por períodos maiores (Weinshenker *et al.*, 1995). Clorpromazina, haloperidol, butaclamol, entre outros antagonistas dos receptores D2 humanos, foram capazes de recuperar a periodicidade das contrações intestinais, sugerindo participação dos receptores D2 na determinação da frequência cíclica. O fenótipo, decorrente do tratamento com dopamina, é mimetizado no mutante para um canal de potássio, com ganho de função, *egl-2*, sendo proposto que a ação da dopamina ou dos antagonistas ocorreria através da acentuação ou redução da atividade do canal, respectivamente (Weinshenker *et al.*, 1995). Considerando-se que a modulação de canais de potássio pelo sistema dopaminérgico ocorre também no SNC (Podda *et al.*, 2010), a avaliação da sinalização no verme pode esclarecer aspectos sobre esta interação.

Ovoposição

Os vermes hermafroditas produzem esperma durante o desenvolvimento, o qual fica armazenado na espermateca, e, posteriormente, iniciam a produção de oócitos. Após a muda do estágio larval L4 para adulto, inicia-se o acúmulo de ovos fertilizados no útero do animal, que estoca entre 10 e 15 ovos durante o período fértil (Schafer,

2005). A ovoposição é um processo de contração de músculos especializados que abrem a vulva, permitindo que os ovos sejam expelidos. O comportamento é regulado por informações homeostáticas e ambientais (Schafer, 2005). O tratamento agudo com 30 mM de dopamina reduz a frequência da ovoposição (Schafer e Kenyon, 1995). O fenômeno sofre adaptação e, após um período de algumas horas, volta ao normal mesmo que ocorra aumento na concentração de dopamina exógena (Schafer e Kenyon, 1995). Análise genética revelou que cepas carreando mutações com perda de função do gene *unc-2* são resistentes ao efeito da dopamina na ovoposição. A interferência deste canal com comportamentos relacionados com o sistema dopaminérgico já foi descrita para o movimento. O gene *unc-2* codifica o canal de cálcio sensível à voltagem e sugere-se que a ativação desse canal é necessária para o efeito da dopamina sobre a ovoposição (Schafer e Kenyon, 1995). A serotonina, ao contrário da dopamina, estimula a ovoposição. Entretanto, o tratamento agudo e simultâneo com ambas as aminas reduz o aumento desencadeado pela serotonina (Dempsey *et al.*, 2005). Essa redução não foi observada nos mutantes para o receptor serotoninérgico MOD-1 (Dempsey *et al.*, 2005). O receptor MOD-1 é um canal de cloreto acoplado ao ligante, no caso a serotonina, e sugere-se que, apesar de o receptor não ser necessário para a resposta da ovoposição à serotonina, ele é modulado pela dopamina para reduzir o aumento provocado pela serotonina.

1.4.1.3 Receptores dopaminérgicos no verme

A modulação dos comportamentos pelo sistema dopaminérgico ocorre através da ativação de receptores. Análises genômicas, bioquímicas e farmacológicas revelaram, até o momento, cinco receptores para dopamina no verme: DOP-1, DOP-2, DOP-3, DOP-4 e LGC-53.

DOP-1

A análise transducional do genoma do verme, utilizando sequência de aminoácidos de receptores dopaminérgicos humanos, revelou homologia entre o gene F15A8.5 e receptores D1-like (Suo *et al.*, 2002). Análise experimental revelou três transcritos para o gene, enquanto a análise computacional da estrutura do gene acrescenta mais um transcrito cuja expressão ainda não foi detectada (Suo *et al.*, 2002; Sanyal *et al.*, 2004; McDonald, 2006). A expressão do gene em modelo celular mostrou maior afinidade de ligação para a dopamina comparado às outras monoaminas presentes no verme (Suo *et al.*, 2002). A dopamina é capaz de induzir a ligação de GTP nas isoformas longa e curta do receptor – o que é sensível à toxina colérica –, estimular a produção de AMP-cíclico e abrir canais de potássio ativados pela subunidade $G_{\alpha s}$ em modelo celular (Sanyal *et al.*, 2004). Estas evidências indicam que o gene F15A8.5 codifica um receptor acoplado à proteína G_s , funcionalmente semelhante aos receptores dopaminérgicos D1-like e nomeado DOP-1.

A análise farmacológica revelou que a farmacodinâmica dos receptores DOP-1 difere quando comparado com receptores do grupo homólogo em mamíferos (Sanyal *et al.*, 2004). Sugere-se que, apesar das semelhanças na sinalização celular, as propriedades farmacológicas dos receptores de invertebrados e vertebrados são diferentes.

Construções com proteínas fluorescentes, sob o controle da possível região promotora do gene, mostraram a expressão do receptor nos neurônios PLM, PHC, ALM, RIM, AUA, RIB e neurônios colinérgicos presentes na corda nervosa ventral (Sanyal *et al.*, 2004; Chase *et al.*, 2004).

A análise do fenótipo dos mutantes *dop-1* revelou aumento na velocidade de adaptação à estimulação mecânica, que foi resgatado na cepa *dop-1* transgênica carreando construção com a sequência do gene selvagem (Sanyal *et al.*, 2004). A adaptação ao estímulo mecânico também ocorreu mais rapidamente nos vermes em jejum, sugerindo influência do estado metabólico no fenótipo (Kindt *et al.*, 2007). Considerando que a dopamina é liberada através de neurônios primariamente

mecanorreceptores, sugere-se que o neurotransmissor modula o aprendizado relacionado com a estimulação mecânica através dos receptores DOP-1 (Kindt *et al.*, 2007). As análises do fenótipo mostraram também que os receptores DOP-1 influenciam a velocidade do aprendizado pela modulação da via de sinalização proteína Gq/PLC- β /cálcio (Kindt *et al.*, 2007). Isto indica que os receptores dopaminérgicos sinalizam por outras vias de sinalização além da proteína G/AMP-cíclico.

DOP-2

Baseado na análise da sequência de aminoácidos predita no genoma do verme, o gene K09G1.4 mostra similaridade com o grupo D2-like de receptores dopaminérgicos, em especial com o receptor D2 (Suo *et al.*, 2003). A análise dos transcritos do gene mostrou que são expressas duas isoformas que diferem em 135 aminoácidos na região da terceira alça intracelular (Suo *et al.*, 2003). Está é a mesma região que origina as diferentes isoformas do receptor D2 humano (McDonald *et al.*, 2006). As isoformas do receptor mostraram maior afinidade pela dopamina comparado às outras monoaminas em modelo celular (Suo *et al.*, 2003). Novamente, o perfil farmacológico do receptor não seguiu o previsto pelas análises do receptor D2 humano (Suo *et al.*, 2003). Sabe-se que células transfectadas com proteína fluorescente sensível ao AMP-cíclico e tratadas com forskolin têm aumento da fluorescência. A cotransfecção do receptor e o tratamento concomitante com dopamina reduziram o aumento da fluorescência, o que é indicativo da ação inibidora da adenilato ciclase pelo receptor, com consequente redução na concentração de AMP cíclico. Isto é classicamente associado com os receptores D2-like em mamíferos (Suo *et al.*, 2003). Sugere-se que o gene K09G1.4 codifica um receptor dopaminérgico acoplado à proteína G, funcionalmente semelhante aos receptores D2-like de vertebrados e nomeado DOP-2.

A análise de cepas transgênicas carreando proteínas fluorescentes, sob o controle de expressão da suposta região promotora do gene *dop-2*, indica expressão nos grupos de neurônios dopaminérgicos ADE, CEP e PDE. Este padrão de expressão sugere uma função autorreguladora para estes receptores (Suo *et al.*, 2003). Utilizando

uma região intergênica maior, observa-se a expressão também nos neurônios PDA, RIA, RID, SIA e SIB (Suo *et al.*, 2004).

Análise da cepa mutante para o gene *dop-2* revelou participação no controle do número de curvas executadas pela cabeça do animal e na adaptação ao movimento em ambiente líquido (Suo *et al.*, 2004).

DOP-3

As análises baseadas no algoritmo BLAST, utilizando as sequências do receptor D2 humano e do receptor DOP-2 do verme, mostraram alta homologia comparada ao gene T14E8.3 (Chase *et al.*, 2004). Já a análise computacional da estrutura do gene resultou em quatro possíveis transcritos (McDonald *et al.*, 2006). Entretanto, a análise dos cDNAs revelou a expressão de apenas duas isoformas cuja similaridade com os sete domínios transmembrana do receptor D2 humano inclui uma longa terceira alça intracelular, uma região C-terminal curta, sequências consenso para fosforilação, entre outras características (Chase *et al.*, 2004; Sugiura *et al.*, 2005). Da mesma forma que com o receptor DOP-2, o tratamento com dopamina de células cotransfectadas com a isoforma “c” do receptor DOP-3 e com proteína fluorescente sensível à concentração de AMP-cíclico reduziu o nível de fluorescência (Sugiura *et al.*, 2005). Isto indica que a ativação do receptor leva à redução da atividade da enzima adenilato ciclase. A transfecção da isoforma “d” não alterou a concentração de AMP-cíclico e questiona-se a possibilidade desta isoforma se acoplar à isoforma “c” funcional, reduzindo a transdução de sinal (Sugiura *et al.*, 2005). Sugere-se que o gene T14E8.3 codifica um receptor dopaminérgico semelhante aos receptores D2-like e foi nomeado de DOP-3.

A análise da expressão do receptor através de indicadores fluorescentes mostrou a presença de DOP-3 nos neurônios PVD, neurônios GABAérgicos e colinérgicos da cadeia de neurônios ventrais, em neurônios não identificados na cabeça e cauda e em células musculares (Chase *et al.*, 2004).

As análises dos mutantes para o gene *dop-3* revelaram relação no controle da motricidade. Mutantes *dop-3* não apresentaram a BSR quando atingiram o tapete de bactérias, o que foi revertido no mutante *dop-3* transgênico carreando a sequência do

receptor selvagem (Chase *et al.*, 2004). A análise da relação com outros receptores dopaminérgicos demonstrou que os mutantes duplos *dop-1;dop-3* apresentam a BSR similar aos vermes selvagens (Chase *et al.*, 2004). Isto sugere um antagonismo dos receptores DOP-1 e DOP-3 na motricidade, e considerando que ambos são expressos nos neurônios colinérgicos da cadeia nervosa ventral relacionados com a estimulação da contração muscular, sugere-se que este pode ser um dos sítios de interação entre os dois. E mais, os mutantes *dop-3* foram parcialmente resistentes à paralisia induzida por 30 mM de dopamina exógena, o que foi revertido pela expressão do receptor selvagem nos neurônios colinérgicos sob o controle do promotor do gene *acr-2* (Chase *et al.*, 2004). Isto sugere que a dopamina exógena paralisa o verme através do mesmo mecanismo usado para redução do movimento pelo sistema dopaminérgico endógeno. E ainda, os duplos mutantes *dop-1; dop-3* apresentaram fenótipo de paralisia induzida por dopamina similar aos selvagens (Chase *et al.*, 2004). Isto indica que é necessária a funcionalidade dos receptores DOP-1 e DOP-3 nos neurônios colinérgicos da cadeia de neurônios ventral para a modulação da locomoção. Corrobora-se ainda a ação humoral da dopamina no verme, considerando a ausência de sinapses entre os neurônios dopaminérgicos e os neurônios motores colinérgicos.

DOP-4

A análise genética baseada em sequências de outros receptores dopaminérgicos também identificou o gene C52B11.3 como possível receptor para dopamina no verme (Sugiura *et al.*, 2005). Análise dos cDNAs revelou a presença de apenas um transcrito do gene (Sugiura *et al.*, 2005). A sequência de aminoácidos predita mostra que a proteína tem sete domínios transmembrana, com resíduos específicos da superfamília dos receptores de bioaminas. Contém, ainda, sítios de glicosilação extracelular e sequências consenso para fosforilação nos domínios intracelulares (Sugiura *et al.*, 2005). Essas características associadas à homologia com receptores dopaminérgicos mostram semelhança com os receptores do grupo D1-like, específicos de invertebrados. Quando comparado com receptores de monoaminas humanos, o receptor assemelha-se aos receptores α_1 adrenérgicos (Sugiura *et al.*, 2005). Análise funcional mostrou que o receptor tem maior afinidade pela dopamina quando

comparado às outras bioaminas. E mais, a dopamina foi capaz de aumentar a fluorescência produzida por proteína fluorescente sensível à concentração de AMP-cíclico, o que sugere que o receptor acentua a atividade da enzima adenilato ciclase (Sugiura *et al.*, 2005). Considerando as características funcionais do receptor, foi proposta sua classificação como semelhante ao grupo D1-*like* humano e nomeou-se o gene de *dop-4*.

Através da fusão da região predita promotora do gene com proteína fluorescente, observou-se a expressão nos neurônios I1, I2, ASG, AVL, CAN, PQR, neurônios não identificados da cabeça, nas células da vulva, intestino, glândula retal e células epiteliais (Sugiura *et al.*, 2005). Este padrão de expressão sugere possibilidades na modulação de vários comportamentos e funções fisiológicas e, ainda, corrobora a ação humoral da dopamina no verme. Fenótipos específicos não foram descritos no mutante *dop-4*.

LGC-53

Além dos receptores com sete domínios transmembrana, as monoaminas também se ligam a canais iônicos acoplados ao ligante. Este grupo de receptores inclui, por exemplo, o receptor de serotonina 5-HT_{3A} humano e o já citado receptor, também para serotonina, MOD-1 no verme. Ambos são canais iônicos que se abrem quando interagem com o ligante. Utilizando características presentes no receptor MOD-1, foram identificados 26 candidatos a canais iônicos acoplados ao ligante no genoma do verme. Destes, 23 apresentaram características de canais de cloreto (Ringstad *et al.*, 2009). A expressão e análise da atividade destes canais em modelo celular revelaram que o canal LGC-53 foi ativado e com alta afinidade pela dopamina (Ringstad *et al.*, 2009).

A Análise farmacológica demonstrou que os fármacos haloperidol, risperidona e spiperona, utilizados clinicamente como antipsicóticos, são antagonistas do canal (Ringstad *et al.*, 2009). Sugere-se a possibilidade da existência de receptores canais para dopamina em mamíferos que poderiam ser alvo de alguns fármacos antipsicóticos. Não foram descritas anormalidades no fenótipo dos mutantes para o gene *lgc-53* até o momento (Ringstad *et al.*, 2009).

1.4.2 O verme: modelo para estudo do metabolismo

O verme pode ser utilizado como modelo para doenças metabólicas (Kaletta e Hengartner, 2006; Ashrafi, 2007). Os triglicérides são utilizados como as principais moléculas de armazenamento energético. No verme, o conteúdo lipídico é regulado pelo sistema nervoso através da modulação da alimentação e atividade metabólica. O conhecimento do genoma permitiu a identificação de inúmeros genes que codificam fatores que regulam o armazenamento, transporte, síntese e oxidação de lípidos e outros nutrientes, como também de vias neuroendócrinas e relacionadas ao comportamento alimentar. Grande parte desses genes apresentam ortólogos nos vertebrados (Mullaney e Ashrafi, 2009).

Apesar das semelhanças, algumas diferenças merecem atenção. Enquanto os mamíferos não são capazes de sintetizar todas as espécies de ácidos graxos, o verme possui aparato enzimático que permite a síntese de ácidos graxos polinsaturados (Watts e Browse, 2002). O verme não possui tecido de armazenamento especializado e o excesso energético é armazenado nos enterócitos, células da hipoderme e gônada (Ashrafi, 2007). A ausência dos adipócitos, juntamente com a do hormônio leptina, retira de cena componentes centrais no controle do metabolismo energético em mamíferos. Entretanto, esta condição pode ser vantajosa ao facilitar a interpretação de outros fatores e mecanismos conservados e envolvidos na homeostase energética. Isto é exemplificado pela análise da redução da expressão de 80% dos genes do verme (Ashrafi *et al.*, 2003). Mostrou-se que 417 genes modulam os estoques de gordura, sendo que metade dos genes homólogos nos mamíferos não eram, até então, relacionados com a regulação do metabolismo energético (Ashrafi *et al.*, 2003).

1.4.2.1 Composição lipídica

No *C. elegans*, a composição lipídica varia dependendo do estágio larval, temperatura de crescimento e dieta (Ashrafi, 2007). Em média, nas condições padrão de cultivo, as porcentagens das espécies lipídicas no verme adulto jovem são: 40% a 55% triglicérides e 60% a 45% lípides polares. No grupo dos lípides polares, 55% correspondem à fosfatidiletanolamina, 32% à fosfatidilcolina, 8% à esfingomiéline e os 5% restantes às espécies cardiolipina, fosfatidilinositois e outras (Ashrafi, 2007).

O verme é auxotrófico para o colesterol, necessitando de suplementação dietética (Kurzchalia e Ward, 2003). Devido à pequena quantidade necessária, acredita-se que o esterol seja precursor de hormônios. Alterações no crescimento, perfil lipídico e de longevidade são alguns dos fenótipos observados nos vermes sem colesterol na dieta (Ashrafi, 2007; Morck *et al.*, 2009).

1.4.2.2 Síntese, degradação, absorção intestinal e transporte de ácidos graxos

O verme adulto obtém ácidos graxos através da síntese endógena ou da absorção intestinal dos lípides dietéticos. A síntese endógena, ou síntese *de novo*, inicia-se com a carboxilação do acetil-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase, codificada pelo gene *pod-2*, gerando malonil-CoA. Este, juntamente com outras moléculas de acetil-CoA, é substrato para a enzima ácido graxo sintase, codificada pelo gene *fasn-1*, sintetizar ácido palmítico (C16:0). A carboxilação do isobutiril-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase, na primeira reação da síntese, resulta na produção de ácidos graxos monometilados (Kniazeva *et al.*, 2004). A comparação entre as duas fontes de obtenção dos lípides mostrou que a maioria provém da dieta (Perez e Van

Gilst, 2008). A síntese *de novo* contribui especialmente com espécies não disponíveis na dieta bacteriana, como ácido oleico (C18:1 Δ 9) e ácidos graxos polinsaturados (Perez e Van Gilst, 2008).

O genoma do *C. elegans* codifica desaturases e elongases necessárias para a síntese de ácido linoleico (C18:2 ω 6) e linolênico (C18:3 ω 3), possibilitando ao verme obter todos os tipos de ácidos graxos insaturados necessários (Watts e Browse, 2002). As enzimas FAT-5, FAT-6 e FAT-7 são Δ 9 desaturases que sintetizam ácidos graxos monoinsaturados utilizados na síntese de triglicérides e fosfolípides. A deleção simultânea das três enzimas é letal, enquanto mutantes para cada uma apresentam anormalidades fenotípicas envolvendo alterações de crescimento e da reserva energética (Brock *et al.*, 2006; Van Gilst *et al.*, 2005a). O genoma codifica nove elongases, *elo-1* a -9, com diferentes padrões de expressão. O KD de *elo-1* não altera as características morfológicas do verme apesar de alterar o perfil lipídico, enquanto o KD de *elo-2* causa alterações no crescimento, reprodução e metabolismo (Kniazeva *et al.*, 2003).

O genoma do *C. elegans* codifica proteínas com sequências homólogas às translocases de ácidos graxos, proteínas ligadoras de ácidos graxos, proteínas ligadoras de acil-CoAs, carnitina-palmitoil transferases e proteínas transportadoras de ácidos graxos com cassete-de-ligação-ATP. Em mamíferos, estas proteínas estão associadas ao transporte de ácidos graxos através de membranas e no tráfico inter e intracelular (van Meer, 2005). Mutantes com perda de função ou silenciamento gênico por RNAi de membros dessas famílias apresentam alterações no fenótipo lipídico (Ashrafi *et al.*, 2003).

A absorção intestinal dos ácidos graxos está associada ainda com o fluxo de prótons na membrana celular intestinal. A perda de função de PEPT-1, um transportador intestinal de peptídeos localizado na membrana apical, diminui o influxo celular de prótons, o que resulta no aumento do mecanismo de *flip-flop* e consequente aumento da captação de ácidos graxos e da reserva energética (Spanier *et al.*, 2009). Já a perda de função de NHX-2, um trocador sódio-potássio intestinal, acidifica as células intestinais diminuindo captação de ácidos graxos, o que reduz a reserva

energética do verme (Spanier *et al.*, 2009). PEPT-1 está também relacionado às alterações da reserva energética do verme decorrentes da alimentação com diferentes dietas (Brooks *et al.*, 2009). Estas evidências corroboram que grande parte da reserva energética no verme depende da captação dos ácidos graxos da dieta.

O sistema de transporte lipídico entre os tecidos do verme ainda está pouco caracterizado. A associação de lípidos com vitelogeninas, formando partículas de vitelo semelhantes à lipoproteína LDL, está aliada com o transporte energético do intestino para as células gonadais (Fares e Grant, 2002).

No verme, a liberação calórica dos ácidos graxos para a produção de ATP ocorre através de processos oxidativos. A oxidação dos ácidos graxos ocorre nas mitocôndrias e peroxissomos resultando na formação de acetil-CoA, que alimenta o ciclo do ácido tricarboxílico, e de elétrons que alimentam a cadeia respiratória mitocondrial (Zhang *et al.*, 2010). Ambas as organelas usam as mesmas reações oxidativas, sendo que os peroxissomos tendem a oxidar ácidos graxos com cadeias carbônicas maiores, enquanto as mitocôndrias processam os ácidos graxos menores (Zhang *et al.*, 2010). Outra diferença é que nos peroxissomos a primeira reação oxidativa é catalisada pela acil-CoA oxidase e os elétrons são exportados para as mitocôndrias devido a ausência das proteínas componentes da cadeia respiratória nesta organela (Zhang *et al.*, 2010).

1.4.2.3 Controle neuroendócrino e sensores do metabolismo

Da mesma forma que no SNC dos mamíferos, o sistema nervoso do verme mantém a homeostase energética através da integração de informações internas e externas e de respostas envolvendo o comportamento alimentar e o metabolismo.

Insulina e TGF- β

O desenvolvimento larval alternativo, chamado “*dauer*”, ocorre em situações adversas para o verme (Hu, 2007). A larva “*dauer*” é caracterizada pelo acúmulo de gordura e sua formação é modulada pela sinalização através do receptor de insulina e TGF- β (Kimura *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997; Patterson *et al.*, 1997; Cunningham e Ashrafi, 2009). A redução da atividade de ambas as vias resulta no acúmulo de gordura também no verme adulto (Kimura *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997; Patterson *et al.*, 1997). O gene *daf-7* codifica um peptídeo, semelhante ao TGF- β , expresso nos neurônios ASI, e sua secreção ocorre em condições ambientais favoráveis (Jeong *et al.*, 2005). Assim, os neurônios do verme integram informações sobre as condições ambientais para modular a homeostase energética.

De maneira similar, muitos dos peptídeos relacionados com a insulina são expressos em neurônios e a secreção está relacionada a alterações na disponibilidade do alimento (Pierce *et al.*, 2001). Os vermes mutantes para o gene *daf-2*, que codifica o receptor de insulina, tem aumento da quantidade de gordura e da longevidade (Kimura *et al.*, 1997). Medições bioquímicas e de expressão gênica mostraram que as alterações observadas nos mutantes *daf-2* mimetizam aquelas que ocorrem nos vermes em jejum (Burnell *et al.*, 2005; Holt e Riddle, 2003; Lee *et al.*, 2003).

Serotonina

A serotonina influencia o metabolismo lipídico do verme. A deleção da enzima limitante na síntese do neurotransmissor, triptofano hidroxilase (TPH-1), causa acúmulo de gordura (Sze *et al.*, 2000). A produção do neurotransmissor está confinada à alguns neurônios. Exposição à serotonina exógena reduz a quantidade de gordura pelo aumento da degradação lipídica através da β -oxidação, ao mesmo tempo que aumenta a quantidade de alimento ingerida pelo verme (Srinivasan *et al.*, 2008). Sugere-se que isso ocorre através de interações independentes com neurônios expressando TGF- β e outros expressando glutamato (Greer *et al.*, 2008).

Sensores metabólicos

Os sensores metabólicos no verme também detectam alterações nos macronutrientes e moléculas energéticas, desencadeando respostas que mantêm a oferta energética estável nas células (Ashrafi, 2006). Sugere-se a função de sensor metabólico para a proteína de ligação ao elemento de resposta ao esterol (SREBP), um fator de transcrição que regula a síntese de lípidos. A inibição ou perda de função do gene codificador *sbp-1* causa redução na quantidade de gordura no animal, e modificações na quantidade de carboidratos das placas de cultivo alteraram a composição lipídica através de via envolvendo a proteína (McKay *et al.*, 2003; Nomura *et al.*, 2010).

A família dos receptores nucleares de hormônios (NHR) também funciona como sensores metabólicos. A redução da expressão ou deleção do gene *nhr-49* eleva a quantidade de gordura estocada no animal (Ashrafi *et al.*, 2003; Van Gilst *et al.*, 2005b). Análise da expressão gênica nesses mutantes revelou infrarregulação de enzimas da β -oxidação mitocondrial, o que justificaria o fenótipo (Van Gilst *et al.* 2005b).

A quinase alvo-da-rapamicina (TOR) é outro importante sensor metabólico presente em dois complexos proteicos, TORC1 e TORC2 (Soulard *et al.*, 2009). No verme, o componente do complexo TORC2, *Rictor*, foi relacionado com a modulação dos estoques lipídicos. Mostrou-se que mutantes para seu gene codificar, *ric-1*, têm aumento dos estoques de gordura (Jones *et al.*, 2009). Observou-se também que a redução de expressão de outros componentes do complexo levou ao acúmulo de gordura, o que sugere que a modulação da atividade do complexo regula o metabolismo lipídico (Jones *et al.*, 2009).

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

Estudar a relação entre o sistema dopaminérgico e a homeostasia energética no modelo *Caenorhabditis elegans*.

2.2 Objetivos específicos

- 1 – Verificar se a dopamina exógena influencia o perfil lipídico do verme.
- 2 – Analisar se a dopamina influencia a quantidade de gordura através dos receptores dopaminérgicos.
- 3 – Determinar se o efeito metabólico das modificações no sistema dopaminérgico não é consequência secundária de outros comportamentos modulados pelo neurotransmissor.
- 4 – Analisar se a dopamina participa do controle das vias metabólicas no verme.

3 Métodos

3.1 Manutenção e cultura do verme *C. elegans*

Os vermes foram mantidos em condições-padrão de cultura, em placas de cultivo contendo NGM (3 g/L NaCl; 17 g/L ágar; 2,5 g/L peptona; 1 mM CaCl_2 ; 5 mg/L colesterol; 1 mM MgSO_4 ; 25 mM KPO_4^{2-}) como descrito previamente (Brenner, 1974). Utilizou-se como alimento a bactéria *Escherichia coli* cepa OP50 devido ao seu perfil nutricional e às suas características de crescimento lento e limitado que permitem a visualização dos vermes na placa.

Os vermes selvagem e mutantes foram adquiridos do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC – *University of Minnesota*), exceto pelas cepas CF2808 e CF2805, adquiridas do laboratório da Prof^a. Kenyon, e KQ1388 cedida pelo Prof. Ashrafi. Todas as cepas foram checadas para a mutação de interesse através de PCR nos laboratórios de origem. A cepa selvagem utilizada foi a N2, variante Bristol. As cepas mutantes utilizadas no trabalho estão listadas na tabela 2.

Tabela 2 – Cepas mutantes utilizadas.

Nome	Gene	Alelo
LX636	<i>dop-1</i>	<i>vs101</i>
LX702	<i>dop-2</i>	<i>vs105</i>
LX703	<i>dop-3</i>	<i>vs106</i>
RB1254	<i>dop-4</i>	<i>ok1321</i>
MT13952	<i>lgc-53</i>	<i>n4330</i>
CB1112	<i>cat-2</i>	<i>e1112</i>
LC33	<i>bas-1</i>	<i>tm351</i>
LX706	<i>dop-1;dop-2</i>	<i>vs100;vs105</i>
LX705	<i>dop-1;dop-3</i>	<i>vs100;vs106</i>
CF2808	<i>dop-1;dop-4</i>	<i>vs100;ok1321</i>
LX704	<i>dop-2;dop-3</i>	<i>vs105;vs106</i>
LX734	<i>dop-1;dop-2;dop-3</i>	<i>vs100;vs105;vs106</i>
CF2805	<i>dop-1;dop-2;dop-3;dop-4</i>	<i>vs100;vs105;vs106;ok1321</i>
KQ1388	<i>acs-3</i>	<i>ft5</i>

Em todos os experimentos as cepas foram mantidas a 20 °C.

Para os experimentos, os vermes foram sincronizados através do método do hipoclorito. Animais saudáveis, em placas não contaminadas, foram coletados em tubos de 15 mL. Após lavar uma vez com S-basal (5,85 g/L NaCl; 1 g/L K₂HPO₄; 6 g/L KH₂PO₄; 5 mg/L Colesterol) e centrifugar (3000 g por 30 segundos) para sedimentação dos vermes, foram adicionados 5 mL de solução de sincronização (3,75 mL H₂O_{dd}; 250 µL 10 N NaOH; 1 mL água sanitária comercial). A lise dos vermes foi monitorada através de lupa e o intervalo de contato com a solução não excedeu 5 minutos. Este cuidado é importante para não haver lesão dos ovos. Após a lise de aproximadamente 50% dos animais, os tubos foram preenchidos com S-basal e centrifugados. O pelete foi lavado três vezes com S-basal e, após a última lavagem, adicionado a 3 mL da mesma solução. O processo mata todos os vermes em estágios larvais ou adulto, mas preserva os ovos. Os tubos foram incubados a 20 °C durante a noite, sob agitação. Os ovos eclodiram e pararam o desenvolvimento no estágio larval L1 inicial por não haver

alimento disponível. Após este período, os vermes sincronizados no estágio larval L1 foram usados para os experimentos.

3.2 Tratamento com dopamina exógena

Hidrocloreto de dopamina (Sigma – H8502) foi dissolvido em 0,1 M HCl e adicionado nas placas, contendo NGM e bactéria, na concentração desejada. As placas foram guardadas durante a noite, com intuito de obter homogeneidade do neurotransmissor no ágar, e utilizadas no dia seguinte. A solução 0,1 M HCl foi utilizada como veículo nas placas controle.

Para a avaliação do perfil lipídico utilizando corantes vitais e nos ensaios comportamentais, vermes no estágio L4 tardio, da mesma população, foram transferidos para placas contendo veículo ou dopamina, e a fluorescência ou comportamento medidos após 24 horas ou outro intervalo determinado.

Para a avaliação do perfil lipídico através das análises bioquímicas ou nos vermes fixados, animais no estágio L3, da mesma população, foram transferidos para placas contendo veículo ou dopamina e analisados, 24 horas depois, no estágio L4 tardio. Esta estratégia foi adotada para evitar que embriões presentes no útero dos animais no estágio adulto tivessem influência nos resultados, considerando que não é possível distinguir o sinal proveniente dos diversos tecidos com estas técnicas.

3.3 Ensaio de batimento faríngeo

O ensaio seguiu protocolo baseado na literatura (Wang *et al.*, 2008). O batimento faríngeo foi medido à temperatura de 22 °C, em animais saudáveis, sobre o tapete de bactérias, para cada tempo e condição. O número de contrações do bulbo posterior da faringe de cada verme foi contado por um período de 10 segundos, em triplicata, e a média multiplicada por seis, resultando no número de contrações/minuto. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes em dias separados.

3.4 Ensaio de movimento

Protocolo corrente na literatura foi adaptado para o “*setup*” de microscopia do laboratório (Ramot *et al.*, 2008). Animais foram transferidos individualmente para novas placas semeadas com 100 µL de bactéria, contendo veículo ou dopamina na concentração desejada. Após período de adaptação de 10 minutos, foram filmados durante um minuto, por câmera CCD, ajustada à velocidade de ~12 imagens/segundo, acoplada a uma lupa. A velocidade média dos vermes foi determinada através da função de rastreamento do software de análise da Nikon. Os experimentos ocorreram à temperatura de 22 °C e foram repetidos duas vezes em dias separados.

3.5 Ensaio de defecação

O comportamento foi analisado através de protocolo previamente estabelecido (Wang *et al.*, 2008). Os animais foram monitorados sobre o alimento, nas placas contendo veículo ou dopamina. A defecação de cada verme foi obtida nos três intervalos entre os ciclos. O ciclo de defecação foi identificado pelo padrão estereotipado de contração peristáltica que ocorre no intestino do animal seguida da expulsão das fezes. A média das três medições foi utilizada. Os experimentos foram realizados à temperatura de 22 °C e repetidos duas vezes em dias diferentes.

3.6 Ensaios de reprodução

A reprodução foi avaliada através de ensaios estabelecidos na literatura (Wang *et al.*, 2008; Schafer e Kenyon, 1995). Foram utilizados animais bem alimentados, tratados com veículo ou dopamina. O número de ovos dentro do útero foi determinado através da contagem após lise de cada verme. A medição da taxa de ovoposição foi determinada pela transferência de cada verme para nova placa por um intervalo de uma hora. No dia seguinte, foi contado o número de larvas presentes na placa. Os experimentos foram realizados à temperatura de 22 °C e repetidos pelo menos duas vezes em diferentes ocasiões.

3.7 Marcação lipídica com corantes vitais e aquisição das imagens

A marcação lipídica com os corantes vitais *Nile Red* e BODIPY seguiu protocolo previamente estabelecido (Ashrafi *et al.*, 2003; Mak *et al.*, 2006). Soluções estoque de *Nile Red* (Sigma – N3013) e ácido graxo marcado com fluoróforo BODIPY ((C1-BODIPY-C12) Invitrogen) foram diluídas em 1x PBS (8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 1,44 g/L Na₂HPO₄; 0,24 g/L KH₂PO₄ (pH 7,4)) e adicionadas em placas contendo NGM na concentração final de 50 nM e 0,02 µg/mL, respectivamente. Vermes, no mesmo estágio de desenvolvimento, foram selecionados ao acaso, utilizando uma lupa simples, e paralisados em 8 µL de ázida sódica 50 mM. Foram montados em lâminas contendo tapete de agarose a 2%, para evitar alterações morfológicas, e cobertos com lamínula. As imagens foram adquiridas através de microscópio Zeiss Axioplan II, com câmera CCD acoplada, utilizando configurações idênticas, filtros de fluorescência adequados (*Nile Red*: excitação 515 a 555 nm, emissão 590 a 640 nm; BODIPY: excitação 508 nm, emissão 514 nm) e mesmo tempo de exposição. As imagens utilizadas para quantificação tinham os valores dos pixels abaixo do nível de saturação. A fluorescência da primeira metade da distância entre o início do intestino e a vulva foi quantificada. Geralmente, esta região engloba os três primeiros pares de enterócitos e tem sido utilizada na literatura para a quantificação lipídica através destes marcadores.

3.8 Marcação de vermes fixados pelo Sudan Black

A marcação utilizando o corante Sudan Black B (Sigma – 86015) foi realizada como descrito previamente (Greer *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 1997). Animais no estágio larval L4 tardio foram coletados em tubo de 15 mL e lavados duas vezes para

eliminação das bactérias. Foram transferidos para tubo de 2 mL e fixados com 1 mL de solução de fixação (0,2x PBS; 2% Paraformaldeído; 1x MWRB modificado (80 mM KCl; 40 mM NaCl; 20 mM EGTA; 10 mM Spermidina; 15 mM PIPES)) por 30 minutos, à temperatura de 22 °C. Posteriormente, foram lavados duas vezes com 1 mL de 100 mM Tris-Cl (pH 7,5) e incubados por 30 minutos em 1mL de solução de redução (1,54 mg/mL de DTT; 100 mM Tris-Cl (pH 7,5)) à temperatura de 22 °C. Os animais foram lavados duas vezes com 1x PBS e submetidos a desidratação seriada em 1 mL de soluções de etanol (25%; 50%; 70%) por dois minutos para cada concentração, à temperatura de 22 °C. Após a última incubação, os vermes foram centrifugados (1000 g por 1 minuto) e a solução aspirada até 0,5 mL. Adicionou-se 0,5 mL de solução de Sudan Black B saturada em etanol 70% e os tubos protegidos da luz com alumínio. Os animais foram incubados durante a noite, montados em lâminas com tapete de agarose 2% e as imagens adquiridas utilizando microscopia por DIC, com idênticas configurações e tempo de exposição.

Para possibilitar a comparação entre os genótipos, vermes selvagens foram marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Molecular Probes – F143) e, então, fixados e corados no mesmo tubo dos animais mutantes. O genótipo dos animais foi determinado após a aquisição da imagem DIC, através de microscopia de fluorescência, utilizando filtro específico (FITC: excitação 490 a 494 nm, emissão 520 a 525 nm).

3.9 *Knockdown* por alimentação com RNA de interferência (RNAi)

O protocolo foi baseado na literatura (Ahringer, 2006; Kamath *et al.*, 2001). Placas NGM, contendo 1 mM isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) (Sigma – I6758), 50 µg/mL de ampicilina (Sigma) e 50 nM de *Nile Red*, foram semeadas com *E.*

coli cepa HT115(DE3), transformadas com os fragmentos de interesse clonados no plasmídio L4440. O plasmídio vazio foi utilizado como controle. Esta cepa é deficiente na enzima RNase III e expressa uma T7 polimerase induzida por IPTG. O plasmídio carrega dois sítios de ligação T7 flanqueando o sítio de clonagem, o que possibilita a transcrição de RNAs de fita dupla sem sua degradação. As placas semeadas foram induzidas durante a noite e usadas no dia seguinte. Os vermes em estágio L1 foram plaqueados e transferidos no estágio L4 tardio, para placas preparadas da mesma maneira contendo veículo ou dopamina. Após 24 horas as imagens foram adquiridas utilizando os mesmos parâmetros já descritos.

3.10 Extração lipídica e medição de triglicérides através de cromatografia de camada fina (TLC)

10 mil vermes, no estágio L4 tardio de uma população sincronizada, foram coletados com S-basal em tubos de 15 mL. Após serem lavados duas vezes em S-basal PEG (5,85 g/L NaCl; 1 g/L K₂HPO₄; 6 g/L KH₂PO₄; 5 mg/L Colesterol; 0,01% Poli(etileno-glicol)), os vermes foram transferidos em 500 µL para tubos de vidro de 15 mL. 50 µL foram transferidos para tubo de 2 mL e congelados para determinação proteica. Os lípides totais foram extraídos, à temperatura ambiente, como descrito previamente (Bligh e Dyer, 1959). 1 volume de solução de extração (1 volume = 1,5 mL Clorofórmio; 3 mL Metanol; 750 µL H₂O_{dd}) foi adicionada em cada amostra. Os tubos foram agitados por 30 segundos e incubados, sob rotação, à temperatura de 22 °C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 volume de solução de separação (1 volume = 1,5 mL Clorofórmio; 1,5 mL 0,2 N HCl) em cada tubo, que foi agitado e novamente incubado, à temperatura de 22 °C, sob rotação, pelo mesmo intervalo de tempo. Em seguida, as fases foram separadas através de centrifugação (1500 g por 5 minutos) e a fase inferior transferida para novo tubo contendo 1 volume de solução de

limpeza (1 volume = fase superior após centrifugação (1500 g por 5 minutos) da mistura: 1,2 mL H₂O_{dd}; 3 mL Clorofórmio; 3 mL Metanol; 1,5 mL 0,2 N HCl). Os tubos foram agitados por 30 segundos e submetidos a nova separação de fases através de centrifugação (1500 g por 5 minutos). A fase superior foi descartada e a solução final seca sob vácuo. Foram adicionados 400 µL de solução de ressuspensão (1:1 Metanol/Clorofórmio) em cada tubo. A solução foi transferida para tubos de vidro de 2 mL e mantida a 4 °C até seu processamento.

Os volumes a serem carregados nas placas de cromatografia foram determinados através de quantificação proteica. Foram adicionados 200 µL de solução de extração proteica (7 M ureia; 2 M tioureia; 4% CHAPS; 50 mM HEPES (pH 7,4); 1 mM EDTA; 5 mM TCEP) em cada amostra separada para determinação proteica. Os tubos foram incubados a 37 °C, sob rotação, por 1 hora. A solução foi clareada através de centrifugação (15000 g por 5 minutos) e a concentração proteica determinada através do método de Bradford. 25 µL de cada amostra foram ressuspensos em 1 mL de solução de Bradford (Bio-Rad – 500-0006), em triplicata, em cuvetas de acrílico. A curva padrão foi preparada com solução de BSA (Bio-Rad – 500-0002) de concentração conhecida, abrangendo o intervalo de 1 a 10 µg/µL, e processada da mesma maneira. Após incubação por 5 minutos, as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro configurado para leitura em 595 nm de comprimento de onda. Os valores das médias das triplicatas foram plotados e a quantidade necessária de volume das amostras para carregamento de 1,5 µg de proteína nas placas de cromatografia determinada a partir da curva padrão de concentração proteica, considerando fator de diluição de cinco ocorrido na preparação das amostras. Volumes normalizados para quantidade proteica determinada foram carregados, em duplicata, em placas de sílica gel 60 (EMD – 5721.7), de 20x20 cm, e desenvolvidas utilizando o sistema de solvente apropriado (hexano:éter:ácido acético (70:30:1)) em uma câmara de Camaq. Curva padrão, com quantidades conhecidas de triglicérides, no intervalo de 0,5 µg a 5 µg, foi carregada e desenvolvida em paralelo às amostras. Após a corrida, a posição atingida pela frente da fase líquida foi marcada para determinação do fator de retenção (R_f = distância percorrida pela banda a partir do ponto de carregamento das

amostras/distância percorrida pela frente dos solventes a partir do ponto de carregamento das amostras) e a placa seca por alguns minutos. Ácido fosfomolibdico (Sigma – 319279) foi aplicado sobre a placa, formando camada delgada e homogênea. Em seguida, a placa de cromatografia foi aquecida a 115 °C, por 10 minutos, em forno apropriado, resfriada à temperatura ambiente e escaneada, com definição de 300 dpi, para análise densitométrica. O R_f para a banda dos triglicérides permaneceu entre 0,2 e 0,8, indicando separação adequada desta espécie de lípidos. As quantidades absolutas de triglicérides foram obtidas através da comparação entre os valores da densitometria da curva padrão e das amostras, e a média das duplicatas utilizada para análise. Os experimentos foram executados pelo menos duas vezes em ocasiões diferentes.

3.11 Ensaio da velocidade de oxidação lipídica

10 mil animais, no estágio L4 tardio, foram coletados com S-basal em tubos de 15 mL. Após serem lavados três vezes com S-basal para remoção das bactérias, os vermes foram transferidos em 480 μ L para tubos de 2 mL e 20 μ L foram separados e congelados, em tubos de 2 mL contendo 30 μ L de H_2O_{dd} , para determinação proteica. Em cada amostra foram adicionados, sequencialmente, 40 μ L de solução de ácido graxo marcado (0,5 mM ácido oleico (C18:1); 65 mCi/L ácido oleico- ^3H (C18:1)[9,10- $^3H(N)$]; 0,55 mM NaOH ; 8,25 g/L BSA) e 4 μ L desta solução separada para determinação da atividade específica. Foram preparadas três amostras branco, contendo S-basal, para determinação do “background”. As amostras foram incubadas por 1 h, sob rotação, à temperatura de 22 °C. Posteriormente, 540 μ L de ácido tricloroacético (10% p/v) foram adicionados em cada amostra, seguindo a mesma ordem inicial, para parar a reação e precipitar o ácido graxo tritiado. Os tubos foram centrifugados (10000 g por 5 minutos) e 750 μ L do sobrenadante transferidos para novo tubo de 2 mL. Foram adicionados 250 μ L 1x PBS e 100 μ L 5 mM NaOH. As amostras

foram aplicadas em colunas de troca iônica (1 mL resina Dowex (Sigma-Aldrich 44340 – 1x8 200-400 MESH Cl) amparado em lâ de vidro), 1 mL de H₂O_{dd} adicionado para lavagem da coluna e todo o volume eluído foi coletado em tubos de cintilação. 10 mL de fluido de cintilação (Perkin Elmer – HiSafe 2) foi adicionado para cada amostra. Foi preparada uma amostra apenas com líquido de cintilação para verificação do “background” específico do líquido. A emissão de radiação foi determinada através de cintilador configurado para leitura de radiação beta emitida pelo trítio. Os valores de decaimento por minuto (dpm) obtidos foram normalizados pela concentração de proteína em cada amostra, após ser subtraído a média dos valores de dpm das três amostras em branco. A concentração proteica foi determinada como já descrito, mas considerando o fator de diluição de 12,5 durante a preparação da amostra. Os experimentos foram executados pelo menos três vezes em dias diferentes.

3.12 Programas utilizados para análise de imagens e estatística

O programa ImageJ (NIH) foi utilizado para análise das imagens e densitometria. As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o Microsoft Excel.

A verificação de significância da diferença entre as médias foi feita através do test-t de Student ou da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

4 Resultados e discussão

4.1 Exposição crônica à dopamina exógena causa redução dos triglicérides no verme *C. elegans*

Para observar se o sistema dopaminérgico do verme modula a homeostase energética, empregamos corantes vitais de lípidos neutros para analisar os estoques de triglicérides após exposição à dopamina exógena.

A ativação crônica do sistema dopaminérgico, através da exposição ao neurotransmissor exógeno por 24 horas, em diferentes concentrações, resultou na redução da fluorescência do marcador vital *Nile Red* (Figura 8, A e B; Figura 9, A). A redução da fluorescência seguiu perfil dose-dependente, sendo que a concentração máxima utilizada, habitual na literatura para o estudo do sistema dopaminérgico no *C. elegans*, resultou em diminuição de 45% no parâmetro medido.

Estas concentrações são consideradas altas em modelos celulares ou de roedores e justificam-se pelo fato do verme ser envolto por cutícula espessa, pouco permeável à maioria das substâncias. Considerando que o neurotransmissor atingirá seus alvos após sua ingestão e, principalmente, difusão pela cutícula, adota-se o princípio de que a biodisponibilidade é 1000x menor que a concentração presente no meio (Srinivasan *et al.*, 2008).

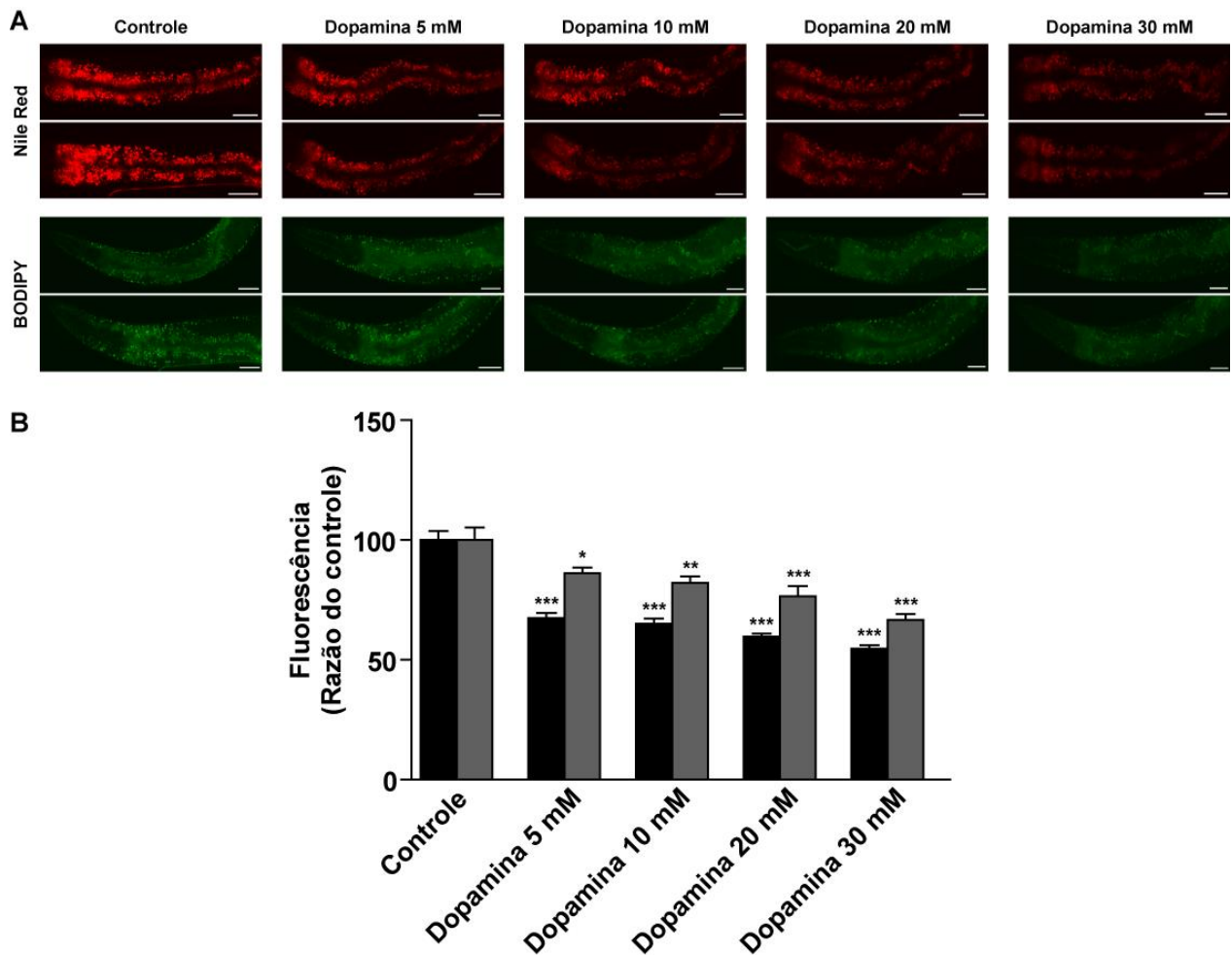


Figura 8 – Exposição à dopamina exógena reduz o conteúdo lipídico nos animais selvagens.

(A-B) Animais expostos a concentrações crescentes de dopamina mostram estoques lipídicos reduzidos visualizados pelos marcadores *Nile Red* e BODIPY. (A) Imagens representativas e (B) quantificação da intensidade de fluorescência dos animais expostos à diferentes concentrações de dopamina por 24 h. Barras pretas e cinzas representam os marcadores *Nile Red* e BODIPY, respectivamente. Os resultados são mostrados como porcentagem da média do controle $\pm$ erro-padrão da média (EPM). (n = 10 animais por condição). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparado aos vermes controle.

No experimento foram utilizados vermes no estágio L4 tardio e as imagens adquiridas no estágio adulto. Atualmente, não existem informações sobre exposição à dopamina, ou outras alterações do sistema dopaminérgico, e consequências no

desenvolvimento. Esta estratégia, entretanto, permitiu evitar que a alteração fenotípica fosse secundária à mudanças no desenvolvimento, considerando que no estágio L4 tardio a morfogênese tecidual está completa e as únicas células em divisão são as gonadais. Possíveis alterações no sistema reprodutor, sabidamente consumidor de energia, também foram abordadas e serão descritas adiante. E mais, observamos que vermes no estágio L2 submetidos à exposição crônica à dopamina apresentaram redução da fluorescência do marcador *Nile Red* similar aos adultos (Figura 9, E). Foi verificado também que o fenótipo ocorre em situação de estresse, que sabidamente altera o metabolismo energético (Van Gilst *et al.*, 2005a), mimetizada pelo aumento da temperatura de cultivo para 25 °C (Figura 9, F).

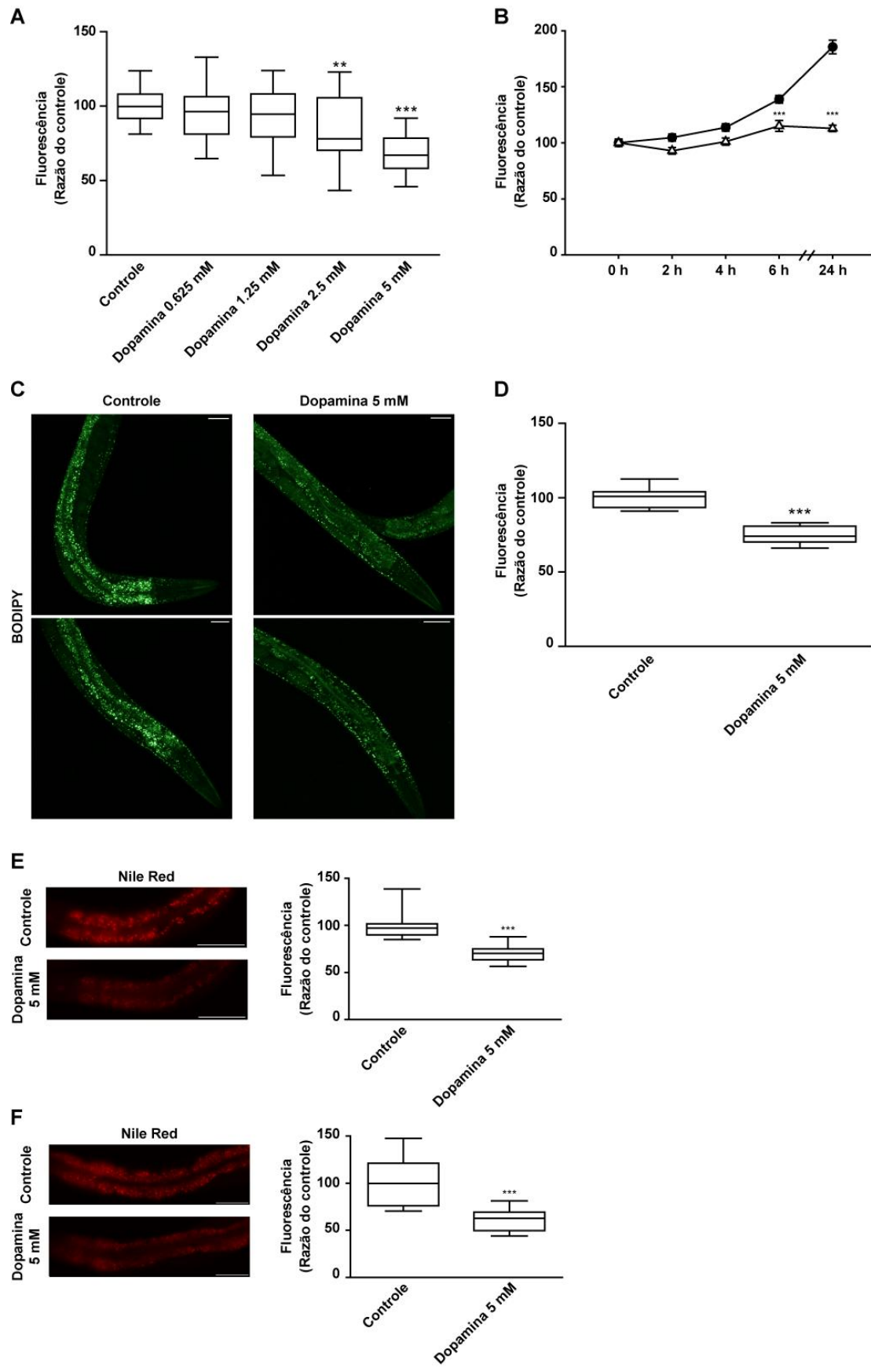


Figura 9 – A redução da gordura induzida pela dopamina é independente do estágio larval e condição de cultivo.

(A-B) O estoque lipídico está reduzido nos animais expostos à dopamina. (A) Quantificação da fluorescência em animais expostos à menor intervalo de concentração de dopamina por 24 h. Os elementos gráficos *box* e *whiskers* representam o intervalo entre os percentis 25 e 75, com a média, e os valores mínimo e máximo, respectivamente. Os dados são mostrados como porcentagem da média dos vermes controle. (n = 20 animais por condição). ** p<0.01, *** p<0.001 comparado aos vermes controle.

(B) A dopamina inibe o acúmulo de gordura ao longo do tempo. (●) Controle, (Δ) Dopamina 5 mM. Os resultados estão representados como porcentagem da média dos animais controle às 0 h ± EPM. (n = 15-20 animais por condição por tempo). *** p<0.001 comparado aos vermes controle para cada tempo.

(C-D) O conteúdo lipídico está reduzido nos animais selvagens expostos à dopamina. (C) Imagens representativas adquiridas através de microscopia confocal e (D) quantificação dos animais marcados com BODIPY expostos à dopamina por 24 h. Os elementos gráficos *box* e *whiskers* representam o intervalo entre os percentis 25 e 75, com a média, e os valores mínimo e máximo, respectivamente. Os dados estão representados como porcentagem da média dos animais controle. (n = 10 animais por condição). *** p<0.001 comparado aos vermes controle.

(E-F) A dopamina reduz o conteúdo lipídico independente da temperatura e estágio larval. (E) Imagens representativas de animais no estágio L4, expostos à dopamina quando no estágio L2, por 24 h, e quantificação da intensidade de fluorescência. Os elementos gráficos *box* e *whiskers* representam o intervalo entre os percentis 25 e 75, com a média, e os valores mínimo e máximo, respectivamente. Os dados estão representados como porcentagem da média dos animais controle. (n = 15 animais por condição). (F) Imagens representativas de vermes cultivados à 25 °C expostos à dopamina por 24 h, e a quantificação da intensidade de fluorescência. Os elementos gráficos *box* e *whiskers* representam o intervalo entre os percentis 25 e 75, com a média, e os valores mínimo e máximo, respectivamente. Os dados estão representados como porcentagem da média dos animais controle. (n = 8 animais por condição). *** p<0.001 comparado aos vermes controle.

A análise temporal do tratamento com 5 mM de dopamina mostrou que ao contrário do aumento progressivo da fluorescência nos vermes controle, os expostos ao neurotransmissor mantiveram o valor de fluorescência inicial praticamente constante (Figura 9, B). A diferença na fluorescência entre os grupos foi significativa a partir das seis horas e ampliada após 24 horas. Assim, adotamos o tempo de tratamento de 24

horas, pois foi observado que este intervalo é suficiente para a manifestação do fenótipo de interesse. Especulamos que um aumento na concentração de dopamina aceleraria a cinética de redução da fluorescência, que atingiria o efeito máximo em menor intervalo de tempo.

Para corroborar a ausência da influência no metabolismo de alterações secundárias à exposição à dopamina, analisamos o perfil lipídico de vermes expostos por 24 horas seguido de 24 horas sem o neurotransmissor (Figura 10, A e B). Observamos a redução da fluorescência após 24 horas de exposição e o retorno para os níveis do controle nas 24 horas que se seguiram em placa sem dopamina. Concluiu-se que a exposição à dopamina exógena reduz a fluorescência do marcador *Nile Red* de maneira reversível, o que sugere a ligação direta entre o fenômeno e o sistema dopaminérgico e enfraquece possíveis causas secundárias ao tratamento.

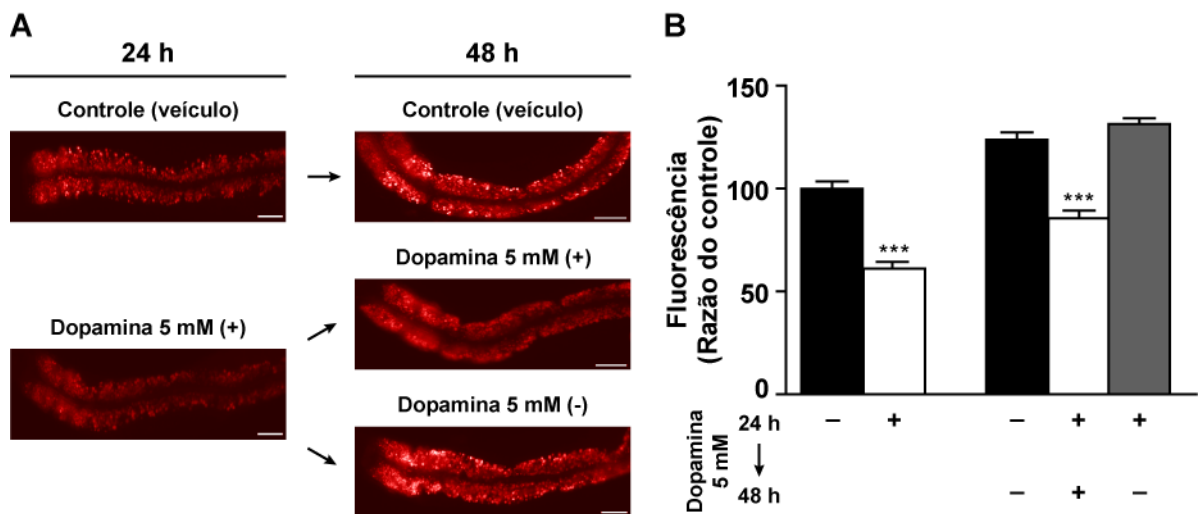


Figura 10 – A redução lipídica induzida pela dopamina requer a continua exposição ao neurotransmissor.

(A) Diagrama do experimento com imagens representativas adquiridas em cada condição.

(B) Quantificação da fluorescência indica que a transferência dos vermes selvagens expostos à dopamina para placas sem o neurotransmissor resgata o fenótipo para os níveis do controle. Os dados estão representados como porcentagem da média de fluorescência dos animais controle as 24 horas $\pm$ EPM. (n = 8-10 animais por condição). *** $p < 0.001$ comparado com os vermes controle para cada tempo.

O marcador vital *Nile Red* tem sido usado com sucesso para estudo da dinâmica dos triglicérides no verme. COHEN *et al.* (2009) demonstraram que os neuropeptídeos codificados pelo gene *flp-18* atuam através dos receptores NPR-4 e NPR-5 para modular a quantidade de gordura (Cohen *et al.*, 2009). Já SRINIVASAN *et al.* (2008) observaram que a exposição à serotonina exógena modula uma série de genes relacionados com o metabolismo, resultando na redução do conteúdo lipídico do verme (Srinivasan *et al.*, 2008). VAN GILST *et al.* (2005) mostraram que o receptor nuclear de hormônio NHR-49 controla, através da transcrição de 13 enzimas metabólicas, os estoques de gordura (Van Gilst *et al.*, 2005b). Ainda utilizando a marcação pelo *Nile Red*, JONES *et al.* (2009) demonstraram que o complexo TORC2 influencia o acúmulo de gordura através da modulação da quinase SGK-1, homóloga à quinase induzida pelo soro e glicocorticóides em mamíferos (Jones *et al.*, 2009).

Concluiu-se que o fenótipo observado de redução na fluorescência do marcador *Nile Red*, após exposição à dopamina exógena, indica que a ativação crônica do sistema dopaminérgico leva à redução dos estoques de gordura no verme selvagem.

Para confirmar esta hipótese, realizou-se nova marcação utilizando ácido graxo ligado ao fluoróforo BODIPY (C1-BODIPY-C12), chamado doravante de BODIPY, que já foi validado para estudo do metabolismo lipídico no verme (Mak *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). Acredita-se que a fluorescência emitida é proporcional à quantidade de gordura, considerando a esterificação do ácido graxo marcado para a formação dos triglicérides.

A exposição crônica à diferentes concentrações de dopamina também reduziu a fluorescência deste marcador (Figura 8, A e B; Figura 9, C e D). Entretanto, a amplitude da redução foi de 27%. Ao contrário do *Nile Red*, o BODIPY marca os estoques lipídicos no intestino e na hipoderme. Apesar de também diminuir na hipoderme, observou-se que a redução da fluorescência foi maior no intestino, o que justificaria o fenótipo mais expressivo através da análise com o marcador *Nile Red*, específico para este último compartimento. Talvez a quantificação de alterações teciduais específicas mostre diferenças na regulação e função de cada estoque. Sugere-se que a redução da fluorescência do marcador BODIPY, causada pela ativação crônica do sistema

dopaminérgico, reflete diminuição nos estoques energéticos do verme, o que corrobora os resultados obtidos com o outro marcador.

Recentemente, dois estudos questionaram a validade das interpretações obtidas através da observação dos marcadores vitais. O'ROUKER *et al.* (2010), analisando a relação entre os corantes *Nile Red* e BODIPY em animais fixados marcados também com o corante para lípidos *LipidTox* e para lisossomos *LysoTracker*, observaram correlação apenas entre os marcadores vitais e o último. Também mostraram a colocalização da proteína lisossomal, PGP-2, marcada com GFP, e o marcador *Nile Red* em animais fixados. O estudo sugere que os marcadores vitais acumulam em organelas semelhantes à lisossomos e não em vesículas lipídicas (O'Rouker *et al.*, 2010). Já BROOKS *et al.* (2009), correlacionando diferentes dietas e o perfil lipídico do verme, observaram que a marcação vital com *Nile Red* destoa daquela obtida através da utilização do marcador em animais fixados e sugerem que a última técnica correlaciona-se melhor com dados gerados a partir de preparações bioquímicas (Brooks *et al.*, 2009).

A fixação é um processo que envolve substâncias como paraformaldeído, agentes redutores, metanol e etanol. Os objetivos são preservar a morfologia, através da formação de ligações entre as proteínas, permeabilizar, pela redução das proteínas da cutícula, e desidratar o verme, através da exposição a uma série de concentrações crescentes de etanol. Já os corantes vitais são usados misturados ao alimento e, quando ingeridos pelo verme, vão se acumulando em estruturas nos tecidos de reserva lipídica. Experimentos mostram que o processo de fixação, além de lavar parte dos triglicérides, retiram parte da marcação dos corantes vitais (Ashrafi e Liu *personal communication*). Mesmo os corantes específicos para animais fixados, como o Sudan Black, são amplamente perdidos após três lavagens em etanol 70%. Ainda, a organização morfológica das estruturas que armazenam lípidos no verme não é conhecida e não há evidências da existência de gotícula de gordura característica dos adipócitos em mamíferos. Assim, é possível que o armazenamento de triglicérides também ocorra nas organelas relacionadas com lisossomos, marcadas pelos corantes vitais, ou, então, que a fixação retira a parte dos corantes vitais associada aos estoques

de triglicérides, enquanto o restante, localizado em estruturas mais resistentes ao processo, permanece e colocaliza com o marcador para lisossomos *Lysotracker* e a proteína PGP-2::GFP.

ZHANG *et al.* (2010) mostraram que a marcação pela proteína fluorescente GFP da lipase responsável por liberar os ácidos graxos dos triglicérides, ATGL-1, colocaliza com estruturas preenchidas pelo marcador vital BODIPY (Zhang *et al.*, 2010). A ATGL-1 está associada à estruturas ativas na quebra de triglicérides, o que justifica a colocalização ampla mas não total das marcações. Na falta de conhecimento sobre a organização proteica das vesículas intestinais e da hipoderme armazenadoras de triglicérides, ainda não se sabe uma proteína específica marcadora do estoque energético no verme. Talvez um transgene expressando, por exemplo, a proteína perilipina ou seu domínio hidrofóbico, que são sabidamente associadas as gotículas lipídicas em mamíferos, mas que não está presente no verme, informe sobre as estruturas relacionadas ao armazenamento lipídico. Ressalta-se que a modificação dos solventes orgânicos utilizados no processo de fixação eliminou parte da perda dos corantes vitais e triglicérides e foi, então, observada correlação entre o marcador de triglicérides *LipidTox* e os marcadores vitais (Ashrafi e Liu *personal communication*). Sugere-se que no verme os estoques energéticos não são armazenados em estruturas clássicas e que o processo de fixação apresenta variações que podem levar à diferenças nas interpretações.

Para validar nossa interpretação sobre a relação entre sistema dopaminérgico e os estoques de gordura no verme, baseada na redução da fluorescência dos marcadores vitais *Nile Red* e BODIPY, foi medida a quantidade de triglicérides através de método bioquímico. Lípidos totais de vermes selvagens, cronicamente expostos à dopamina, foram extraídos e analisados através da técnica de cromatografia de camada fina (TLC) (Figura 11, A e B). O neurotransmissor reduziu em aproximadamente 20% a quantidade de triglicérides nos vermes. A menor amplitude da redução dos triglicérides pode ser justificada pela ausência de especificidade tecidual do método de extração. A vantagem da organização multitecidual do modelo é perdida ao se extrair os lípidos provenientes de todos os tecidos para um único conjunto. Talvez o

estoque energético armazenado na gônada não esteja sob a influência direta do sistema dopaminérgico, diminuindo, dessa forma, a amplitude do fenótipo. Por isso também, utilizamos a concentração de 30 mM do neurotransmissor, objetivando maximizar o mesmo. E mais ainda, considerando que o desenvolvimento do verme apresenta distribuição gaussiana dentro de uma população e que a seleção visual baseada na morfologia não é possível nesta técnica, pequenas diferenças de desenvolvimento populacional podem influenciar o resultado. O *C. elegans* apresenta perfil lipídico inter e intraestágio larval dinâmico, especialmente relacionado ao acúmulo de triglicérides.

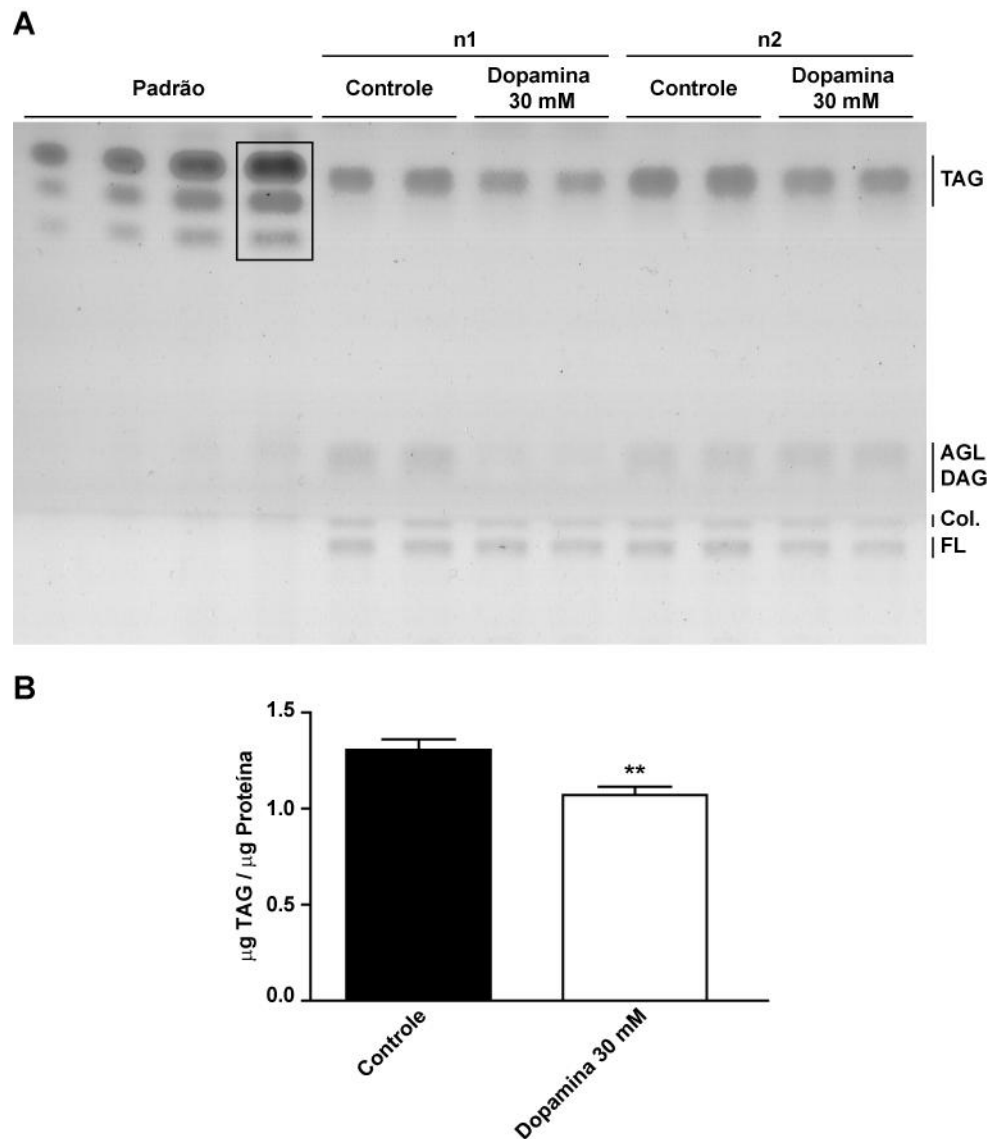


Figura 11 – A dopamina reduz a quantidade de triglicérides no verme selvagem.

(A-B) Vermes expostos à dopamina têm quantidade reduzida de triglicérides (TAG). (A) Imagem representativa de uma placa de cromatografia carregada com lípidos extraídos de vermes expostos ao veículo ou dopamina 30 mM por 24 h. A figura mostra réplicas de duas populações e a curva padrão. O retângulo representa a região utilizada para a quantificação das amostras. Estão demarcadas outras espécies lipídicas, a saber: AGL – ácidos graxos livres, DAG – diacilglicerol, Col. – colesterol, FL – fosfolípides. (B) A quantificação da fração TAG mostra que a exposição à dopamina reduz os triglicérides. Os dados plotados são as médias de seis populações independentes $\pm$ EPM. ** $p < 0.01$ comparado aos vermes controle.

Baseado na correlação entre os resultados dos marcadores vitais e a quantificação de triglicérides nos extratos lipídicos, concluiu-se que a ativação crônica do sistema dopaminérgico reduz os estoques de triglicérides no verme *C. elegans*. Verificou-se também que os marcadores vitais *Nile Red* e BODIPY sinalizam mudanças nos estoques energéticos e que diferenças intrínsecas às metodologias são responsáveis por algumas das discrepâncias observadas.

4.2 A síntese de dopamina regula o perfil lipídico no *C. elegans*

A exposição à dopamina exógena causa a ativação artificial do sistema dopaminérgico. Os níveis do neurotransmissor e a cinética temporal alcançados representam um cenário fisiológico extremo e pouco provável. Sabe-se que adaptações nas vias de síntese e sinalização são desencadeadas pela ativação maciça e prolongada dos sistemas de neurotransmissores (Tronson e Taylor, 2007). Apesar disso, as análises neste estado fisiológico permite o conhecimento de funções do sistema que muitas vezes operam com menor intensidade em condições normais.

Para estudar a relação entre o sistema dopaminérgico endógeno e a homeostase energética, analisou-se o perfil lipídico de vermes mutantes para componentes-chave na síntese e término da neurotransmissão dopaminérgica através da marcação com *Nile Red* (Figura 12, A). Observou-se que a fluorescência nos mutantes com perda de função nos genes *cat-2* e *dat-1* é similar à dos vermes selvagens controle. Foi demonstrado que os mutantes *cat-2* não são completamente deficientes em dopamina (Sanyal *et al.*, 2004; Suo *et al.*, 2009). Sabe-se também que baixas concentrações de dopamina são necessárias para a normalização da ingestão calórica nos camundongos KO para TH (Szczyepka *et al.*, 1999a). Interpretamos, então, que a pequena quantidade de dopamina no mutante *cat-2* é suficiente para a manutenção da relação entre a dopamina e a homeostase energética. Também a

redução na fluorescência do marcador esperada nos mutantes *dat-1* não foi observada. Considerando a liberação por volume postulada para a dopamina no verme e a presença do DAT-1 apenas nos oito neurônios dopaminérgicos (Nass e Blakely, 2003; Chase *et al.*, 2004), sugeriu-se que existam outros mecanismos de clareamento do neurotransmissor e que o aumento da concentração de dopamina nos animais *dat-1* não é expressivo para modificar a fluorescência de forma mensurável, apesar das modificações em outros fenótipos observadas nestes mutantes. Talvez a identificação e inibição das enzimas responsáveis pela degradação da dopamina no verme possa elucidar este aspecto.

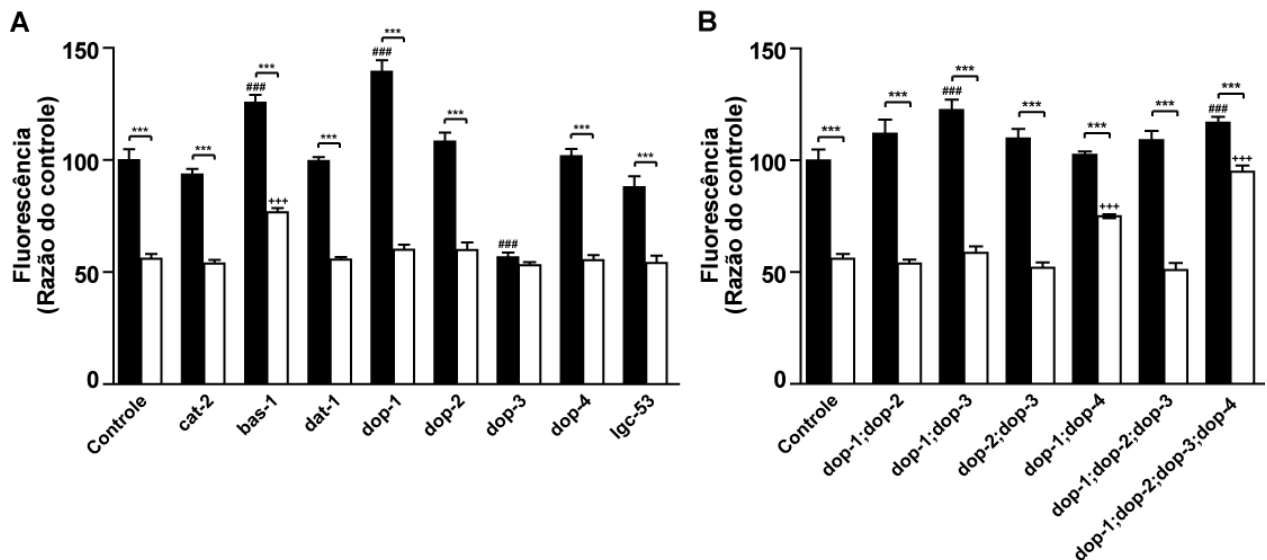


Figura 12 – O efeito dopamina na homeostase energética depende dos receptores dopaminérgicos.

(A-B) Níveis de gordura em vários mutantes expostos ou não à dopamina. As barras pretas e brancas representam exposição ao veículo ou à dopamina 5 mM, por 24 h, respectivamente. Os resultados estão representados como porcentagem da média de fluorescência dos animais selvagem expostos ao veículo $\pm$ EPM. (n = 10-20 animais por condição por genótipo). *** $p < 0.001$ comparado aos animais controle do mesmo genótipo, ### $p < 0.001$ comparado ao controle selvagem, +++ $p < 0.001$ comparado aos animais controle selvagens expostos à dopamina.

Analizamos, também, o fenótipo do mutante com perda de função no gene codificante da enzima responsável pela catálise da segunda reação de síntese da dopamina, *bas-1* (Figura 12, A). Os animais mostraram elevação média da fluorescência de 25% comparados aos controles selvagens. O fenótipo condiz com o modelo proposto. Entretanto, os mutantes *bas-1* também são deficientes na síntese de serotonina, outro neurotransmissor associado ao controle da homeostase energética (Srinivasan *et al.*, 2008; Sze *et al.*, 2000). É possível que o aumento observado na fluorescência do *Nile Red* seja consequência da redução na síntese de serotonina e não de dopamina. Esta possibilidade foi verificada através da exposição destes mutantes à dopamina exógena. O neurotransmissor exógeno reduziu a fluorescência dos mutantes para um valor 18% maior que os vermes selvagens expostos e não 25% como seria esperado se apenas a serotonina fosse responsável pelo fenótipo. Os mutantes *bas-1* expostos apresentaram acúmulo de gordura 7% menor que o previsto baseado na ausência da dopamina exógeno, o que sugere que o aumento da fluorescência nestes vermes é consequência da disfunção tanto na síntese de serotonina como também de dopamina. Concluiu-se que a redução na síntese de dopamina está relacionada ao aumento dos estoques de triglicérides no verme.

4.3 Receptores dopaminérgicos regulam os níveis de gordura no *C. elegans*

Baseado em similaridades gênicas e farmacológicas e propriedades bioquímicas, cinco receptores dopaminérgicos foram descritos no *C. elegans* até o momento. Para determinar a relação funcional entre os receptores e as alterações na homeostase energética desencadeadas pela dopamina, foram caracterizados os níveis de gordura em cepas mutantes, com perda de função, para os receptores dopaminérgicos (Figura 12, A). Mutações em dois dos receptores testados causaram alterações nos estoques de

triglicérides. Animais mutantes para *dop-1* tiveram aumento da fluorescência, enquanto os mutantes *dop-3* apresentaram redução quando comparados aos vermes controle selvagem. A redução da quantidade de gordura nos mutantes *dop-3* é consistente com a identificação prévia deste gene em “screen”, baseado em RNAi, para genes regulatórios do metabolismo energético (Ashrafi *et al.*, 2003). Foi confirmado o fenótipo fluorescente dos vermes *dop-1* e *dop-3* através da marcação com o corante de lípidos neutros Sudan Black (Figura 13, A e B). Concluiu-se que os receptores DOP-1 e DOP-3 causam efeitos opostos nos estoques de triglicérides e foi corroborada a ligação do sistema dopaminérgico e a homeostase energética no verme.

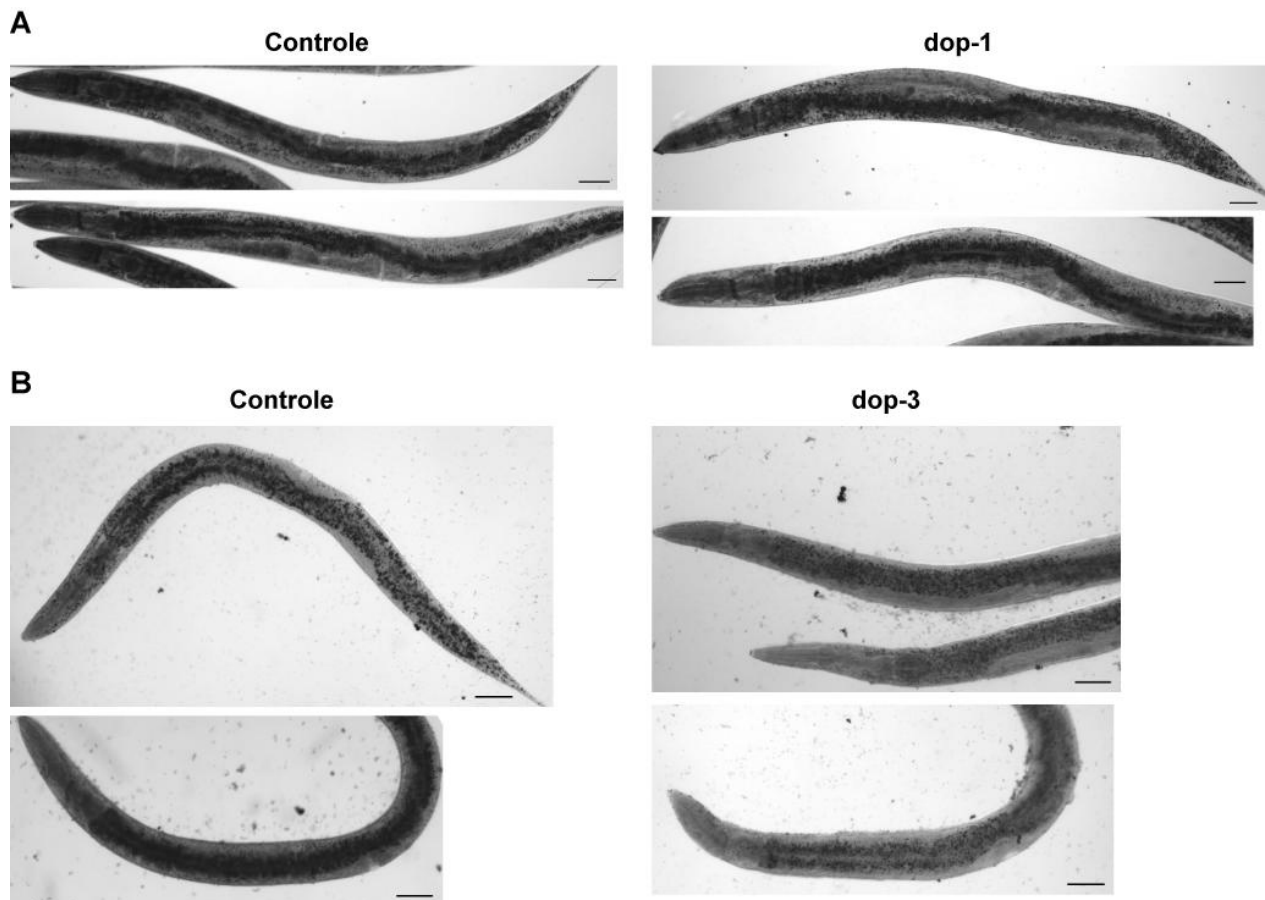


Figura 13 – Marcação com o corante *Sudan Black* dos mutantes com perda de função para os receptores dopaminérgicos DOP-1 e DOP-3.

(A-B) Mutantes *dop-1* e *dop-3* apresentam aumento e redução dos estoques lipídicos, respectivamente. (A) Imagens representativas dos mutantes *dop-1* e (B) *dop-3* fixados e marcados com o corante *Sudan Black*. Imagens representativas dos animais controle selvagens marcados no mesmo tubo também são mostradas.

Para verificar as relações regulatórias entre os receptores DOP-1 e DOP-3, foi analisado o perfil lipídico dos mutantes duplos *dop-1;dop-3* (Figura 12, B). O fenótipo do mutante duplo foi similar ao do mutante *dop-1*, sugerindo que a função metabólica de *dop-1* é epistática àquela de *dop-3*.

As interações entre os receptores dopaminérgicos e as vias de sinalização correspondentes estão presentes em mamíferos (Svenningsson *et al.*, 2004). Para ampliar o entendimento sobre as interações dos receptores dopaminérgicos e o metabolismo, foi analisado o perfil lipídico de animais carreando combinações de mutações nos genes para os mesmos (Figura 12, B). Enquanto o mutante simples *dop-2* apresentou fenótipo lipídico similar ao controle selvagem, a combinação deste receptor nos mutantes duplos *dop-1;dop-2* e *dop-2;dop-3* reverteu as alterações nos estoques de gordura observadas nos mutantes simples, deixando-os semelhantes aos vermes selvagens. Da mesma forma, o mutante duplo *dop-1;dop-4* e o mutante triplo *dop-1;dop-2;dop-3* mostraram fluorescência similar aos vermes selvagens. Concluiu-se que existe uma interação regulatória complexa entre os receptores dopaminérgicos no verme. Isto é ilustrado pela dependência dos fenótipos lipídicos causados pela perda de função dos receptores DOP-1 e DOP-3, com a funcionalidade dos receptores DOP-2 e DOP-4. As razões para a interdependência ainda não estão esclarecidas.

4.4 A redução do conteúdo lipídico pela dopamina exógena é dependente dos receptores dopaminérgicos

Para verificar se a exposição à dopamina exógena reduz o perfil lipídico através da interação com um ou mais receptores dopaminérgicos, analisou-se seu efeito sobre o perfil lipídico dos mutantes para os receptores (Figura 12, A e B).

Comparados ao valor basal, apenas os vermes mutantes para *dop-3* demonstraram resistência ao efeito do neurotransmissor sobre o fenótipo. Entretanto, esta interpretação é complicada pelo fato de os mutantes *dop-3* já apresentarem diminuição da fluorescência. Talvez ocorra a redução nos estoques lipídicos que a técnica utilizada não seja sensível suficiente para sua mensuração.

Animais com combinações de mutações nos receptores dopaminérgicos foram susceptíveis à redução pela dopamina dos estoques lipídicos, semelhante aos controles selvagens. A análise dos mutantes duplos com combinações de mutações nos receptores *dop-1*, *dop-2* e *dop-3* demonstrou que a exposição ao neurotransmissor reduz a fluorescência com amplitude similar à observada no verme selvagem. O mesmo ocorreu nos triplos mutantes *dop-1;dop-2;dop-3*.

Em contraste, o mutante duplo *dop-1;dop-4* e o quádruplo *dop-1;dop-2;dop-3;dop-4* foram amplamente resistentes ao efeito da dopamina exógena sobre o metabolismo. Os resultados sugerem que o efeito observado no perfil lipídico após exposição ao neurotransmissor é causado por alterações na sinalização dos receptores dopaminérgicos, principalmente DOP-1 e DOP-4.

4.5 O efeito de redução lipídica pela dopamina não pode ser atribuído à alterações no comportamento

Alterações nos estoques energéticos indicam mudanças no balanço entre as calorias consumidas e gastas. Considerando que no verme o sistema dopaminérgico está associado a uma série de comportamentos que envolvem gasto de energia, verificamos os efeitos da ativação crônica da sinalização dopaminérgica em vários destes parâmetros.

O verme ingere o alimento através da ação propulsiva da faringe. A velocidade de contração da faringe é modulada pela presença do alimento, pela sua qualidade, como também pela experiência prévia do animal (Avery, 1993; You *et al.*, 2008). Vários neurotransmissores e neuropeptídeos estão envolvidos no controle do batimento faríngeo (Avery, 1993; Srinivasan *et al.*, 2008; Greer *et al.*, 2008). Alterações na velocidade do batimento faríngeo não foram observadas após exposição à diferentes concentrações de dopamina nos vermes selvagens ou carregando mutações nos receptores dopaminérgicos (Figura 14, A e F). Concluiu-se que a disfunção do comportamento alimentar não está relacionada com a redução dos estoques energéticos induzida pela dopamina.

Foi observado que a exposição à altas concentrações de dopamina diminui o intervalo entre os ciclos de defecação (Weinshenker *et al.*, 1995). Entretanto, verificou-se que na concentração testada a dopamina não interfere no intervalo entre os ciclos de defecação (Figura 14, C). Assim, o efeito da redução lipídica pela dopamina não pode ser atribuído a mudanças na alimentação ou no trânsito intestinal do alimento.

Considerando que níveis elevados de dopamina reduzem ou mesmo paralisam o verme *C. elegans* (Sawin *et al.*, 2000; Chase *et al.*, 2004; Schafer e Kenyon, 1995), uma explicação trivial para o fenótipo metabólico observado poderia ser a incapacidade dos animais tratados em atingir o alimento. Os vermes foram expostos à 5 mM de dopamina, considerando que nesta concentração o fenótipo lipídico já é significativo.

Utilizando um sistema automático para mensuração da locomoção, verificou-se que a dopamina produz redução aguda na movimentação dos vermes selvagens de maneira transitória, sendo que os animais apresentam movimentação similar aos controles após quatro horas, independentemente da contínua exposição ao neurotransmissor (Figura 14, B). Mesmo durante o tempo em que permaneceram com a movimentação reduzida, os vermes estiveram rodeados por alimento e, como descrito, apresentaram ingestão calórica semelhante aos controles. E ainda, a redução lipídica induzida pela dopamina foi significativa após seis horas de exposição, intervalo no qual os vermes já haviam adaptado à redução na movimentação, e só foi revertida após a transferência dos vermes para placas sem o neurotransmissor, processo não associado a nenhuma alteração motora notável. Concluiu-se que é improvável que a redução temporária na movimentação esteja relacionada com a diminuição dos estoques energéticos induzida pela dopamina.

O verme hermafrodita inicia a fecundação na fase adulta, fazendo a ovoposição de até 300 ovos em três a cinco dias. A reprodução é um evento que exige intenso fluxo energético e alterações em componentes do transporte energético do intestino para a gônada resultam em esterilidade (Hashmi *et al.*, 2006). Como demonstrado previamente (Schafer e Kenyon, 1995; Dempsey *et al.*, 2005), foi observado que o tratamento crônico com dopamina não altera índices relacionados com a reprodução no verme (Figura 14, D e E). Após exposição à dopamina, tanto a ovoposição quanto o número de ovos fecundados no útero foram similares ao controle selvagem. Concluiu-se que a diminuição dos estoques energéticos não é secundária às alterações reprodutivas causadas pelo neurotransmissor.

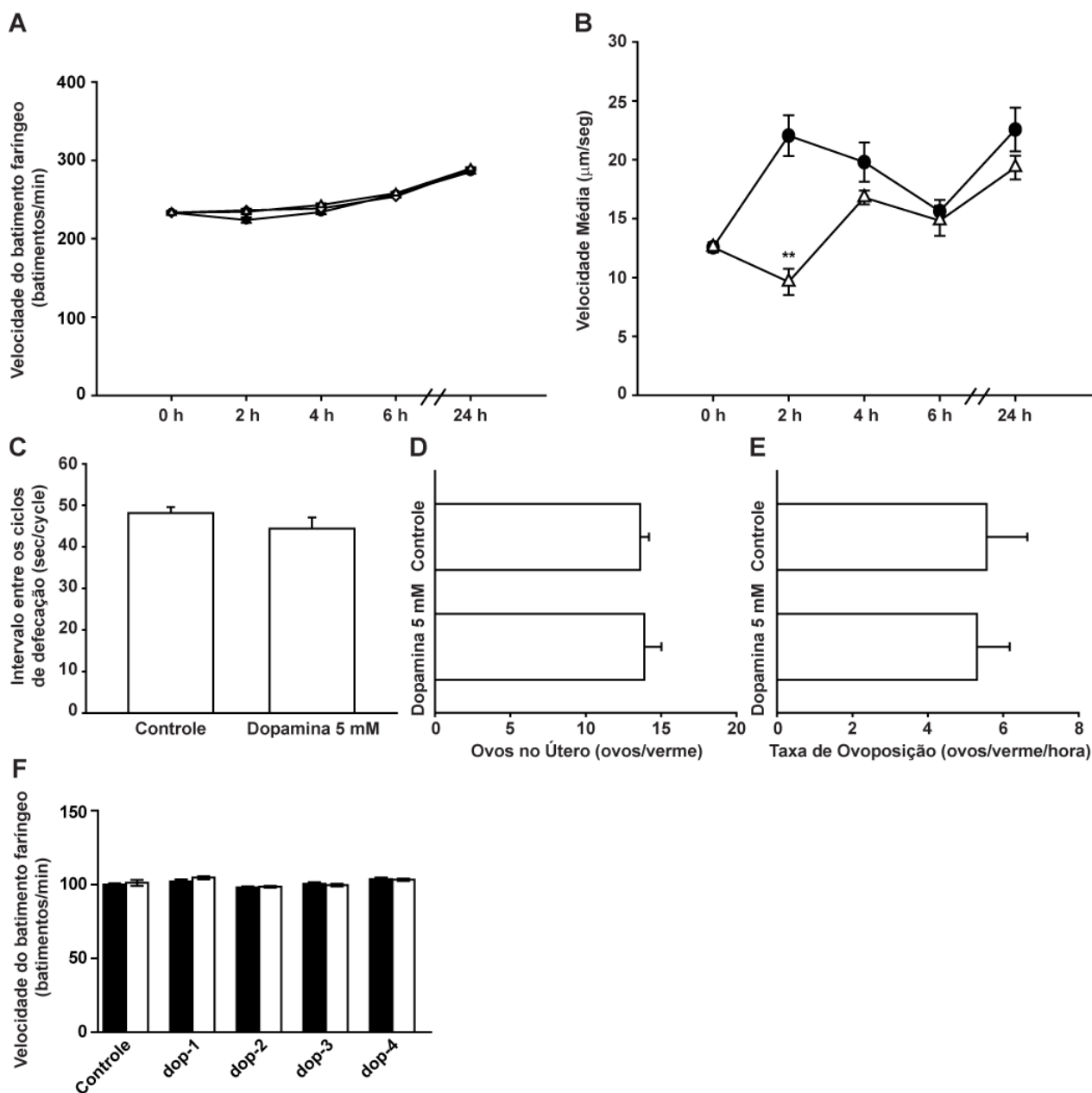


Figura 14 – A redução lipídica induzida pela dopamina não é secundária a outros comportamentais.

(A) A velocidade do batimento faríngeo dos animais selvagens expostos à dopamina é semelhante aos vermes controle. Os dados estão apresentados como a média do batimento faríngeo de 15 animais por condição por tempo $\pm$ EPM. (●) Controle, (◇) Dopamina 5 mM, (Δ) Dopamina 30 mM.

(B) A dopamina causa redução transitória na movimentação dos vermes selvagens. Os resultados estão apresentados como a média de velocidade de 5 a 9 vermes por condição por tempo $\pm$ EPM. (●) Controle e (Δ) Dopamina 5 mM. ** $p < 0.01$ comparado com os animais controle do mesmo tempo.

(C) A taxa de defecação dos animais expostos à dopamina é similar aos vermes tratados com veículo. Os dados estão representados como a média de defecação de 10 animais por condição $\pm$ EPM.

(D-E) A exposição crônica à dopamina não afeta aspectos relacionados com a reprodução no verme selvagem. (D) O número de ovos no útero ou (E) a ovoposição por hora nos animais tratados com dopamina é semelhante aos vermes controle. Os resultados são apresentados como a média dos valores contados de 9 animais por condição $\pm$ EPM.

(F) A velocidade do batimento faríngeo dos animais mutantes expostos à dopamina é semelhante aos vermes controle. As barras pretas e brancas representam exposição ao veículo ou à dopamina 5 mM, respectivamente. Os dados estão plotados como a média do batimento faríngeo de 10 animais por genótipo e condição $\pm$ EPM.

Considerando que os animais expostos não apresentaram defeitos na morfologia, os resultados indicam que a redução da gordura induzida pela dopamina é improvável ser consequência secundária do aumento do gasto energético através da locomoção ou reprodução.

4.6 A dopamina causa redução dos estoques energéticos através do aumento da oxidação lipídica

A síntese e a degradação dos ácidos graxos e a conjugação com o glicerol, formando ou degradando os triglicérides, regulam o tamanho do estoque energético no verme. O excesso calórico, proveniente dos três tipos de macronutrientes, é utilizado na formação dos triglicérides, enquanto o balanço energético negativo resulta na quebra da gordura para liberação de energia.

Para verificar se a redução da reserva energética causada pela ativação do sistema dopaminérgico é dependente da atividade de alguma via metabólica, analisamos o efeito do silenciamento induzido por RNAi de 97 genes codificadores de componentes participantes da síntese e quebra de açúcares e ácidos graxos na redução da fluorescência induzida pelo neurotransmissor (Apêndice A, Tabela 3). A partir dos resultados de “screen’s” visual e automático, foram selecionados sete genes cuja redução da expressão resultou em menor diminuição da fluorescência induzida pela dopamina comparado ao verme controle. O resultado foi verificado através da análise padrão da marcação com *Nile Red* por microscopia de fluorescência (Figura 15, A e B). Confirmou-se que o KD de três genes resultou no resgate parcial do fenótipo induzido pela dopamina sobre os estoques lipídicos. A inativação mediada por RNAi do gene F54D5.7, codificador da enzima acil-CoA desidrogenase, F59F4.1, que codifica a enzima acil-CoA oxidase-1, e T02G8.5/*kat-1*, codificador da enzima cetoacil-CoA tiolase, reduziu, com significância, o fenótipo induzido pelo neurotransmissor.

A quebra das moléculas de ácido graxo ativadas ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n\text{-CO-CoA}$), para liberação de energia, ocorre através de uma sequência cíclica de quatro reações, chamada de β -oxidação, que resulta na produção de uma molécula de acetil-CoA e na redução de dois carbonos no ácido graxo ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n-2}\text{-CO-CoA}$) (Wanders e Waterham, 2006; Van Gilst *et al.*, 2005). As enzimas codificadas pelos genes F54D5.7 e F59F4.1 catalisam a oxidação (desidrogenação) do ácido graxo, entre os carbonos 2 e 3, nas mitocôndrias e nos peroxissomos, respectivamente. Esta é a primeira reação da β -oxidação. A enzima KAT-1 é uma tiolase que catalisa a liberação de acetil-CoA da molécula de ácido graxo, a última etapa de um ciclo da β -oxidação. A expressão de *kat-1* e F59F4.1/acil-CoA desidrogenase está confinada nos tecidos periféricos, enquanto o padrão do gene F54D5.7 ainda é desconhecido (Zhang *et al.*, 2010; Hunt-Newbury *et al.*, 2007). Concluiu-se que a redução da expressão de genes codificadores de enzimas relacionadas com a oxidação de lípidos diminui a redução da fluorescência induzida pela dopamina, o que sugere que o sistema dopaminérgico participa de eixo neuroendócrino, que regula a expressão ou atividade destas enzimas, controlando os estoques energéticos do verme.

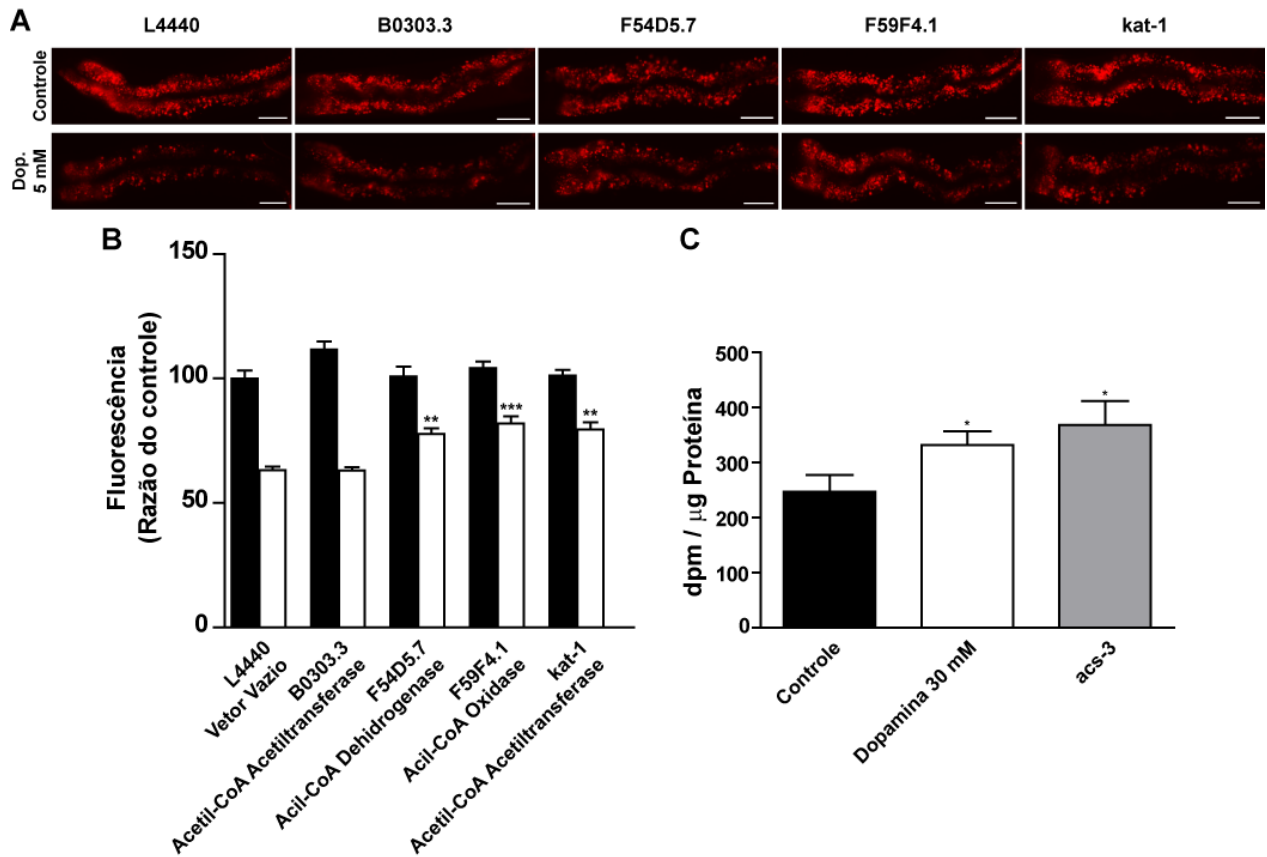


Figura 15 – A redução dos estoques energéticos induzida pela dopamina depende da oxidação lipídica.

(A-B) A redução lipídica induzida pela dopamina é atenuada pelo silenciamento gênico de enzimas relacionadas à β -oxidação. (A) Imagens representativas e (B) quantificação da fluorescência de animais selvagens alimentados com clones expressando determinados RNAs de interferência. O *knockdown* de alguns genes reverteu parcialmente o efeito de redução lipídica induzido pela dopamina exógena. Barras pretas e brancas representam exposição ao veículo e à dopamina 5 mM, respectivamente. Os resultados estão plotados como porcentagem da média do controle alimentado com vetor vazio $\pm$ EPM. ($n = 8-10$ animais por condição). ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparado aos animais expostos à dopamina e alimentados com o vetor vazio.

(C) Animais expostos à dopamina exibem aumento da velocidade da β -oxidação. Os mutantes *acs-3* foram usados como controle positivo. Os resultados representam a média de 12 populações independentes $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ comparado aos animais controle.

Os resultados dos experimentos de silenciamento gênico indicam que o fenótipo induzido pela dopamina é dependente das vias de oxidação lipídica. Para testar diretamente a relevância funcional deste fato, mediu-se a taxa da oxidação lipídica após exposição à dopamina. Vermes selvagens foram alimentados com ácido oleico- ^3H (C18:1)[9,10- $^3\text{H}(\text{N})$] e a produção de trítio monitorada como indicador da velocidade da β -oxidação (Figura 15, C). Consistente com os resultados genéticos, a exposição crônica à dopamina resultou em aumento da produção de trítio, o que é interpretado como aumento na taxa da β -oxidação. Assim, os achados são consistentes com o modelo em que a ativação do sistema dopaminérgico causa redução dos estoques energéticos através do aumento da quebra de ácidos graxos pelas vias oxidativas.

4.7 Discussão final

Baseado nas evidências do envolvimento entre sistema dopaminérgico e a homeostase energética, buscou-se determinar os possíveis mecanismos de controle da dopamina sobre a reserva energética no verme *C. elegans*. Pôde-se verificar que a deficiência na sinalização através de receptores dopaminérgicos específicos está associada ao aumento dos estoques de triglicérides, enquanto a ativação crônica do sistema dopaminérgico pela exposição à dopamina exógena causa redução na quantidade de gordura. Considerando os vários comportamentos modulados pelo sistema dopaminérgico no verme, foi observado que o fenótipo energético não é uma consequência indireta de alterações no gasto energético pelos comportamentos, mas sim uma resposta independente. Dessa forma, procuramos identificar os componentes do sistema dopaminérgico responsáveis pela redução dos triglicérides induzida pela dopamina e pôde-se observar uma hierarquia complexa entre os receptores para o neurotransmissor. Enquanto a perda de função nos receptores DOP-1 e DOP-3 causou alterações significativas na reserva energética, a funcionalidade dos receptores DOP-2

e DOP-4 foi necessária para a manifestação fenotípica nos mutantes para aqueles receptores. Da mesma forma, a perda de função nos genes *dop-1* e *dop-4* foi necessária para a reversão parcial no fenótipo desencadeado pela exposição à dopamina exógena. Os resultados observados no verme são remanescentes de relações compensatórias e interdependentes notadas previamente na sinalização pelos receptores dopaminérgicos (Suo *et al.*, 2009; Svenningsson *et al.*, 2004). Consistente com a dependência do fenótipo em mais de um receptor, a integração da sinalização entre eles é ainda indicada pelo fato de a expressão de *dop-1* ocorrer em número limitado de neurônios, enquanto *dop-4* é amplamente expresso em vários neurônios e tecidos do verme (Chase e Koelle, 2007; Sanyal *et al.*, 2004; Sugiura *et al.*, 2005). E ainda, o receptor LGC-53 não foi analisado em combinação com os outros receptores, o que pode justificar a reversão apenas parcial do fenótipo de redução da fluorescência induzida pela dopamina nos mutantes quádruplos. Não está excluída a possibilidade da existência de outro receptor ainda não identificado para o neurotransmissor.

A evidência de que o tratamento com dopamina exógena causa redução dos estoques de triglicérides é intrigante, mas não indica que a sinalização pelos receptores dopaminérgicos regula o perfil lipídico. Em altas concentrações é possível que a dopamina interaja com receptores para outras aminas ou com outras vias de sinalização independentes do sistema do neurotransmissor. Os resultados que mostram que os receptores dopaminérgicos são necessários para a redução lipídica desencadeada pela dopamina exógena demonstram que, de fato, o fenótipo é resultado da ativação crônica do sistema dopaminérgico endógeno. E ainda, o fato de mutações nos receptores dopaminérgicos causarem alterações nas reservas de triglicérides reforça o papel da sinalização dopaminérgica endógena no controle da homeostase energética.

Embora a dopamina esteja envolvida com a modulação de vários comportamentos energeticamente custosos no *C. elegans*, pôde-se mostrar que esses comportamentos falham em justificar o fenótipo lipídico dopaminérgico. Observamos que a regulação dopaminérgica do perfil lipídico é causada por um aumento no fluxo de ácidos graxos através das vias periféricas de oxidação lipídica. Desta forma, a

regulação dopaminérgica da homeostase energética é semelhante à regulação serotoninérgica neste organismo. A exposição à serotonina exógena aumenta o batimento faríngeo e, conseqüentemente, a ingestão calórica do verme. Através de via independente, o neurotransmissor também reduz os estoques de triglicérides pelo aumento da oxidação lipídica. Considerando que a dopamina e a serotonina são liberadas quando o verme encontra o alimento, a regulação neuronal do metabolismo, independentemente de outros comportamentos, incluindo a ingestão calórica, aparenta ser um mecanismo comum desencadeado pela percepção do alimento.

Como já discutido, em condições adversas de crescimento, incluindo ausência de alimento e hiperpopulação, o verme pode iniciar via alternativa de desenvolvimento chamada “*dauer*”. Este estado é caracterizado por quiescência reprodutora, elevada resistência ao estresse, grande acúmulo de estoques lipídicos e longa sobrevivência, que pode chegar a oito meses. Sabe-se que a redução da sinalização pela via da insulina e TGF- β desencadeia o desenvolvimento das larvas *dauer*, o que é observado nos animais mutantes para o receptor de insulina, *daf-2*, e para peptídeo homólogo ao TGF- β , *daf-7* (Kimura *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997; Patterson *et al.*, 1997). Ao retornarem para condições favoráveis de desenvolvimento, os vermes reassumem o crescimento reprodutivo habitual. E ainda, alterações moleculares no estágio adulto, semelhantes às observadas na fase “*dauer*”, resultam em aumento da longevidade (Hu, 2007). Outra característica das larvas “*dauer*” é a reduzida movimentação, que está sob o controle do sistema dopaminérgico (Gaglia *et al.*, 2009). Considerando que a exposição de animais “*dauer*”, ou mesmo em jejum, está associada ao recomeço do crescimento e reprodução, atividades que necessitam de energia, a redução dos estoques lipídicos causada pela exposição à dopamina ou à serotonina exógenas é consistente com a função destes neurotransmissores em sinalizar a disponibilidade do alimento. Assim, sugere-se que manifestando como saciedade nos mamíferos ou redução do estoque energético nos vermes, níveis excessivos destes neurotransmissores funcionam como sinais antigos da presença do alimento.

Evidências indicam função do sistema dopaminérgico no controle do peso corporal em mamíferos. Estudos apontam para o aspecto motivacional da dopamina na

alimentação em modelos murinos e para a disfunção do sistema dopaminérgico desencadeada pelo consumo excessivo de alimentos altamente energéticos (Palmiter, 2007; Johnson e Kenny, 2010). Em humanos, a redução da sinalização dopaminérgica, seja através da manipulação farmacológica, observada no uso dos fármacos antipsicóticos, seja pela redução na densidade de receptores, está associada à obesidade (Wang *et al.*, 2001; Stice *et al.*, 2008; Nasrallah, 2008; Lieberman *et al.*, 2005). A evidência de que a dopamina pode influenciar a homeostase energética através da modulação da bioenergética celular sugere novo aspecto do sistema dopaminérgico a ser explorado.

A maior quantidade de calorias ingeridas que a necessária para manter o gasto energético total resulta no aumento da reserva energética e obesidade. O gasto energético total engloba vários processos metabólicos e comportamentos que exigem energia (Tseng *et al.*, 2010). Atualmente, os medicamentos aprovados para tratamento da obesidade atuam reduzindo a ingestão calórica e apresentam eficácia limitada a longo prazo (Tseng *et al.*, 2010). Considerando o que foi discutido sobre a regulação da homeostase energética em mamíferos, a terapêutica da obesidade, que envolve o controle da quantidade de calorias ingeridas e/ou o aumento do gasto voluntário de energia, apresenta limitações importantes. Sistemas redundantes controlam adaptações fisiológicas desencadeadas pelas alterações da quantidade de gordura, justificando a resposta temporária aos fármacos aprovados para o controle do apetite. Sugerimos que o controle do gasto energético basal é um mecanismo efetor independente, controlado pelo sistema de integração energética do SNC, e é utilizado para balancear alterações na ingestão calórica (Balthasar *et al.*, 2005; Tseng *et al.*, 2010). Intervenções modulatórias no gasto energético basal poderiam redefinir o *set-point* ponderal individual. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos centrais moduladores da bioenergética celular é uma estratégia atrativa para a melhora da terapêutica.

Recentemente, foi observado que o tratamento com o agonista do receptor D2, bromocriptina, aumenta o gasto metabólico basal em mulheres obesas (Kok *et al.*, 2006). Sugere-se que o sistema dopaminérgico funciona na regulação do metabolismo

energético basal, independentemente de outros comportamentos em humanos. Este estudo deve motivar a repetição das observações em modelos vertebrados e a busca por mecanismos de sinalização e neuroendócrinos ligando o sistema dopaminérgico e o uso de triglicérides através das vias oxidativas.

5 Conclusão

Concluimos que o sistema dopaminérgico está relacionado com a modulação da homeostase energética no verme. Através da ativação de seus receptores, a dopamina participa na regulação da bioenergética celular e, conseqüentemente, do volume do estoque lipídico.

Observamos que a dopamina exógena reduz a intensidade de fluorescência dos marcadores vitais. A confirmação da redução dos triglicérides foi corroborada pelo resultado da análise bioquímica dos lípidos totais extraídos de vermes expostos ao neurotransmissor. A partir da adoção da primeira hipótese, novo postulado surgiu para verificação da relação entre o sistema dopaminérgico endógeno e o fenótipo observado.

Os resultados obtidos nas análises das mutações com perda de função em genes codificadores dos componentes do sistema dopaminérgico, indicaram que a atividade dos receptores para dopamina influenciam o perfil lipídico do verme. Através de uma interação complexa entre os receptores dopaminérgicos, a dopamina reduz os estoques de triglicérides. Corroborada a participação direta do sistema dopaminérgico no controle metabólico, questionou-se se os comportamentos energeticamente custosos associados à dopamina seriam os responsáveis pela modificação no balanço energético.

Análises comportamentais mostraram que os principais fenótipos relacionados ao sistema dopaminérgico não resultam em modificações relevantes capazes de levar a uma modificação secundária na homeostase energética. Postulamos a hipótese de atuação direta do sistema dopaminérgico nos sistemas neuroendócrinos do verme que regulam as vias metabólicas.

O “*screen*” para vários genes codificadores de componentes das vias metabólicas, indicou a possível participação de enzimas catalisadoras da oxidação lipídica no fenótipo de redução dos triglicérides induzido pela dopamina. A confirmação que o silenciamento de três enzimas ligadas à β -oxidação reverte parcialmente o fenótipo, sugeriu que a hipótese do controle metabólico pela dopamina é verdadeira. Corroborou-se o fato através da verificação do aumento na oxidação lipídica seguida à exposição à dopamina.

Sugerimos um modelo no qual a dopamina está inserida no sistema integrado de regulação da homeostase energética do verme. Após a transdução de determinadas informações, o sistema dopaminérgico sinaliza, através de substratos neuroendócrinos ainda não caracterizados, para alterar a atividade das vias de oxidação lipídica, reduzindo, dessa forma, a reserva energética. Funções específicas para o fenótipo ainda são obscuras e seu entendimento poderá suscitar novas interpretações sobre as funções da bioenergética celular e do sistema dopaminérgico.

6 Referências

Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, Roth RH, Sleeman MW, Picciotto MR, Tschöp MH, Gao XB, Horvath TL. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. **J Clin Invest.** 2006 Dec;116(12):3229-39. Epub 2006 Oct 19.

Ahringer J. ed. Reverse genetics. **WormBook.** 2006 April 6:1-42.

Air EL, Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats. **Endocrinology.** 2002 Jun;143(6):2449-52.

Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. **Nature.** 2003 Jan 16;421(6920):268-72.

Ashrafi K. Mapping out starvation responses. **Cell Metab.** 2006 Apr;3(4):235-6.

Ashrafi K. Obesity and the regulation of fat metabolism. **WormBook.** 2007 Mar 9:1-20.

Avery L. The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**. 1993 Apr;133(4):897-917.

Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang CY, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK, Lowell BB. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. **Cell**. 2005 Nov 4;123(3):493-505.

Bargmann CI. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. **Science**. 1998 Dec 11;282(5396):2028-33.

Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of body-weight regulation. **Nature**. 2000 Apr 6;404(6778):644-51.

Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG Jr. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. **Nature**. 2003 Feb 20;421(6925):856-9.

Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. **J Neurosci**. 2002 Oct 15;22(20):9048-52.

Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neurosci Biobehav Rev.** 2002 Jun;26(4):393-428.

Björklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends Neurosci.** 2007 May;30(5):194-202. Epub 2007 Apr 3.

Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol.** 1959 Aug;37(8):911-7.

Blundell JE, Herberg LJ. Relative effects of nutritional deficit and deprivation period on rate of electrical self-stimulation of lateral hypothalamus. **Nature.** 1968 Aug 10;219(5154):627-8.

de Bono M, Maricq AV. Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. **Annu Rev Neurosci.** 2005;28:451-501.

Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics.** 1974 May;77(1):71-94.

Brock TJ, Browse J, Watts JL. Genetic regulation of unsaturated fatty acid composition in *C. elegans*. **PLoS Genet.** 2006 Jul;2(7):e108. Epub 2006 Jun 5.

Brooks KK, Liang B, Watts JL. The influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans*. **PLoS One**. 2009 Oct 21;4(10):e7545.

Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science**. 2000 Sep 22;289(5487):2122-5.

Burnell AM, Houthoofd K, O'Hanlon K, Vanfleteren JR. Alternate metabolism during the dauer stage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Exp Gerontol**. 2005 Nov;40(11):850-6. Epub 2005 Oct 10.

Buse JB, Cavazzoni P, Hornbuckle K, Hutchins D, Breier A, Jovanovic L. A retrospective cohort study of diabetes mellitus and antipsychotic treatment in the United States. **J Clin Epidemiol**. 2003 Feb;56(2):164-70.

Cadoni C, Solinas M, Valentini V, Di Chiara G. Selective psychostimulant sensitization by food restriction: differential changes in accumbens shell and core dopamine. **Eur J Neurosci**. 2003 Oct;18(8):2326-34.

Cannon CM, Abdallah L, Tecott LH, During MJ, Palmiter RD. Dysregulation of striatal dopamine signaling by amphetamine inhibits feeding by hungry mice. **Neuron**. 2004 Oct 28;44(3):509-20.

Chase DL, Pepper JS, Koelle MR. Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. **Nat Neurosci**. 2004 Oct;7(10):1096-103. Epub 2004 Sep 19.

Chase DL, Koelle MR. Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*. **WormBook**. 2007 Feb 20:1-15.

Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 2006 Jul 29;361(1471):1187-209.

Chavez M, Kaiyala K, Madden LJ, Schwartz MW, Woods SC. Intraventricular insulin and the level of maintained body weight in rats. **Behav Neurosci**. 1995 Jun;109(3):528-31.

Chee MJ, Myers MG Jr, Price CJ, Colmers WF. Neuropeptide Y suppresses anorexigenic output from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. **J Neurosci**. 2010 Mar 3;30(9):3380-90.

Cohen M, Reale V, Olofsson B, Knights A, Evans P, de Bono M. Coordinated regulation of foraging and metabolism in *C. elegans* by RFamide neuropeptide signaling. **Cell Metab**. 2009 Apr;9(4):375-85.

Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GS, O'Rahilly S. Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. **J Clin Endocrinol Metab**. 2004 Jun;89(6):2557-62.

Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. The hormonal control of food intake. **Cell**. 2007 Apr 20;129(2):251-62.

Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. **Nat Neurosci**. 2005 May;8(5):571-8.

Cope MB, Nagy TR, Fernández JR, Geary N, Casey DE, Allison DB. Antipsychotic drug-induced weight gain: development of an animal model. **Int J Obes (Lond)**. 2005 Jun;29(6):607-14.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**. 2001 May 24;411(6836):480-4.

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. **Diabetes**. 2001 Aug;50(8):1714-9.

Cunningham KA, Ashrafi K. Fat rationing in dauer times. **Cell Metab**. 2009 Feb;9(2):113-4.

Dal Santo P, Logan MA, Chisholm AD, Jorgensen EM. The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans*. **Cell**. 1999 Sep 17;98(6):757-67.

Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. **Gastroenterology**. 2002 Oct;123(4):1120-8.

Date Y, Shimbara T, Koda S, Toshinai K, Ida T, Murakami N, Miyazato M, Kokame K, Ishizuka Y, Ishida Y, Kageyama H, Shioda S, Kangawa K, Nakazato M. Peripheral ghrelin transmits orexigenic signals through the noradrenergic pathway from the hindbrain to the hypothalamus. **Cell Metab**. 2006 Oct;4(4):323-31.

Dempsey CM, Mackenzie SM, Gargus A, Blanco G, Sze JY. Serotonin (5HT), fluoxetine, imipramine and dopamine target distinct 5HT receptor signaling to modulate *Caenorhabditis elegans* egg-laying behavior. **Genetics**. 2005 Mar;169(3):1425-36. Epub 2005 Jan 16.

Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V, Kenny CD, Christiansen LM, White RD, Edelstein EA, Coppari R, Balthasar N, Cowley MA, Chua S Jr, Elmquist JK, Lowell BB. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. **Neuron**. 2006 Jan 19;49(2):191-203.

Diano S, Horvath B, Urbanski HF, Sotonyi P, Horvath TL. Fasting activates the nonhuman primate hypocretin (orexin) system and its postsynaptic targets. **Endocrinology**. 2003 Sep;144(9):3774-8.

Drago J, Gerfen CR, Lachowicz JE, Steiner H, Hollon TR, Love PE, Ooi GT, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, et al. Altered striatal function in a mutant mouse lacking D1A dopamine receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1994 Dec 20;91(26):12564-8.

Duerr JS, Frisby DL, Gaskin J, Duke A, Asermely K, Huddleston D, Eiden LE, Rand JB. The cat-1 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a vesicular monoamine transporter required for specific monoamine-dependent behaviors. **J Neurosci**. 1999 Jan 1;19(1):72-84.

Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD. Attenuation of the obesity syndrome of *ob/ob* mice by the loss of neuropeptide Y. **Science**. 1996 Dec 6;274(5293):1704-7.

Fares H, Grant B. Deciphering endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. **Traffic**. 2002 Jan;3(1):11-9.

Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. **J Clin Invest**. 2000 Jul;106(2):271-9.

Farooqi IS, Bullmore E, Keogh J, Gillard J, O'Rahilly S, Fletcher PC. Leptin regulates striatal regions and human eating behavior. **Science**. 2007 Sep 7;317(5843):1355. Epub 2007 Aug 9.

Farooqi S, O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. **Endocr Rev**. 2006 Dec;27(7):710-18. Epub 2006 Nov 22.

O'Rahilly S, Farooqi IS. Human obesity as a heritable disorder of the central control of energy balance. **Int J Obes (Lond)**. 2008 Dec;32 Suppl 7:S55-61.

Figlewicz DP. Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2003 Apr;284(4):R882-92.

Figlewicz DP, Szot P, Chavez M, Woods SC, Veith RC. Intraventricular insulin increases dopamine transporter mRNA in rat VTA/substantia nigra. **Brain Res**. 1994 May 2;644(2):331-4.

Figlewicz DP, Higgins MS, Ng-Evans SB, Havel PJ. Leptin reverses sucrose-conditioned place preference in food-restricted rats. **Physiol Behav**. 2001 May;73(1-2):229-34.

Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG. Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. **Brain Res**. 2003 Feb 21;964(1):107-15.

Figlewicz DP, Bennett J, Evans SB, Kaiyala K, Sipols AJ, Benoit SC. Intraventricular insulin and leptin reverse place preference conditioned with high-fat diet in rats. **Behav Neurosci**. 2004 Jun;118(3):479-87.

Figlewicz DP, Bennett JL, Naleid AM, Davis C, Grimm JW. Intraventricular insulin and leptin decrease sucrose self-administration in rats. **Physiol Behav**. 2006 Nov 30;89(4):611-6. Epub 2006 Oct 12.

Figlewicz DP, Benoit SC. Insulin, leptin, and food reward: update 2008. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2009 Jan;296(1):R9-R19. Epub 2008 Oct 22.

Flames N, Hobert O. Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation. **Nature**. 2009 Apr 16;458(7240):885-9. Epub 2009 Mar 15.

Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. **JAMA**. 2002 Oct 9;288(14):1723-7.

Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**. 2004 Jan 23;116(2):337-50.

Flier JS. AgRP in energy balance: Will the real AgRP please stand up? **Cell Metab.** 2006 Feb;3(2):83-5.

Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA. Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. **Nat Neurosci.** 2003 Sep;6(9):968-73.

Frank GK, Bailer UF, Henry SE, Drevets W, Meltzer CC, Price JC, Mathis CA, Wagner A, Hoge J, Ziolkowski S, Barbarich-Marsteller N, Weissfeld L, Kaye WH. Increased dopamine D2/D3 receptor binding after recovery from anorexia nervosa measured by positron emission tomography and [11c]raclopride. **Biol Psychiatry.** 2005 Dec 1;58(11):908-12. Epub 2005 Jun 29.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature.** 1998 Oct 22;395(6704):763-70.

Fulton S, Woodside B, Shizgal P. Modulation of brain reward circuitry by leptin. **Science.** 2000 Jan 7;287(5450):125-8.

Fulton S, Pissios P, Manchon RP, Stiles L, Frank L, Pothos EN, Maratos-Flier E, Flier JS. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. **Neuron.** 2006 Sep 21;51(6):811-22.

Gaglia MM, Kenyon C. Stimulation of movement in a quiescent, hibernation-like form of *Caenorhabditis elegans* by dopamine signaling. **J Neurosci.** 2009 Jun 3;29(22):7302-14.

Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi CS, Bechmann I, Leranth C, Toran-Allerand D, Priest CA, Roberts JL, Gao XB, Mobbs C, Shulman GI, Diano S, Horvath TL. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. **Nat Med.** 2007 Jan;13(1):89-94. Epub 2006 Dec 31.

Gooley JJ, Schomer A, Saper CB. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. **Nat Neurosci.** 2006 Mar;9(3):398-407. Epub 2006 Feb 19.

Greer ER, Pérez CL, Van Gilst MR, Lee BH, Ashrafi K. Neural and molecular dissection of a *C. elegans* sensory circuit that regulates fat and feeding. **Cell Metab.** 2008 Aug;8(2):118-31.

Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Brüning JC. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. **Nat Neurosci.** 2005 Oct;8(10):1289-91. Epub 2005 Sep 11.

Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. **Nat Neurosci.** 1998 Aug;1(4):271-2.

Halatchev IG, Ellacott KL, Fan W, Cone RD. Peptide YY3-36 inhibits food intake in mice through a melanocortin-4 receptor-independent mechanism. **Endocrinology**. 2004 Jun;145(6):2585-90. Epub 2004 Mar 11.

Hall DH, Lints R, Altun Z. Nematode neurons: anatomy and anatomical methods in *Caenorhabditis elegans*. **Int Rev Neurobiol**. 2006;69:1-35.

Hashmi S, Zhang J, Oksov Y, Ji Q, Lustigman S. The *Caenorhabditis elegans* CPI-2a cystatin-like inhibitor has an essential regulatory role during oogenesis and fertilization. **J Biol Chem**. 2006 Sep 22;281(38):28415-29. Epub 2006 Jul 20.

Hills T, Brockie PJ, Maricq AV. Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in *Caenorhabditis elegans*. **J Neurosci**. 2004 Feb 4;24(5):1217-25.

Hnasko TS, Szczypka MS, Alaynick WA, During MJ, Palmiter RD. A role for dopamine in feeding responses produced by orexigenic agents. **Brain Res**. 2004 Oct 15;1023(2):309-18.

Hnasko TS, Perez FA, Scouras AD, Stoll EA, Gale SD, Luquet S, Phillips PE, Kremer EJ, Palmiter RD. Cre recombinase-mediated restoration of nigrostriatal dopamine in dopamine-deficient mice reverses hypophagia and bradykinesia. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2006 Jun 6;103(23):8858-63. Epub 2006 May 24.

Hodgkin J. Karyotype, ploidy, and gene dosage. **WormBook**. 2005 Jun 25:1-9.

Hoebel BG, Teitelbaum P. Hypothalamic control of feeding and self-stimulation. **Science**. 1962 Feb 2;135:375-7.

Holt SJ, Riddle DL. SAGE surveys *C. elegans* carbohydrate metabolism: evidence for an anaerobic shift in the long-lived dauer larva. **Mech Ageing Dev**. 2003 Jul;124(7):779-800.

Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu ZW, Gao XB, Thurmon JJ, Marinelli M, DiLeone RJ. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. **Neuron**. 2006 Sep 21;51(6):801-10.

Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**. 2001;24:677-736.

Hu PJ. Dauer. **WormBook**. 2007 Aug 8:1-19.

Hunt-Newbury R, Viveiros R, Johnsen R, Mah A, Anastas D, Fang L, Halfnight E, Lee D, Lin J, Lorch A, McKay S, Okada HM, Pan J, Schulz AK, Tu D, Wong K, Zhao Z, Alexeyenko A, Burglin T, Sonnhammer E, Schnabel R, Jones SJ, Marra MA, Baillie DL,

Moerman DG. High-throughput in vivo analysis of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Biol.** 2007 Sep;5(9):e237.

Iversen SD, Iversen LL. Dopamine: 50 years in perspective. **Trends Neurosci.** 2007 May;30(5):188-93.

James WP. The epidemiology of obesity: the size of the problem. **J Intern Med.** 2008 Apr;263(4):336-52. Epub 2008 Feb 27.

Jayanthi LD, Apparsundaram S, Malone MD, Ward E, Miller DM, Eppler M, Blakely RD. The *Caenorhabditis elegans* gene T23G5.5 encodes an antidepressant- and cocaine-sensitive dopamine transporter. **Mol Pharmacol.** 1998 Oct;54(4):601-9.

Jeong PY, Jung M, Yim YH, Kim H, Park M, Hong E, Lee W, Kim YH, Kim K, Paik YK. Chemical structure and biological activity of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone. **Nature.** 2005 Feb 3;433(7025):541-5.

Jerlhag E, Grøtli M, Luthman K, Svensson L, Engel JA. Role of the subunit composition of central nicotinic acetylcholine receptors for the stimulatory and dopamine-enhancing effects of ethanol. **Alcohol Alcohol.** 2006 Sep-Oct;41(5):486-93. Epub 2006 Jun 23.

Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. **Nat Neurosci.** 2010 May;13(5):635-41. Epub 2010 Mar 28.

Jones KT, Greer ER, Pearce D, Ashrafi K. Rictor/TORC2 regulates *Caenorhabditis elegans* fat storage, body size, and development through *sgk-1*. **PLoS Biol.** 2009 Mar 3;7(3):e60.

Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nat Rev Drug Discov.** 2006 May;5(5):387-98.

Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Genome Biol.** 2001;2(1):RESEARCH0002. Epub 2000 Dec 20.

Kapur S, Remington G. Atypical antipsychotics: new directions and new challenges in the treatment of schizophrenia. **Annu Rev Med.** 2001;52:503-17.

Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. **J Neurosci.** 2002 May 1;22(9):3306-11.

Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Science**. 1997 Aug 15;277(5328):942-6.

Kindt KS, Quast KB, Giles AC, De S, Hendrey D, Nicastro I, Rankin CH, Schafer WR. Dopamine mediates context-dependent modulation of sensory plasticity in *C. elegans*. **Neuron**. 2007 Aug 16;55(4):662-76.

Kniazeva M, Sieber M, McCauley S, Zhang K, Watts JL, Han M. Suppression of the ELO-2 FA elongation activity results in alterations of the fatty acid composition and multiple physiological defects, including abnormal ultradian rhythms, in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**. 2003 Jan;163(1):159-69.

Kniazeva M, Crawford QT, Seiber M, Wang CY, Han M. Monomethyl branched-chain fatty acids play an essential role in *Caenorhabditis elegans* development. **PLoS Biol**. 2004 Sep;2(9):E257. Epub 2004 Aug 31.

Kok P, Roelfsema F, Frölich M, van Pelt J, Stokkel MP, Meinders AE, Pijl H. Activation of dopamine D2 receptors simultaneously ameliorates various metabolic features of obese women. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2006 Nov;291(5):E1038-43. Epub 2006 Jun 27.

Kumarnsit E, Johnstone LE, Leng G. Actions of neuropeptide Y and growth hormone secretagogues in the arcuate nucleus and ventromedial hypothalamic nucleus. **Eur J Neurosci**. 2003 Mar;17(5):937-44.

Kurzchalia TV, Ward S. Why do worms need cholesterol? **Nat Cell Biol.** 2003 Aug;5(8):684-8.

Lee SS, Kennedy S, Tolonen AC, Ruvkun G. DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. **Science.** 2003 Apr 25;300(5619):644-7. Epub 2003 Apr 10.

Lee YS, Challis BG, Thompson DA, Yeo GS, Keogh JM, Madonna ME, Wraight V, Sims M, Vatin V, Meyre D, Shield J, Burren C, Ibrahim Z, Cheetham T, Swift P, Blackwood A, Hung CC, Wareham NJ, Froguel P, Millhauser GL, O'Rahilly S, Farooqi IS. A POMC variant implicates beta-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. **Cell Metab.** 2006 Feb;3(2):135-40.

Leibel RL. Molecular physiology of weight regulation in mice and humans. **Int J Obes (Lond).** 2008 Dec;32 Suppl 7:S98-108.

Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. **N Engl J Med.** 1995 Mar 9;332(10):621-28.

le Roux CW, Aylwin SJ, Batterham RL, Borg CM, Coyle F, Prasad V, Shurey S, Ghatgei MA, Patel AG, Bloom SR. Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. **Ann Surg.** 2006 Jan;243(1):108-14.

Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Davis JM. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. **Lancet**. 2009 Jan 3;373(9657):31-41. Epub 2008 Dec 6.

Lewis DA, Lieberman JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. **Neuron**. 2000 Nov;28(2):325-34.

Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK; Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Investigators. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia.

N Engl J Med. 2005 Sep 22;353(12):1209-23. Epub 2005 Sep 19.

Lints R, Emmons SW. Patterning of dopaminergic neurotransmitter identity among *Caenorhabditis elegans* ray sensory neurons by a TGFbeta family signaling pathway and a Hox gene. **Development**. 1999 Dec;126(24):5819-31.

Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. **Science**. 2005 Oct 28;310(5748):683-5.

Luquet S, Phillips CT, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are not essential for feeding responses to glucoprivation. **Peptides**. 2007 Feb;28(2):214-25. Epub 2006 Dec 27.

Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1999 Dec 21;96(26):15239-44.

Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E, Anderson P, Szczepaniak LS, Dobbins RL, McGarry JD, Parker KL. Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. **Endocrinology**. 2002 Feb;143(2):607-14.

Mak HY, Nelson LS, Basson M, Johnson CD, Ruvkun G. Polygenic control of *Caenorhabditis elegans* fat storage. **Nat Genet**. 2006 Mar;38(3):363-8. Epub 2006 Feb 5.

Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. **Int J Obes Relat Metab Disord**. 2002 Nov;26(11):1407-33.

McDonald PW, Jessen T, Field JR, Blakely RD. Dopamine signaling architecture in *Caenorhabditis elegans*. **Cell Mol Neurobiol**. 2006 Jul-Aug;26(4-6):593-618. Epub 2006 May 25.

McKay RM, McKay JP, Avery L, Graff JM. *C. elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. **Dev Cell**. 2003 Jan;4(1):131-42.

van Meer G. Cellular lipidomics. **EMBO J**. 2005 Sep 21;24(18):3159-65. Epub 2005 Sep 1.

Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. **Mol Psychiatry**. 2005 Jan;10(1):79-104.

Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. **Diabetes**. 1998 Feb;47(2):294-7.

Mörck C, Olsen L, Kurth C, Persson A, Storm NJ, Svensson E, Jansson JO, Hellqvist M, Enejder A, Faergeman NJ, Pilon M. Statins inhibit protein lipidation and induce the unfolded protein response in the non-sterol producing nematode *Caenorhabditis elegans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2009 Oct 27;106(43):18285-90. Epub 2009 Oct 13.

Morgan K, Obici S, Rossetti L. Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated. **J Biol Chem**. 2004 Jul 23;279(30):31139-48. Epub 2004 May 19.

Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**. 2006 Sep 21;443(7109):289-95.

Mullaney BC, Ashrafi K. C. elegans fat storage and metabolic regulation. **Biochim Biophys Acta**. 2009 Jun;1791(6):474-8. Epub 2009 Jan 3.

Münzberg H, Myers MG Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. **Nat Neurosci**. 2005 May;8(5):566-70.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**. 2001 Jan 11;409(6817):194-8.

Nasrallah HA. Atypical antipsychotic-induced metabolic side effects: insights from receptor-binding profiles. **Mol Psychiatry**. 2008 Jan;13(1):27-35. Epub 2007 Sep 11.

Nass R, Hall DH, Miller DM 3rd, Blakely RD. Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2002 Mar 5;99(5):3264-9. Epub 2002 Feb 26.

Nass R, Blakely RD. The *Caenorhabditis elegans* dopaminergic system: opportunities for insights into dopamine transport and neurodegeneration. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 2003;43:521-44. Epub 2002 Jan 10.

Newcomer JW. Metabolic considerations in the use of antipsychotic medications: a review of recent evidence. **J Clin Psychiatry**. 2007;68 Suppl 1:20-7.

Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. **Trends Endocrinol Metab**. 2004 Oct;15(8):362-9.

Nomura T, Horikawa M, Shimamura S, Hashimoto T, Sakamoto K. Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* is mediated by SREBP homolog SBP-1. **Genes Nutr**. 2010 Mar;5(1):17-27. Epub 2009 Nov 20.

Nonomura T, Tsuchida A, Ono-Kishino M, Nakagawa T, Taiji M, Noguchi H.

Brain-derived neurotrophic factor regulates energy expenditure through the central nervous system in obese diabetic mice. **Int J Exp Diabetes Res**. 2001;2(3):201-9.

Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, Rossetti L. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. **Diabetes**. 2002 Feb;51(2):271-5.

Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L. Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. **Nat Med**. 2003 Jun;9(6):756-61. Epub 2003 May 18.

Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. **JAMA**. 2006 Apr 5;295(13):1549-55.

Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. **Gastroenterology**. 2007 May;132(6):2087-102.

Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. **Nature**. 1997 Oct 30;389(6654):994-9.

Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI, Gorden P, Garg A. Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. **N Engl J Med**. 2002 Feb 21;346(8):570-8.

O'Rourke EJ, Soukas AA, Carr CE, Ruvkun G. *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. **Cell Metab**. 2009 Nov;10(5):430-5.

Palmiter RD. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? **Trends Neurosci**. 2007 Aug;30(8):375-81. Epub 2007 Jun 29.

Patterson GL, Kowalek A, Wong A, Liu Y, Ruvkun G. The DAF-3 Smad protein antagonizes TGF-beta-related receptor signaling in the *Caenorhabditis elegans* dauer pathway. **Genes Dev.** 1997 Oct 15;11(20):2679-90.

Peciña S, Cagniard B, Berridge KC, Aldridge JW, Zhuang X. Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. **J Neurosci.** 2003 Oct 15;23(28):9395-402.

Perez CL, Van Gilst MR. A ¹³C isotope labeling strategy reveals the influence of insulin signaling on lipogenesis in *C. elegans*. **Cell Metab.** 2008 Sep;8(3):266-74.

Pierce SB, Costa M, Wisotzkey R, Devadhar S, Homburger SA, Buchman AR, Ferguson KC, Heller J, Platt DM, Pasquinelli AA, Liu LX, Doberstein SK, Ruvkun G. Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. **Genes Dev.** 2001 Mar 15;15(6):672-86.

Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. **Science.** 2004 Apr 2;304(5667):110-5.

Podda MV, Riccardi E, D'Ascenzo M, Azzena GB, Grassi C. Dopamine D1-like receptor activation depolarizes medium spiny neurons of the mouse nucleus accumbens by inhibiting inwardly rectifying K⁺ currents through a cAMP-dependent protein kinase A-independent mechanism. **Neuroscience.** 2010 May 19;167(3):678-90. Epub 2010 Mar 6.

Pothos EN, Creese I, Hoebel BG. Restricted eating with weight loss selectively decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and alters dopamine response to amphetamine, morphine, and food intake. **J Neurosci.** 1995 Oct;15(10):6640-50.

Qian S, Chen H, Weingarh D, Trumbauer ME, Novi DE, Guan X, Yu H, Shen Z, Feng Y, Frazier E, Chen A, Camacho RE, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Marsh DJ. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. **Mol Cell Biol.** 2002 Jul;22(14):5027-35.

Ramot D, Johnson BE, Berry TL Jr, Carnell L, Goodman MB. **PLoS One.** 2008 May 21;3(5):e2208.

Rankin CH. From gene to identified neuron to behaviour in *Caenorhabditis elegans*. **Nat Rev Genet.** 2002 Aug;3(8):622-30.

Rice ME. Distinct regional differences in dopamine-mediated volume transmission. **Prog Brain Res.** 2000;125:277-90.

Rankinen T, Bouchard C. Genetics of food intake and eating behavior phenotypes in humans. **Annu Rev Nutr.** 2006;26:413-34.

Ringstad N, Abe N, Horvitz HR. Ligand-gated chloride channels are receptors for biogenic amines in *C. elegans*. **Science**. 2009 Jul 3;325(5936):96-100.

Robinson DG, Woerner MG, Alvir JM, Geisler S, Koreen A, Sheitman B, Chakos M, Mayerhoff D, Bilder R, Goldman R, Lieberman JA. Predictors of treatment response from a first episode of schizophrenia or schizoaffective disorder. **Am J Psychiatry**. 1999 Apr;156(4):544-9.

Rose JK, Rankin CH. Analyses of habituation in *Caenorhabditis elegans*. **Learn Mem**. 2001 Mar-Apr;8(2):63-9.

Ryan MC, Collins P, Thakore JH. Impaired fasting glucose tolerance in first-episode, drug-naïve patients with schizophrenia. **Am J Psychiatry**. 2003 Feb;160(2):284-9.

Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM. Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. **Curr Opin Pharmacol**. 2005 Feb;5(1):34-41.

Sanyal S, Wintle RF, Kindt KS, Nuttley WM, Arvan R, Fitzmaurice P, Bigras E, Merz DC, Hébert TE, van der Kooy D, Schafer WR, Culotti JG, Van Tol HH. Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. **EMBO J**. 2004 Jan 28;23(2):473-82. Epub 2004 Jan 22.

Sawin ER, Ranganathan R, Horvitz HR. *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. **Neuron**. 2000 Jun;26(3):619-31.

Schafer WR, Kenyon CJ. A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**. 1995 May 4;375(6526):73-8.

Schafer WR. Egg-laying. **WormBook**. 2005 Dec 14:1-7.

Schultz W. Multiple dopamine functions at different time courses. **Annu Rev Neurosci**. 2007;30:259-88.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. **Nature**. 2000 Apr 6;404(6778):661-71.

Seeley RJ, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Thiele TE, van Dijk G, Baskin DG, Schwartz MW. Melanocortin receptors in leptin effects. **Nature**. 1997 Nov 27;390(6658):349.

Seeley RJ, Woods SC. Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. **Nat Rev Neurosci**. 2003 Nov;4(11):901-9.

Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. **Nature**. 1998 Dec 17;396(6712):670-4.

Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. **Diabetes**. 2001 Feb;50(2):227-32.

Siegel G, Albers RW, Brady S, Price D. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. **American Society for Neurochemistry-Academic Press**. 7 edition 2005 Nov 14:1016 pages.

Sipols AJ, Stuber GD, Klein SN, Higgins MS, Figlewicz DP. Insulin and raclopride combine to decrease short-term intake of sucrose solutions. *Peptides*. 2000 Sep;21(9):1361-7.

Small DM, Jones-Gotman M, Dagher A. Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. **Neuroimage**. 2003 Aug;19(4):1709-15.

Sotak BN, Hnasko TS, Robinson S, Kremer EJ, Palmiter RD. Dysregulation of dopamine signaling in the dorsal striatum inhibits feeding. **Brain Res.** 2005 Nov 9;1061(2):88-96. Epub 2005 Oct 13.

Soulard A, Cohen A, Hall MN. TOR signaling in invertebrates. **Curr Opin Cell Biol.** 2009 Dec;21(6):825-36. Epub 2009 Sep 19.

Spanier B, Lasch K, Marsch S, Benner J, Liao W, Hu H, Kienberger H, Eisenreich W, Daniel H. How the intestinal peptide transporter PEPT-1 contributes to an obesity phenotype in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One.** 2009 Jul 21;4(7):e6279.

Srinivasan S, Sadegh L, Elle IC, Christensen AG, Faergeman NJ, Ashrafi K. Serotonin regulates *C. elegans* fat and feeding through independent molecular mechanisms. **Cell Metab.** 2008 Jun;7(6):533-44.

Stice E, Spoor S, Bohon C, Small DM. Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele. **Science.** 2008 Oct 17;322(5900):449-52.

Sugiura M, Fuke S, Suo S, Sasagawa N, Van Tol HH, Ishiura S. Characterization of a novel D2-like dopamine receptor with a truncated splice variant and a D1-like dopamine receptor unique to invertebrates from *Caenorhabditis elegans*. **J Neurochem.** 2005 Aug;94(4):1146-57. Epub 2005 Jul 7.

Sulston J, Dew M, Brenner S. Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **J Comp Neurol**. 1975 Sep 15;163(2):215-26.

Suo S, Sasagawa N, Ishiura S. Identification of a dopamine receptor from *Caenorhabditis elegans*. **Neurosci Lett**. 2002 Feb 8;319(1):13-6.

Suo S, Sasagawa N, Ishiura S. Cloning and characterization of a *Caenorhabditis elegans* D2-like dopamine receptor. **J Neurochem**. 2003 Aug;86(4):869-78.

Suo S, Ishiura S, Van Tol HH. Dopamine receptors in *C. elegans*. **Eur J Pharmacol**. 2004 Oct 1;500(1-3):159-66.

Suo S, Culotti JG, Van Tol HH. Dopamine counteracts octopamine signalling in a neural circuit mediating food response in *C. elegans*. **EMBO J**. 2009 Aug 19;28(16):2437-48. Epub 2009 Jul 16.

Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 2004;44:269-96.

Szczypka MS, Rainey MA, Kim DS, Alaynick WA, Marck BT, Matsumoto AM, Palmiter RD. Feeding behavior in dopamine-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1999 Oct 12;96(21):12138-43.

Szczypka MS, Mandel RJ, Donahue BA, Snyder RO, Leff SE, Palmiter RD. Viral gene delivery selectively restores feeding and prevents lethality of dopamine-deficient mice. **Neuron**. 1999 Jan;22(1):167-78.

Szczypka MS, Rainey MA, Palmiter RD. Dopamine is required for hyperphagia in Lep(ob/ob) mice. **Nat Genet**. 2000 May;25(1):102-4.

Szczypka MS, Kwok K, Brot MD, Marck BT, Matsumoto AM, Donahue BA, Palmiter RD. Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. **Neuron**. 2001 Jun;30(3):819-28.

Sze JY, Victor M, Loer C, Shi Y, Ruvkun G. Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. **Nature**. 2000 Feb 3;403(6769):560-4.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**. 1995 Dec 29;83(7):1263-71.

Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. **Endocrinology**. 2003 Apr;144(4):1506-12.

Tronson NC, Taylor JR. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nat Rev Neurosci.** 2007 Apr;8(4):262-75.

Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. **Nat Rev Drug Discov.** 2010 Jun;9(6):465-82.

Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. **Science.** 2005 May 13;308(5724):1043-5. Epub 2005 Apr 21.

Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. **Nat Genet.** 1998 Oct;20(2):113-4.

Van Gilst MR, Hadjivassiliou H, Jolly A, Yamamoto KR. Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*. **PLoS Biol.** 2005 Feb;3(2):e53. Epub 2005 Feb 8.

Van Gilst MR, Hadjivassiliou H, Yamamoto KR. A *Caenorhabditis elegans* nutrient response system partially dependent on nuclear receptor NHR-49. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2005 Sep 20;102(38):13496-501. Epub 2005 Sep 12.

Vestri HS, Maianu L, Moellering DR, Garvey WT. Atypical antipsychotic drugs directly impair insulin action in adipocytes: effects on glucose transport, lipogenesis, and antilipolysis. **Neuropsychopharmacology**. 2007 Apr;32(4):765-72. Epub 2006 Jun 28.

Volkow ND, Wise RA. How can drug addiction help us understand obesity? **Nat Neurosci**. 2005 May;8(5):555-60.

Wanders RJ, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. **Annu Rev Biochem**. 2006;75:295-332.

Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N, Fowler JS. Brain dopamine and obesity. **Lancet**. 2001 Feb 3;357(9253):354-7.

Wang H, Storlien LH, Huang XF. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2002 Jun;282(6):E1352-9.

Wang Y, Liu J. Plasma ghrelin modulation in gastric band operation and sleeve gastrectomy. **Obes Surg**. 2009 Mar;19(3):357-62. Epub 2008 Oct 8.

Wang MC, O'Rourke EJ, Ruvkun G. Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. **Science**. 2008 Nov 7;322(5903):957-60.

Watts JL, Browse J. Genetic dissection of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Caenorhabditis elegans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2002 Apr 30;99(9):5854-9. Epub 2002 Apr 23.

Weinshenker D, Garriga G, Thomas JH. Genetic and pharmacological analysis of neurotransmitters controlling egg laying in *C. elegans*. **J Neurosci**. 1995 Oct;15(10):6975-85.

Wellman PJ, Davis KW, Nation JR. Augmentation of cocaine hyperactivity in rats by systemic ghrelin. **Regul Pept**. 2005 Feb 15;125(1-3):151-4.

White JG, Horvitz HR, Sulston JE. Neurone differentiation in cell lineage mutants of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**. 1982 Jun 17;297(5867):584-7.

Wing RR, Phelan S. Long-term weight loss maintenance. **Am J Clin Nutr**. 2005 Jul;82(1 Suppl):222S-225S.

Wise RA. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. **Neuron**. 2002 Oct 10;36(2):229-40.

Wortley KE, Anderson KD, Yasenchak J, Murphy A, Valenzuela D, Diano S, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW. Agouti-related protein-deficient mice display an age-related lean phenotype. **Cell Metab.** 2005 Dec;2(6):421-7.

Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. **Nat Neurosci.** 2003 Jul;6(7):736-42.

You YJ, Kim J, Raizen DM, Avery L. Insulin, cGMP, and TGF-beta signals regulate food intake and quiescence in *C. elegans*: a model for satiety. **Cell Metab.** 2008 Mar;7(3):249-57.

Zhang SO, Box AC, Xu N, Le Men J, Yu J, Guo F, Trimble R, Mak HY. Genetic and dietary regulation of lipid droplet expansion in *Caenorhabditis elegans*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2010 Mar 9;107(10):4640-5. Epub 2010 Feb 22.

Zhou QY, Palmiter RD. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. **Cell.** 1995 Dec 29;83(7):1197-209.

Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. **J Comp Neurol.** 2006 Jan 20;494(3):528-48.

Apêndice A

Tabela 3 – Relação dos clones utilizados para o *screen* metabólico dopaminérgico

Nome da Sequência	Nome do gene
F28F8.2	<i>Acyl-CoA Synthetase (acs-2)</i>
F41C3.3	<i>Acyl-CoA Synthetase (acs-11)</i>
C46F4.2	<i>Acyl-CoA Synthetase (acs-17)</i>
F37C12.7	<i>Acyl-CoA Synthetase</i>
F47G6.2	<i>Acyl-CoA Synthetase</i>
Y65B4BL.5	<i>Acyl-CoA Synthetase</i>
R07C3.4	<i>Acyl-CoA Synthetase</i>
R09E10.3	<i>Acyl-CoA Synthetase</i>
Y76A2B.3	<i>Acyl-CoA Synthetase</i>
R09E10.4	<i>Acyl-CoA Synthetase</i>
F46E10.1	<i>Acyl-CoA Synthetase</i>
R07H5.2	<i>Carnitine Palmitoyl Transferase II (cpt-2)</i>
Y48G9A.10	<i>Carnitine Palmitoyl Transferase I (cpt-3)</i>
F09F3.9	<i>Carnitine Palmitoyl Transferase I (cpt-5)</i>
W01A11.5	<i>Carnitine Palmitoyl Transferase I (cpt-6)</i>
F41E7.6	<i>Carnitine Palmitoyl Transferase I</i>
T20B3.1	<i>Carnitine Palmitoyl Transferase I</i>
C02B10.1	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase (ivd-1)</i>
F54D5.7	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase</i>
K06A5.6	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase</i>
E04F6.5	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase</i>
K05F1.3	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase</i>
F28A10.6	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase</i>
T08G2.3	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase</i>
T25G12.5	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase</i>
C44B7.8	<i>Peroxisomal Membrane Transporter (pmp-1)</i>
C44B7.9	<i>Peroxisomal Membrane Transporter (pmp-2)</i>
C48B4.1	<i>Acyl-CoA Oxidase</i>
F25C8.1	<i>Acyl-CoA Oxidase</i>
F59F4.1	<i>Acyl-CoA Oxidase</i>
F08A8.1	<i>Acyl-CoA Oxidase</i>
F08A8.2	<i>Acyl-CoA Oxidase</i>
F08A8.3	<i>Acyl-CoA Oxidase</i>
F08A8.4	<i>Acyl-CoA Oxidase</i>

C29F3.1	<i>Enoyl-CoA Hydratase (ech-1)</i>
F38H4.8	<i>Enoyl-CoA Hydratase (ech-2)</i>
F43H9.1	<i>Enoyl-CoA Hydratase (ech-3)</i>
R06F6.9	<i>Enoyl-CoA Hydratase (ech-4)</i>
T05G5.6	<i>Enoyl-CoA Hydratase (ech-6)</i>
Y105E8A.4	<i>Enoyl-CoA Hydratase (ech-7)</i>
F01G10.2	<i>Enoyl-CoA Hydratase (ech-8)</i>
F01G10.3	<i>Enoyl-CoA Hydratase (ech-9)</i>
F01G4.2	<i>3-Hydroxy Acyl-CoA Dehydrogenase (ard-1)</i>
R09B5.6	<i>3-Hydroxy Acyl-CoA Dehydrogenase (hacd-1)</i>
B0272.3	<i>3-Hydroxy Acyl-CoA Dehydrogenase</i>
F54C8.1	<i>3-Hydroxy Acyl-CoA Dehydrogenase</i>
T02G5.8	<i>Acetoacetyl-CoA Thiolase (kat-1)</i>
B0303.3	<i>3-ketoacyl-CoA Thiolase</i>
Y57A10C.6	<i>3-ketoacyl-CoA Thiolase</i>
Y67H2A.8	<i>w3 Desaturase (fat-1)</i>
W02A2.1	<i>D12 Desaturase (fat-2)</i>
W08D2.4	<i>D6 Desaturase (fat-3)</i>
T13F2.1	<i>D5 Desaturase (fat-4)</i>
W06D12.3	<i>D9 Desaturase (fat-5)</i>
VZK822L.1	<i>D9 Desaturase (fat-6)</i>
F10D2.9	<i>D9 Desaturase (fat-7)</i>
F56H11.4	<i>PUFA elongase (elo-1)</i>
F11E6.5	<i>Palmitic acid elongase (elo-2)</i>
D2024.3	<i>PUFA elongase (elo-3)</i>
C40H1.4	<i>PUFA elongase (elo-4)</i>
F41H10.7	<i>PUFA elongase (elo-5)</i>
F41H10.8	<i>PUFA elongase (elo-6)</i>
F56H11.3	<i>PUFA elongase (elo-7)</i>
Y53F4B.2	<i>PUFA elongase (elo-8)</i>
F33D4.4	<i>Desaturase</i>
F40F4.3	<i>Fatty Acid Binding Protein (lbp-1)</i>
F40F4.2	<i>Fatty Acid Binding Protein (lbp-2)</i>
F40F4.4	<i>Fatty Acid Binding Protein (lbp-3)</i>
ZK742.5	<i>Fatty Acid Binding Protein (lbp-4)</i>
W02D3.7	<i>Fatty Acid Binding Protein (lbp-5)</i>
W02D3.5	<i>Fatty Acid Binding Protein (lbp-6)</i>
T22G5.2	<i>Fatty Acid Binding Protein (lbp-7)</i>
T22G5.6	<i>Fatty Acid Binding Protein (lbp-8)</i>
Y40B10A.1	<i>Fatty Acid Binding Protein (lbp-9)</i>
EEED8.2	<i>Fatty Acid Binding Protein</i>
EEED8.3	<i>Fatty Acid Binding Protein</i>
F28D1.9	<i>Fatty Acid Transport Protein</i>

F13D12.9	<i>Phospholipid Biosynthesis</i>
C03H5.4	<i>Phospholipase A2</i>
C07E3.9	<i>Phospholipase A2</i>
F32H2.5	<i>Fatty Acid Synthase (fasn-1)</i>
W09B6.1	<i>Acetyl-CoA Carboxylase (pod-2)</i>
T02G5.7	<i>Acetoacetyl-CoA Thiolase</i>
T02G5.4	<i>Acetoacetyl-CoA Thiolase</i>
F53A2.7	<i>Acetoacetyl-CoA Thiolase</i>
F25B4.6	<i>HMG-CoA Synthase</i>
Y71G12B.10	<i>HMG-CoA Lyase</i>
F10G8.9	<i>Beta Keto-Acyl Synthetase</i>
C25A1.5	<i>Fatty-Acid Hydroxylase</i>
C46C11.1	<i>Hormone Sensitive Lipase</i>
C50D2.7	<i>Glucokinase</i>