

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

BERNARDO CAETANO ASSEIN ARÚS

**CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS PERINEURAIS ASSOCIADAS A NEURÔNIOS
SIMPÁTICOS DE CAMUNDONGOS**

PORTO ALEGRE

2018

BERNARDO CAETANO ASSEIN ARÚS

**CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS PERINEURAIS ASSOCIADAS A NEURÔNIOS
SIMPÁTICOS DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas e da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Ana Isabel Domingos

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

ARÚS, BERNARDO CAETANO ASSEIN
CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS PERINEURAIS ASSOCIADAS A
NEURÔNIOS SIMPÁTICOS DE CAMUNDONGOS / BERNARDO CAETANO
ASSEIN ARÚS. -- 2018.

63 f.

Orientador: DIOGO ONOFRE GOMES DE SOUZA.

Coorientadora: ANA ISABEL DIAS NETO DOMINGOS.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Bioquímica. 2. Sistema nervoso. 3. Sistema
nervoso periférico. 4. Nervos periféricos. 5. Leptina.
I. SOUZA, DIOGO ONOFRE GOMES DE, orient. II.
DOMINGOS, ANA ISABEL DIAS NETO, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, Prof. Diogo Souza, por aceitar me orientar, pelo amplo e irrestrito apoio às minhas decisões, pela abertura à colaboração da qual resultou este trabalho, bem como pelo exemplo profissional e pessoal.

À Prof^a. Ana Domingos por me receber de braços abertos no seu laboratório no IGC, por todo o apoio, orientações e estímulos. Agradeço também às agências que fomentam a pesquisa no seu laboratório e permitiram o financiamento dos experimentos aqui realizados, em especial à European Molecular Biology Association (EMBO), Fundação para a Ciência e Tecnologia, Howard Hughes Medical Institute, e Human Frontier Science Program.

À Noelia Martínez-Sánchez pelo suporte fundamental e imprescindível neste período; não somente pelos ensinamentos técnicos, teóricos e críticos, mas também pelos importantes momentos de descontração.

Aos demais membros e ex-membros do laboratório, Raquel Mendes, Vitka Gres, Ana Carolina Temporão, Chelsea Larabee, Francesco Diversi, Miguel Costa e Inês Mahú, por todo o apoio oferecido. Em especial, agradeço à Roksana Pirzgalska pelo treinamento e ensinamento de diversas técnicas, em especial de imagem, muitas das quais foram utilizadas para desenvolver esta dissertação.

Aos colaboradores Matteo Iannacone e Andrea Raimondi pelo processamento e aquisição das imagens de microscopia eletrônica, bem como pelas posteriores discussões, e a Florent Ginhoux e Svetoslav Chakarov pela colaboração no processamento e análise dos dados de sequenciamento de RNA.

À Unidade de Imageamento e Citometria do IGC, em especial à Marta Monteiro, Mariana Fernandes e Inês Almeida pelo auxílio na separação das células por FACS, e ao Gabriel Martins, Nuno Pimpão e Nuno Pereira, por todo o suporte e treinamento na área de microscopia.

À Secretaria do Departamento de Bioquímica por toda a prontidão e profissionalismo no suporte aos alunos, em especial à Cleia Bueno e ao Giordano Ferreira.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos para o desenvolvimento do mestrado.

À minha querida família pelo apoio incondicional em todos os níveis imagináveis.

RESUMO

A obesidade resulta de um desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético, e está associada a diversas comorbidades, como doenças cardiovasculares, hipertensão, e resistência à insulina e diabetes tipo 2. A leptina é um hormônio produzido pelos adipócitos no tecido que atua principalmente em núcleos hipotalâmicos para reduzir o consumo e estimular o gasto de energia. Um exemplo de mecanismo de resposta à sinalização da leptina é a ativação do sistema nervoso simpático com a consequente liberação de catecolaminas, como a norepinefrina. O estado de obesidade induz inflamação crônica no tecido adiposo, o qual compreende diversos outros tipos celulares além dos adipócitos. Assim, o controle da homeostase energética depende do mecanismo coordenado entre diversos sistemas no tecido adiposo, como o sistema nervoso e o inflamatório. Apesar da ação da leptina no cérebro ser bastante estudada, relatos recentes têm reportado a presença do seu receptor, LepR, em células de órgãos periféricos. Esta dissertação apresenta, por meio de microscopia confocal e imageamento óptico 3D, células que expressam o receptor de leptina no entorno das fibras nervosas que inervam o tecido adiposo subcutâneo, bem como em gânglios simpáticos. Considerando a localização destas células ao redor das fibras nervosas, hipotetizou-se que estas constituiriam a camada perineural dos nervos, o que foi comprovado por microscopia eletrônica de transmissão. As células LepR organizam-se em camadas e apresentam morfologia achatada e alongada, com inúmeras cavéolas, características típicas das células perineurais. Em consonância com estes resultados, o sequenciamento de RNA de células LepR separadas de gânglios simpáticos indicaram a expressão de marcadores de células do perineuro, bem como de algumas citocinas inflamatórias, como a Interleucina-33. É importante notar que, além do receptor da leptina, estas células também expressam o receptor adrenérgico β_2 , o qual possui implicação na obesidade. Estudos *ex vivo* buscaram investigar o papel funcional das células perineurais LepR no contexto da inflamação, em resposta a leptina e norepinefrina. Além disso, foi observado o padrão de resposta a estes estímulos por meio de imageamento dos níveis intracelulares de cálcio. Este trabalho, portanto, traz a descrição e caracterização de células perineurais que expressam o LepR no tecido adiposo e em outros tecidos relevantes associados ao sistema nervoso periférico, e explora a sua funcionalidade no contexto da inflamação, que está intimamente associada a problemas de obesidade.

Palavras-chave: receptor de leptina, receptor adrenérgico beta 2, obesidade, imageamento óptico 3D, interleucina-33

ABSTRACT

Obesity is a pathological condition that derives from the imbalance between energy intake and expenditure, and is associated to comorbidities such as cardiovascular diseases, hypertension, and insulin resistance and type 2 diabetes. Leptin is a hormone produced by adipocytes in the adipose tissue which has its primary targets in hypothalamic nuclei to reduce food intake and stimulate energy expenditure. One example of leptin's signaling response by the organism is the activation of the sympathetic nervous system, which leads to the release of catecholamines, such as norepinephrine. Low grade, chronic inflammation is induced in the adipose tissue of obese individuals, thus the control of energy homeostasis depends on the coordinated mechanism between different systems in the adipose tissue, in particular the nervous and inflammatory systems. Leptin's actions in the brain are well established, however recent studies have shown peripheral cells expressing the leptin receptor, LepR. This dissertation presents, by confocal microscopy and 3D optical imaging, the expression of LepR in cells which surround nerve fibers that innervate the subcutaneous white adipose tissue, as well as in sympathetic ganglia. Considering its location around the nerve fibers, it was hypothesized that these cells constituted the nerves' perineurial layer, which was confirmed by transmission electron microscopy. The LepR cells are organized in layers of flat and elongated cells that present many caveolae in their cytoplasm, which is in accordance with the morphological and anatomical description of these cells. In addition, RNA sequencing of LepR cells sorted from sympathetic ganglia indicated the expression of perineurial markers, as well as a few inflammatory cytokines, such as Interleukin-33. It is important to note that, besides the leptin receptor, these cells also expressed the adrenergic receptor β_2 , which has been associated to the context of obesity. *Ex vivo* studies sought to investigate the functional role of these perineurial LepR cells in the context of inflammation after exposure to leptin and norepinephrine. Additionally, calcium intracellular response to these stimuli was assessed by live imaging. Therefore, this work describes and characterizes LepR-expressing perineurial cells in the adipose tissue, as well as other tissues associated to the peripheral nervous system, and explores its functionality in the context of inflammation, which is closely linked to obesity.

Keywords: leptin receptor, adrenergic receptor beta 2, obesity, 3D optical imaging, interleukin-33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BABB	álcool benzílico 1:2 benzoato de benzila
BSA	albumina sérica bovina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	dimetilsulfóxido
FACS	separação de células ativadas for fluorescência
GCaMP	proteína com fusão de GFP no locus da calmodulina
GCSs	gânglios cervicais superiores
GFP	proteína fluorescente verde
Il-1 β	Interleucina 1 β
Il-33	Interleucina 33
LepR	receptor de leptina
NE	norepinefrina
OPT	tomografia por projeção óptica
PBS	tampão fosfato salino
PFA	paraformaldeído
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
SNS	sistema nervoso simpático
STAT	transdutor de sinal ativador de transcrição
TAsc	tecido adiposo subcutâneo
TAv	tecido adiposo visceral
TH	tirosina hidroxilase
TNF- α	fator de necrose tumoral α
YFP	proteína fluorescente amarela

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	O SISTEMA NERVOSO E O CONTROLE DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA.....	10
1.2	O TECIDO ADIPOSEO, LEPTINA E OBESIDADE	12
1.3	O SISTEMA IMUNITÁRIO E A SUA IMPLICAÇÃO NA OBESIDADE	15
	OBJETIVOS	17
2	MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1	ANIMAIS	18
2.2	IMUNOFLOURESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL	18
2.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	20
2.4	CLAREAMENTO E IMAGEAMENTO MESOSCÓPICO DO TECIDO ADIPOSEO DE CAMUNDONGOS LEPR-YFP	21
2.5	CULTURA DE EXPLANTES DE GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES ..	23
2.6	IMAGEAMENTO DA VARIAÇÃO DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE CÁLCIO EM CÉLULAS LEPR.....	24
2.7	SUSPENSÃO DE CÉLULAS-ÚNICAS E SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ATIVADAS POR FLUORESCÊNCIA	25
2.8	EXTRAÇÃO DE RNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DA TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL (qRT-PCR).....	26
2.9	SEQUENCIAMENTO DE RNA DE CÉLULAS LEPR-YFP SEPARADAS POR FACS.....	27
2.10	NÍVEIS DE IL-33 NO MEIO DE EXPLANTES DE GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES	28
2.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
3	RESULTADOS	29
3.1	VALIDAÇÃO DO MODELO ANIMAL MEDIANTE A CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FLUORESCENTE AMARELA (YFP) NO NÚCLEO ARQUEADO DE CAMUNDONGOS LEPR-YFP	29
3.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE CÉLULAS LEPR-YFP PRESENTES NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO E EM GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES DE CAMUNDONGOS.....	31
3.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CÉLULAS LEPR DOS GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES DE CAMUNDONGOS	37

3.4	TESTES FUNCIONAIS EM EXPLANTES DE GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES DE CAMUNDONGOS LEPR-YFP TRATADOS COM LEPTINA E ACETILCOLINA	41
3.5	AFERIÇÃO DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE CÁLCIO DAS CÉLULAS LEPR EM EXPLANTES DE GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES TRATADAS COM LEPTINA E ACETILCOLINA.....	43
4	DISCUSSÃO	47
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A obesidade pode ser definida como uma condição médica multifatorial na qual o acúmulo excessivo de gordura torna-se prejudicial à saúde do indivíduo (Organization, 2017). Trata-se de um fenômeno global cuja ocorrência vem aumentando em níveis alarmantes nas últimas décadas, evidenciando-se como um desafio para a saúde pública (Friedman, 2000; Organization, 2017). Neste contexto, a comunicação entre o tecido adiposo e o sistema nervoso tem sido alvo de intensos estudos há décadas devido ao seu papel chave no controle da homeostase energética, definida como o equilíbrio entre o consumo e o gasto energético, cuja perturbação está associada à obesidade (O'dea *et al.*, 1982; Bartness *et al.*, 2007; Richard, 2015; Seoane-Collazo *et al.*, 2015; Cornejo *et al.*, 2016; Caron *et al.*, 2018).

1.1 O SISTEMA NERVOSO E O CONTROLE DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA

O sistema nervoso é responsável pela detecção de sinais que representam mudanças no estado energético do organismo, seguida pela integração destes sinais, e efetivação de respostas a estes eventos para reestabelecer o equilíbrio (Guyton e Hall, 2005). O sistema nervoso dos vertebrados pode ser dividido em duas grandes partes: o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP) (Guyton e Hall, 2005; Lent, 2005). O primeiro é constituído pelo encéfalo (tronco encefálico, cerebelo, diencefalo e hemisférios cerebrais) e pela medula espinhal, sendo esta a porção que segue no interior da coluna vertebral, e aquele protegido pela caixa craniana (Kandel *et al.*, 2000; Lent, 2005). Os hemisférios cerebrais possuem compartimentos com funções e anatomia especializadas, porém que atuam em conjunto a fim de orquestrar o comportamento e a resposta a estímulos do organismo (Lent, 2005). Uma destas regiões é o hipotálamo, que possui papel fundamental no controle de condições internas do organismo, como temperatura corporal, estados de fome/saciedade e comportamento alimentar (Guyton e Hall, 2005; Parker e Bloom, 2012; Seoane-Collazo *et al.*, 2015).

O SNP, por sua vez, é responsável principalmente pela conexão e transmissão da informação entre o SNC e órgãos e membros periféricos, sendo composto por grupos de corpos celulares organizados em gânglios nervosos, bem como por nervos

periféricos (Kandel *et al.*, 2000). O SNP é constituído pelo sistema nervoso somático, que controla e integra informações sensoriais e motoras, essencialmente em um nível voluntário, e pelo sistema nervoso autônomo, que medeia sinais viscerais e tem papel fundamental, por exemplo, na homeostase energética (Kandel *et al.*, 2000; Richard, 2015; Guarino *et al.*, 2017). O sistema nervoso autônomo é composto pelos sistemas nervosos entérico, parassimpático e simpático (SNS) (Kandel *et al.*, 2000; Lent, 2005). O SNS exerce suas ações por meio da liberação do neurotransmissor norepinefrina (NE), uma catecolamina produzida nas células cromafins da medula adrenal, bem como nos neurônios simpáticos, em uma via biossintética que tem a tirosina hidroxilase (TH) como enzima limitante, a qual pode ser utilizada como marcadora destes neurônios (Eisenhofer *et al.*, 2004). A organização anatômica do SNS consiste em duas cadeias paravertebrais de gânglios nervosos, nos quais se encontram corpos celulares de neurônios que recebem a aferência de neurônios principalmente colinérgicos provenientes da medula espinhal e do tronco encefálico (pré-gangliônicos), e projetam os seus axônios (pós-gangliônicos) em fibras nervosas para inervar os tecidos-alvo, nos quais liberam a NE (Kandel *et al.*, 2000; Lent, 2005). Uma das respostas mais conhecidas do sistema nervoso simpático é o reflexo de luta ou fuga, caracterizado, por exemplo, pelo aumento da frequência cardíaca, vasoconstrição, e ativação de vias catabólicas, como glicogenólise e lipólise (Kandel *et al.*, 2000; Thorp e Schlaich, 2015).

Em relação aos nervos periféricos, membros do SNP, a sua organização e anatomia é conhecida há quase 200 anos e pode ser generalizada para todos os nervos do SNP: projeções axonais são individualmente envolvidas por células de Schwann mielinizantes ou não mielinizantes, formando complexos envolvidos por três camadas de revestimento com morfologia e função especializadas: o epineuro, o endoneuro e o perineuro (Gamble e Eames, 1964; Peltonen *et al.*, 2013; Kucenas, 2015). O epineuro representa a camada mais externa, que envolve todo o nervo, e é composto principalmente por adipócitos e matriz extracelular rica em colágeno tipo I e fibroblastos, possuindo função de sustentação, porém não de formação de barreira (Peltonen *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018). O endoneuro, a camada mais interna e próxima aos complexos formados entre axônios e células de Schwann, é identificado pela presença de fibras de colágeno tipo III, alguns fibroblastos e células do sistema imune, bem como capilares sanguíneos revestidos por tecido endotelial com a formação de

junções de oclusão (Peltonen *et al.*, 2013; Reinhold e Rittner, 2017). O perineuro, por sua vez, ocupa a camada intermediária entre o endoneuro e o epineuro, e é caracterizado por camadas de células achatadas e alongadas, com lâmina basal dupla, e intimamente conectadas por complexos de junções celulares, como junções de oclusão (Gamble e Eames, 1964; Reinhold e Rittner, 2017). A função principal do endoneuro e do perineuro está associada à formação da barreira hemato-nervosa, que permite a troca de nutrientes com o sangue para suprimento dos nervos e outros tecidos, porém oferecendo proteção ao minimizar a entrada de toxinas e células do sistema imune que poderiam perturbar este microambiente (Reinhold e Rittner, 2017). Além disso, o citoplasma de células perineurais apresenta um elevado número de invaginações da membrana que formam vesículas chamadas cavéolas, geralmente associadas ao processo de transporte transcitose, que envolve a passagem de moléculas através da célula, sendo típico de células de barreiras (Armulik *et al.*, 2010; Kucenas, 2015). Assim, observa-se que a formação de um SNP funcional e eficiente requer a coordenação e comunicação afinada entre diversos tipos celulares.

1.2 O TECIDO ADIPOSEO, LEPTINA E OBESIDADE

Como mencionado, o desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético, em favor daquele, é uma das causas do aumento de peso (a palavra “obesidade” possui origem no termo latino *obedere*, “comer em excesso”); no entanto, fatores genéticos, como mutações em genes controladores do apetite, não podem ser desconsiderados (Zhang *et al.*, 1994; Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2017). Dentre estes genes, observam-se aqueles que codificam para a leptina, cuja clonagem em 1994 é considerado um ponto chave na investigação da obesidade, e os seus receptores (Munzberg e Morrison, 2015). A leptina é a principal adipocina produzida pelos adipócitos no tecido adiposo branco, que tem como efeito mais estudado a comunicação ao cérebro dos níveis de gordura presentes na periferia, atuando como indicadora do status energético do organismo (Friedman e Halaas, 1998; Caron *et al.*, 2018).

O tecido adiposo é constituído por uma plethora de tipos celulares, além dos adipócitos, como fibroblastos, células endoteliais e do sistema imuntário, bem como fibras nervosas do sistema autônomo (Rosen e Spiegelman, 2014; Caron *et al.*, 2018). Inicialmente visto como somente um reservatório energético por meio do acúmulo de

lipídios no citoplasma dos adipócitos, o melhor entendimento sobre este tecido complexo tem elucidados pontos fundamentais na compreensão dos distúrbios da obesidade. Por exemplo, devido à produção de leptina e outras adipocinas com importantes funções endócrinas por estas células e outros componentes celulares, o tecido adiposo atualmente é considerado um órgão endócrino com relevante no controle do metabolismo (Kershaw e Flier, 2004; Rosen e Spiegelman, 2014).

A leptina chega ao cérebro nas regiões próximas aos órgãos circumventriculares, os quais possuem fenestração na barreira hematoencefálica que permite que sinais periféricos cheguem aos seus alvos neuronais (Golden *et al.*, 1997; Fry e Ferguson, 2007; Hoyda *et al.*, 2009; Cornejo *et al.*, 2016). A entrada desta adipocina no cérebro, demasiadamente grande para cruzar a barreira hematoencefálica passivamente, é mediada por transportadores nestas regiões, destacando-se a área prostrema, no tronco cerebral, e a eminência média, a qual possui contato com o núcleo arqueado do hipotálamo (Woods e Stock, 1996; Scott *et al.*, 2009; Atasoy *et al.*, 2012). É consenso que o transporte de leptina para o cérebro é realizado por meio da circulação sanguínea, contudo o exato mecanismo e a rota realizada, se ocorre de forma direta ou indireta a partir dos adipócitos, ainda não foi exatamente descrito (Golden *et al.*, 1997; Barateiro *et al.*, 2017).

O principal efeito da leptina ao chegar ao cérebro é associado à inibição de neurônios que promovem o apetite, em especial nos núcleos hipotalâmicos dorso-medial, lateral, paraventricular, e arqueado, de forma que a informação sobre os níveis de gordura leva à ativação de um mecanismo de manutenção homeostática em indivíduos fisiologicamente normais (Friedman e Halaas, 1998; Gropp *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2018). Contudo, em um contexto patológico de obesidade, apesar dos altos índices de leptina no sangue, esta adipocina não é capaz de realizar as suas funções de regulação de controle metabólico, consistindo em uma situação de resistência à leptina (Myers *et al.*, 2010). Apesar de não haver consenso sobre as origens e causas da resistência à leptina, um mecanismo proposto é o de falha na transdução do sinal por meio dos seus receptores (Barateiro *et al.*, 2017).

Seis subtipos de receptores de leptina (LepR) foram descritos (LepRa, LepRb, LepRc, LepRd, LepRe, and LepRf), os quais resultam de *splicing* alternativo quando da expressão do gene LepR, e possuem estrutura e função distintas (Lee *et al.*, 1996; Wada *et al.*, 2014). Todas as isoformas, à exceção de LepRe, compartilham um

domínio extracelular comum, bem como domínios transmembrana; no entanto, somente LepRb é conhecido por exercer funções de transdução de sinal mediante a ativação de vias como a JAK (Janus quinase)-STAT (transdutor de sinal ativador de transcrição) e IRS (substrato de receptor de insulina)/PI3K (fosfoinositideo 3 quinase) (Wada *et al.*, 2014; Cornejo *et al.*, 2016). Mutações no gene LepR que geram receptores disfuncionais têm profundos impactos no controle metabólico devido à insensibilidade do organismo aos sinais da leptina, que tornam os indivíduos extremamente obesos, como os modelos de camundongos db/db e ratos Zucker (Chen *et al.*, 1996; Chua *et al.*, 1996). Em relação ao transporte de leptina ao SNC, apesar da identidade molecular dos seus transportadores ainda ser desconhecida, a entrada da leptina no encéfalo independe da presença de seus receptores, verificada em um estudo que injetou leptina com marcadores radioativos e detectou a presença de radioatividade no cérebro de camundongos (db/db) (Maness *et al.*, 2000). Recentemente, diversos estudos têm relatado a presença do receptor de leptina em nível periférico, por exemplo em células do sistema imune, na mucosa intestinal, no fígado, e em células mesenquimais (Saxena *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2018). No entanto, a relação destas células com o controle metabólico não é bem definida.

Nota-se que, além do efeito de supressão do apetite, o controle metabólico exercido pela leptina é realizado mediante a ativação do SNS em nível periférico, sendo que esta relação entre o hipotálamo e o SNS para manutenção da homeostasia é bem elucidada (Lent, 2005). A lipólise consiste na hidrólise de moléculas de triacilgliceróis a ácidos graxos livres, que podem sofrer β -oxidação para uso como combustível das células, logo fornecendo substrato energético no contexto de ativação simpática (Lieberman e Peet, 2017). A ativação do SNS gera uma resposta de iniciação da lipólise, sendo que a estimulação deste sistema leva à liberação de ácidos graxos, ao passo que a inibição de neurônios simpáticos periféricos induz mobilização de lipídios (Guarino *et al.*, 2017). Recentemente, foi reportado que a ativação deste sistema pela leptina promove o gasto energético por meio do estímulo à termogênese no tecido adiposo marrom, bem como a *browning* e lipólise do tecido adiposo branco via aumento da liberação de NE e consequente atuação em receptores adrenérgicos dos adipócitos (Bartness *et al.*, 2014; Seoane-Collazo *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2015; Caron *et al.*, 2018).

Neste contexto, a comunicação entre o tecido adiposo e os sistemas nervoso e imunitário tem sido objeto de estudos recentes, sendo que a obesidade é caracterizada por um estado inflamatório crônico (Bartness *et al.*, 2007; Reilly e Saltiel, 2017; Caron *et al.*, 2018).

1.3 O SISTEMA IMUNITÁRIO E A SUA IMPLICAÇÃO NA OBESIDADE

De uma forma genérica, o sistema imunitário pode apresentar dois tipos de resposta com efeitos antagônicos: resposta imune tipo 1, a qual é caracterizada por intensa atividade fagocítica e liberação de citocinas que desencadeiam uma cascata de sinalização pró-inflamatória, e a resposta imune tipo 2, com um perfil anti-inflamatório de regeneração tecidual (Spellberg e Edwards, 2001; Gieseck *et al.*, 2018). No tecido adiposo de indivíduos não obesos, observa-se um ambiente de resposta imune tipo 2, com a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 33 (Il-33), a qual induz uma cascata de ativação de células, como as linfóides inatas e os eosinófilos, que produzem outras citocinas anti-inflamatórias, polarizam os macrófagos residentes para um perfil de ativação “alternativa”, também culminando na produção de proteínas anti-inflamatórias (Lumeng *et al.*, 2007; Davies *et al.*, 2013; Vasanthakumar *et al.*, 2015; Reilly e Saltiel, 2017). A presença de macrófagos residentes no tecido adiposo é conhecida e estudada há décadas, porém recentemente foi descoberta uma população de macrófagos associados às fibras nervosas que inervam este tecido, e atuam na captação e degradação da NE liberada pelos neurônios simpáticos (Davies *et al.*, 2013; Pirzgalska *et al.*, 2017). Estes macrófagos possuem um perfil pró-inflamatório constitutivo e podem ter a função de proteger o tecido contra potenciais efeitos nocivos do excesso de NE (Pirzgalska *et al.*, 2017). Desta forma, a manutenção da homeostase do tecido adiposo é coordenada entre diversos tipos celulares que têm por fim regular o armazenamento e a mobilização de energia de acordo com a necessidade do organismo (Braune *et al.*, 2017; Reilly e Saltiel, 2017).

Por outro lado, no contexto patológico de obesidade, os mecanismos de controle homeostáticos são colocados à prova a fim de reagir contra o balanço energético positivo. Por exemplo, leptina, catecolaminas, e insulina são secretadas no tecido adiposo em elevados níveis, causando uma um estresse exacerbado nos

adipócitos, que se expandem e proliferam, bem como respondem iniciando uma programação pró-inflamatória (Lumeng *et al.*, 2007; Reilly e Saltiel, 2017). Neste sentido, observa-se uma inversão na resposta imune para o tipo 1 no tecido adiposo, principalmente caracterizada pela polarização de macrófagos com ativação “clássica”, que produzem citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), e Il-1 β , contexto intimamente associado com o desenvolvimento de resistência a insulina e doenças metabólicas (Lazar, 2005; Lee *et al.*, 2018).

Além da resistência à leptina, já mencionada, e à insulina, que está associada a diabetes tipo 2, o contexto de obesidade também é acompanhado de disfunção na resposta a catecolaminas, como a NE. Diversos estudos apontam para um aumento no nível de ativação simpática em indivíduos obesos (Richard, 2015; Thorp e Schlaich, 2015; Guarino *et al.*, 2017). Considerando o papel de indução lipolítica das catecolaminas no tecido adiposo, esta resposta pode ser considerada em termos de manutenção homeostática, contudo em situações de distúrbios metabólicos, como resistência a leptina e insulina, há uma sobreativação crônica do SNS, gerando uma redução na sensibilidade dos receptores beta adrenérgicos nos adipócitos (Thorp e Schlaich, 2015; Guarino *et al.*, 2017). Desta forma, a regulação negativa da expressão destes receptores em um contexto de atividade prolongada do SNS causa uma consequente redução dos seus efeitos catabólicos, como a termogênese, que leva ao aumento de peso, alimentando um ciclo que perpetua o estado de obesidade (Guarino *et al.*, 2017).

Neste contexto de controle do metabolismo no tecido adiposo, que possui a integração de diversos elementos, como o SNS, o sistema imunitário e adipócitos, os quais produzem leptina, esforços têm se voltado para estudar a comunicação entre estes componentes no tecido adiposo (Guarino *et al.*, 2017; Reilly e Saltiel, 2017; Caron *et al.*, 2018). Neste sentido, esta dissertação apresenta a caracterização morfológica e de expressão gênica de células perineurais que expressam o LepR nas fibras nervosas que inervam o tecido adiposo, bem como nos gânglios simpáticos cervicais superiores (GCSs). Além disso, o papel funcional destas células no contexto de integração entre o tecido adiposo, SNS e inflamação é investigado.

OBJETIVOS

O objetivo geral desta dissertação é descrever, caracterizar e investigar a funcionalidade de células que expressam o receptor de leptina (LepR) em tecidos periféricos associados ao sistema nervoso simpático (SNS) de camundongos. Para atingir este objetivo geral, uma série de objetivos específicos foi delineada:

- 1) estabelecer um modelo animal que permita o imageamento das células LepR com repórteres fluorescentes;
- 2) verificar a expressão de LepR em tecidos associados ao SNS por meio de microscopia de fluorescência;
- 3) descrever a ultraestrutura destas células por microscopia eletrônica;
- 4) caracterizar o tipo celular das células LepR por meio do seu perfil de expressão gênica, analisado por sequenciamento de RNA;
- 5) avaliar a resposta dessas células a estímulos do SNS, bem como a leptina, em especial a sua implicação no contexto inflamatório em modelos *ex vivo*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Os camundongos das linhas LepRb-cre (núm. 008320), LSL-GCaMP3 (núm. 014538) e LSL-ChR2-YFP (núm. 012569) foram adquiridos do Jackson Laboratory (JAX; EUA); já os camundongos B6 (C57BL/B6J) foram adquiridos de Charles River Laboratories (EUA).

Todos os animais foram cruzados e mantidos no biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, em Oeiras, Portugal, em alojamento específico para a espécie, em racks ventiladas (Tecniplast, Itália) com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (40-60%) controladas, e ciclo de claro:escuro de 12:12 horas. O fornecimento de ração (padrão para a espécie) e água autoclavada foi realizado *ad libitum*. A frequência de troca das caixas seguiu a rotina do biotério.

Todos os procedimentos realizados nos camundongos seguiram as normas de bem-estar animal indicadas pela *Federation for Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Gulbenkian de Ciência.

Diantes dos resultados apresentados nas Figuras 1 e 2, que indicam a especificidade da recombinação do sistema cre-lox para os animais LepRb;LSL-Chr2-YFP, os quais expressam o a proteína fluorescente amarela (YFP) nas células LepR, camundongos LepRb;LSL-Chr2-YFP, bem como seus tecidos e células, serão chamados de LepR-YFP nesta dissertação.

2.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL

Para a análise de imunofluorescência de gânglios cervicais superiores (GCS) e fibras nervosas do tecido adiposo, os tecidos foram dissecados e fixados em uma solução de 4% paraformaldeído (PFA; Sigma-Aldrich, EUA) por 2h a temperatura ambiente, com agitação. Para a imagem da Figura 6B, os gânglios foram incubados em uma solução de 30% sacarose (Alfa Aesar, Haverhill, EUA) para crioproteção e subsequente congelamento e corte em seções de 16 μm utilizando um criostato Leica CM3050 S. Tanto as crio-seções quanto os tecidos *whole mount* foram incubados em

uma solução de permeabilização e bloqueio contendo 3% albumina sérica bovina (BSA), 2% soro de cabra, 0,1% Tween e 0,01% NaN_3 , em tampão fosfato salino (PBS) 1x, por 1h a temperatura ambiente. Na sequência, os tecidos foram incubados com anticorpos primários a 4°C *overnight*. Diante da ausência de validação de anticorpos comerciais anti-LepR em animais db/db, os quais não possuem o receptor de leptina, a imunofluorescência de LepR foi verificada mediante o uso dos anticorpos primários anti-GFP nos animais LepR-YFP (Abcam, ab6556 e ab13970, 1:500) (Scott *et al.*, 2009). Nota-se que esta etapa é utilizada para a magnificação do sinal YFP, obtendo-se melhores níveis de contraste de imagem, e que não se verificou diferença entre a detecção com anti-GFP (proteína fluorescente verde) e o sinal observado somente com o imageamento do YFP endógeno das células LepR-YFP. Os demais anticorpos utilizados foram anti-TH (Millipore, AB152, 1:500), anti-Il-33 (R&D, AF 3626, 1:50) e anti-occludina (Life Technologies, 71-500, 1:100). Após a incubação com os anticorpos primários, as amostras foram lavadas em PBS de 3 a 5 vezes por 10 minutos, com subsequente incubação com os anticorpos secundários por 1-2h a temperatura ambiente. Após esta incubação, as amostras foram novamente lavadas e montadas em lâminas para microscopia, cobertas com Fluoromount-G com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Thermo Fischer, EUA), sobre as quais uma lamínula foi aplicada. Tanto o passo de bloqueio/permeabilização, quanto as incubações e lavados foram realizados com agitação para os tecidos *whole mount*, e sem agitação para as crio-seções. Tecidos de animais que não expressam GFP (camundongos B6) foram utilizados como controle negativo para os experimentos utilizando anti-GFP, e os demais controles negativos foram realizados mediante o mesmo protocolo de incubações, contudo com solução de permeabilização/bloqueio no local anticorpo primário.

Para o experimento das Figura 1 e 2, animais LepR-YFP em jejum *overnight* foram injetados com leptina (2 mg/kg) ou PBS (volume equivalente). Após 45 minutos, os camundongos foram eutanasiados por CO_2 , e imediatamente perfundidos transcardialmente com PBS por 5 minutos, seguido por 4% PFA por 10 minutos. Após, os encéfalos foram dissecados, pós-fixados em 4% PFA por 48h, e cortados em seções de 20 μm na região do núcleo arqueado do hipotálamo utilizando um vibrátomo Leica VT 1000 S. A imunomarcação seguiu o protocolo descrito por Knight *et al.* (2010): as fatias foram pré-tratadas com uma solução de 1% H_2O_2 + 1% NaOH em

água por 10 minutos, seguido de 0.3% glicina (Sigma-Aldrich) em PBS por 10 min, e 0.03% SDS em PBS por 10 min, antes de serem permeabilizadas/bloqueadas e incubadas com o anticorpo anti-pSTAT3 (Cell Signalling, 9181, 1:1000) por 24h a 4°C.

Projeções ópticas em séries ao longo do eixo z foram adquiridas em um microscópio confocal Leica SP5, utilizando uma objetiva de 20x ou 40x, feixes de laser de 405, 488, 561 e 633 e detectores HyD em modo padrão ajustado para a detecção dos fluorocromos conjugados aos anticorpos secundários (AlexaFluor 488, 594 e 647) e a DAPI. A análise das imagens foi realizada utilizando o software FIJI. Ao menos três experimentos independentes foram realizados em cada figura de microscopia confocal.

2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para a análise da ultraestrutura das células LepR-YFP que envolvem as fibras nervosas que inervam o tecido adiposo subcutâneo (TAsc) de camundongos LepR-YFP, estas foram cuidadosamente dissecadas e fixadas em uma solução de 4% PFA em 0.1M tampão fosfato (pH 7,4). Após uma série de lavagens em PBS, as amostras foram incubadas com glicina (50 mM) e permeabilizadas com uma solução de 0,25% saponina e 0,1% BSA em PBS. Na sequência as fibras foram incubadas com uma solução de bloqueio (0,2% BSA, 5% soro de cabra, 50 mM NH₄Cl, 0,1% saponina, 20 mM tampão fosfato e 150 mM NaCl) por 20 min, e incubada com anticorpo anti-GFP (Invitrogen, A-11122, 1:500) por 2h a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado com partículas de ouro de 1.4nm (Nanogold; Nanoprobes, EUA). Estas nanopartículas sofreram dilatação com uma solução de ampliação de partículas de ouro (GE BEEM; Nanoprobes), de acordo com as instruções do fabricante. Após, as amostras foram envolvidas com resina (Electron Microscopy Science, EUA) e curadas por 48h a 60°C. Os blocos de resina foram cortados utilizando um ultramicrotomo Leica EM UC7, e fatias ultrafinas (70-90 nm) foram coletadas e visualizadas em um microscópio eletrônico de transmissão FEI Talos 120 kV, e as imagens adquiridas com uma câmera com sensor Ceta 16M CMOS (FEI, Holanda).

Comparado ao PFA isoladamente, a fixação com glutaraldeído permite uma interação mais potente entre as proteínas do tecido, de forma que a morfologia das

amostras pode ser melhor preservada utilizando este agente de fixação; no entanto, o glutaraldeído afeta a antigenicidade do tecido, de forma que a amostra se torna incompatível com a marcação de anticorpos (Griffiths, 1993). Após a validação de que as partículas de ouro foram observadas exclusivamente nas camadas periféricas das fibras, novas amostras de fibras foram dissecadas, a fim de se obterem amostras com morfologia melhor preservadas. Neste experimento, as fibras nervosas foram fixadas com 2% PFA, 2,5% glutaraldeído em 0,1 M tampão de cacodilato de sódio (Sigma-Aldrich), e pós-fixadas com 2% tetróxido de ósmio (Electron Microscopy Science) em 0,1 M tampão de cacodilato de sódio. Após, as amostras foram incubadas com 1% acetato de uranila (Electron Microscopy Science) em água por 40 minutos, e gradualmente desidratada em etanol 20, 40, 60, 80 e 100%, antes de ser lavada em óxido de propileno (Sigma-Aldrich) por duas vezes e incubada *overnight* em uma solução 1:1 de óxido de propileno e Epon 812 (Electron Microscopy Science). Na sequência, foram realizados os mesmos processos de formação de bloco de resina, corte e visualização/aquisição descritos anteriormente.

2.4 CLAREAMENTO E IMAGEAMENTO MESOSCÓPICO DO TECIDO ADIPOSEO DE CAMUNDONGOS LEPR-YFP

A fim de verificar a localização anatômica das células LepR-YFP no tecido adiposo com um todo, o TAsc de camundongos LepR-YFP foi dissecado e processado em um protocolo de clareamento adaptado dos procedimentos descritos por Pan et al. (2016) e Renier et al. (2014). Ao passo em que tentativas de executar o protocolo descrito por aqueles autores resultaram incompatíveis com a manutenção do sinal YFP, bem como com os anticorpos utilizados, o protocolo utilizado por Renier et al. (2014) mostrou-se desafiante em relação à necessidade de se usar reagentes frescos devido à rápida oxidação de diclorometano e éter dibenzílico. Logo, baseado nestes dois procedimentos, foi desenvolvido um protocolo de clareamento do tecido adiposo compatível com anticorpos anti-GFP (Abcam, ab6556 e ab13970, 1:500). Os testes com anti-TH apresentaram problemas de penetração do anticorpo, no entanto.

Os camundongos LepR-YFP foram eutanasiados por CO₂, e imediatamente perfundidos transcárdialmente com PBS por 5 minutos, seguido por 4% PFA por 10 minutos. Após, os TAsc foram dissecados, limpos de qualquer resíduo como poeira

ou pelo sob uma lupa, e pós-fixados em 4% PFA *overnight*, em agitação. As amostras foram incubadas com uma solução de permeabilização/bloqueio (10% dimetilsulfóxido (DMSO), 6% soro de cabra, 0,2% TritonX-100, 0,02% NaN₃, em PBS) por 24h a 37°C, e logo com o anticorpo primário diluído em solução A (5% DMSO, 3% soro de cabra, 0,2% Tween-20, 10 µg/ml heparina, em PBS) por 3 dias a 37°C. Ao fim deste período, os tecidos foram lavados em uma solução PT+H (0,2 % Tween-20, 10 µg/ml heparina, em PBS) 5 vezes, sendo o último passo *overnight*. Na sequência, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário diluído em solução A por 3 dias a 37°C, e novamente lavadas conforme descrito para o passo anterior. Após esta série de incubações, as amostras foram montadas em um molde com solução de 1% agarose (Invitrogen) em água. Após a polimerização da agarose, o bloco foi desidratado em passos de 20%, 40%, 60%, 80%, 100% metanol (Sigma-Aldrich) (1h cada passo a temperatura ambiente), e uma etapa adicional a 100% metanol *overnight* para garantir a desidratação da amostra. A seguir, o bloco foi incubado com uma solução 1:1 de metanol e BABB (álcool benzílico 1:2 benzoato de benzila; Millipore e Sigma-Aldrich, respectivamente) por 4h a temperatura ambiente, antes de ser finalmente incubado com o agente clarificante, BABB, até o clareamento da amostra, cerca de 3 dias.

Para a aquisição da imagem da Figura 5A, foi utilizado um sistema de tomografia por projeção óptica (OPT, em inglês), detalhado por Zeng *et al.* (2015). Um total de 1600 imagens do tecido inteiro clarificado no bloco de agarose (uma imagem a cada 0,225° de rotação do bloco) foram adquiridas utilizando uma lente 1x montada em um tubo InfiniTube (Infinity, EUA) e projetadas em uma câmera Hamamatsu FlashLT sCMOS. Após a aquisição, a série de imagens foi pré-processada utilizando FIJI para realinhar os eixos de rotação em relação à câmera e remover pixels anormais, e a reconstrução tomográfica foi realizada utilizando o software Skyscan NRecon. O FIJI também foi utilizado para pós-processamento e para obter reconstruções 3D por projeção de intensidades máximas do tomograma. Considerando a elevada autofluorescência dos vasos sanguíneos quando excitados por luz azul, e pela perda da fluorescência do YFP endógeno após o tratamento com metanol, o canal adquirido com filtros de comprimento de onda de emissão de 528/48 nm foi utilizado como plano de fundo para o sinal adquirido com a marcação com anticorpo. Dentro desta estratégia, foram utilizados anticorpos secundários

conjugados com AlexaFluor-594, e o sinal das células LepR-YFP foi detectado no canal adquirido com filtros de 609/37 nm.

Após a aquisição de imagens da gordura inteira, buscou-se imagear em maior resolução áreas do TAsc nas quais se verificou a presença de células LepR-YFP, como na Figura 5B. Para tal, as mesmas amostras submetidas ao OPT tiveram imagens adquiridas em um sistema baseado em microscopia *light-sheet*, no qual uma série de imagens é adquirida através do tecido transparente, cada qual com um único plano focal iluminado (Gualda *et al.*, 2013). O bloco de iluminação do microscópio consiste na combinação de linhas de lasers de comprimentos de onda de 473 nm e 561 nm para adquirir, respectivamente a autofluorescência do tecido e o sinal de LepR-YFP por meio de anticorpos secundários conjugados com AlexaFluor-594. O escaneamento do laser é realizado no eixo vertical com o auxílio de espelhos galvanométricos (Cambridge Technology, EUA) e a iluminação bilateral é feita com duas objetivas de 4x. Para detecção, uma objetiva de 4x foi posicionada perpendicularmente ao plano de excitação para coletar a fluorescência emitida, sendo as imagens projetadas em uma câmera Hamamatsu Flash4.0 sCMOS.

2.5 CULTURA DE EXPLANTES DE GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES

Ambos os GCSs de camundongos com idade entre 4 e 8 semanas foram extraídos em câmara de fluxo laminar sob um estereomicroscópio Zeiss Stemi 2000, e imediatamente colocados em DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para a remoção dos tecidos conjuntivo e adiposo que envolvem a cápsula dos gânglios. Após esta etapa de limpeza, os gânglios foram transferidos para uma câmara de cultivo de tecidos de oito (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) ou 24 poços (Corning, Nova Iorque, NY, EUA) que haviam sido previamente revestidas com poli-D-lisina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Na sequência, 5 µl de Matrigel (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) foram aplicados sobre os gânglios para servir-lhes de substrato. Os gânglios foram, então, incubados por 7 min a 37 °C (5% CO₂), e a seguir foram adicionados, por poço, 250 (placas de 8 poços) ou 400 µL (placas de 24 poços) de DMEM sem vermelho de fenol (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 2 mM L-glutamina (Biowest, Nuaille, França), e fator de

crescimento nervoso (Sigma-Aldrich). Os gânglios foram cultivados por, no mínimo, 24h antes de terem o seu meio trocado e serem manipulados.

Para os experimentos das figuras 17 e 18, os explantes de GCSs de camundongos B6 foram tratados com a) veículo (meio de cultivo e água), b) acetilcolina (Sigma-Aldrich, 10 nM), c) leptina (R&D Systems, EUA; 50 ng/ml) ou d) acetilcolina + leptina por 15 ou 30 minutos. Leptina foi diluída em meio de cultivo, e acetilcolina em água, sendo que a condição “veículo” teve água e meio de cultivo adicionados proporcionalmente ao volume aplicado nas condições experimentais. 24h após o tratamento, os sobrenadantes e os explantes foram coletados, congelados em gelo seco e armazenados a -80°C até serem processados.

Para a extração de ácido ribonucleico (RNA), ambos os gânglios do mesmo camundongo foram utilizados como uma amostra; para os experimentos que utilizam o meio de cultivo, o meio de cada gânglio foi analisado separadamente.

2.6 IMAGEAMENTO DA VARIAÇÃO DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE CÁLCIO EM CÉLULAS LEPR

Os indicadores de cálcio geneticamente modificados, como a família GCaMP (que tem como um dos membros o GCaMP3), permitem, com alta sensibilidade, o imageamento dos níveis intracelulares de cálcio, favorecendo estudos funcionais da dinâmica deste cátion nas células em resposta a determinados estímulos (Cai *et al.*, 2014; Partridge, 2015). Em células neuronais, e em astrócitos, foi demonstrado que as variações nos níveis de GCaMP são correlatas às flutuações de atividade destas células, podendo ser utilizada como um indicador de atividade celular (Gonzalez *et al.*, 2016; Srinivasan *et al.*, 2016). Neste estudo, animais LepR-cre foram cruzados com camundongos LSL-GCaMP3 para permitir a expressão deste indicador especificamente nas células LepR. Os ensaios foram realizados em explantes de GCSs extraídos de animais LepR-GCaMP3 e cultivados conforme o item 2.5. Após 24h em cultivo, os explantes foram transferidos a uma câmara com temperatura e níveis de CO₂ controlados (37°C e 5%, respectivamente), que envolve o microscópio confocal *spinning disk* Yokogawa CSU-X utilizado para a aquisição das imagens. Os experimentos iniciaram-se 30 minutos após a aclimação dos explantes a esta câmara, quando o meio de cultivo foi trocado. Utilizando uma objetiva de 20x, um

campo de visão com células LepR-GCaMP3 foi escolhido por explante de GCS; o ajuste do foco foi realizado em um plano do eixo z, e o modo de autofoco do microscópio foi ativado para corrigir para movimentos da célula. Uma série de imagens em lapso de tempo com intervalo de 500 ms foi adquirida de forma ininterrupta do início ao fim do experimento, com a incidência de um laser de 488 nm para excitação e filtro de transmissão de 525/50 nm em uma câmera Andor iXon+ EMCCD. Os níveis de fluorescência basal foram adquiridos por 15 ou 30 minutos; após este período, os explantes tiveram veículo administrado. Após 15 minutos, foram aplicados a) acetilcolina (10 nM), b) leptina (50 ng/ml) ou c) acetilcolina + leptina, que seguiram sendo imageadas por 15 ou 30 minutos.

Na sequência, células individuais tiveram os seus níveis de fluorescência medidos utilizando-se FIJI, os quais foram corrigidos pela fluorescência do *background* para cada intervalo de tempo. Utilizou-se a razão entre a fluorescência após 5 min de administração da droga e a mediana da fluorescência basal dos 3 min anteriores à aplicação para representação das mudanças de fluorescência. Os dados da Figura 21B, representativos da variação da fluorescência ao longo da aquisição, foram calculados mediante a fórmula $\Delta F/F_0 = (F_{\text{tempo X}} - F_{\text{inicial}}) / F_{\text{inicial}}$.

2.7 SUSPENSÃO DE CÉLULAS-ÚNICAS E SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ATIVADAS POR FLUORESCÊNCIA

Para a separação específica de células que expressam o repórter YFP nos animais LepR-YFP, a técnica de separação de células ativadas por fluorescência (FACS, em inglês) foi utilizada em um separador de células de alta velocidade FACSAria IIu (Becton Dickinson, EUA). Para tal, uma suspensão de células únicas foi obtida a partir do processamento enzimático e mecânico dos tecidos de interesse, como anteriormente publicado (Pirzgalska *et al.*, 2017): a) fibras nervosas foram cuidadosamente dissecadas do TAsc inguinal destes camundongos, e digeridas por hialuronidase (150 µg/mL; Sigma-Aldrich) por 30 min em agitação a 37°C, lavadas em tampão para FACS (2% SFB e 0.02% NaN₃, em PBS), e subsequentemente incubadas com colagenase (1 mg/mL Sigma-Aldrich) por 15 min sob as mesmas condições; b) GCSs e glândulas pituitárias foram dissecados e incubados com colagenase (2.5 mg/ml) por 10 min a 37°C, lavados, e digeridos com 0.25% tripsina

(Biowest) por 30 min a 37°C; e c) o tecido adiposo visceral (TAV) gonadal, cujas fibras são de difícil remoção, foram processados com colagenase (1 mg/mL) por 30 min. Após, todas as suspensões passaram por digestão mecânica utilizando uma seringa de calibre 26 G e foram filtradas em uma malha de nylon de 70 µm. O marcador de células mortas Sytox Blue (Molecular Probes, EUA) foi incubado com as suspensões 10 min antes de se iniciar o procedimento de separação das células, para que somente células viáveis fossem separadas.

Para a separação das células por FACS, as soluções foram processadas no FACSAria IIu, mediante a utilização de lasers com comprimento de onda de 407 nm e 488 nm para excitar a fluorescência de Sytox Blue e YFP, respectivamente; filtros ópticos para detecção a 450/40 nm e 530/30 nm foram configurados. O *nozzle* de tamanho de 100 µm foi utilizado. Tecidos de animais que não expressam YFP foram utilizados como controle de compensação da fluorescência. Após a triagem de células viáveis (Sytox Blue negativas), células positivas e negativas para YFP foram selecionadas e coletadas em tubos distintos com reagente TRIzol (Invitrogen) para a extração de RNA e subsequente reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR). Para o sequenciamento de RNA das células YFP, 500 células foram coletadas por tubo em um tampão com desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP; 3.4 uM) (Promega, EUA) e albumina bovina ultrapura (BSA; 33 mg/µl) (Life Technologies), imediatamente congeladas em gelo seco, armazenadas a -80°C, e enviadas para extração de RNA e sequenciamento na Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), em Singapura.

2.8 EXTRAÇÃO DE RNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DA TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

Os tecidos, logo após dissecação ou término do tratamento, e as células, na sequência da sua coleta, foram imediatamente congelados em gelo seco, e armazenados a -80 °C até o momento de extração de RNA. Para a extração de RNA, foi utilizado o reagente TRIzol, e foram seguidas as instruções do fabricante. Ao final do protocolo, o RNA total foi imediatamente utilizado para a qRT-PCR. O DNA complementar (cDNA) foi transcrito reversamente utilizando a enzima SuperScript II (Invitrogen) e *random primers* (Invitrogen). O qPCR foi realizado utilizando o corante

fluorescente SYBR Green (Applied Biosystems) em um equipamento ABI QuantStudio 7 (Applied Biosystems). Um volume total de 10 µL por amostra foi utilizado, sendo que os experimentos foram realizados em triplicados. O gene Gapdh foi utilizado como *housekeeping* para normalização das amostras, mediante a seguinte fórmula para cálculo dos valores relativos de expressão (QR): $QR = 2^{-(Ct \text{ gene de interesse} - Ct \text{ Gapdh})} \times 100$. Os seguintes *primers* foram utilizados:

- LepR *forward*, 5'-TGAAGCATCGTACTGCCCCACA-3'
- LepR *reverse*, 5'-ATTCACAAGGGAAGCGCCGA-3'
- Adrb2 *forward*, 5'-GGTTATCGTCCTGGCCATCGTGTTTG-3'
- Adrb2 *reverse*, 5'-TGGTTCGTGAAGAAGTCACAGCAAGTCTC-3'
- Il33 *forward*, 5'-TCCAACCTCCAAGATTTCCCCG-3'
- Il33 *reverse*, 5'-CATGCAGTAGACATGGCAGAA -3'
- Gapdh *forward*, 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'
- Gapdh *reverse*, 5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'

2.9 SEQUENCIAMENTO DE RNA DE CÉLULAS LEPR-YFP SEPARADAS POR FACS

Os GCSs e glândulas pituitárias foram processados conforme o item 2.6. Mediante a separação de 500 células por amostra, foi utilizada uma adaptação do protocolo Smart-seq2 (Picelli *et al.*, 2014) para a preparação de bibliotecas de cDNA, com as seguintes modificações: a) incorporação de 1 mg/ml BSA ultrapura ao tampão de lise; b) adição de 20 µM de nucleotídeo de troca da fita molde (TSO; Exiqon, Dinamarca); c) utilização de 200-250 pg de cDNA em 1/5 das instruções indicadas para o protocolo de tagmentação do kit Illumina Nextera XT (Illumina, USA). A distribuição das bibliotecas de cDNA foi monitorada utilizando um kit de alta sensibilidade ao DNA no equipamento Perkin Elmer LabChip (Perkin Elmer, USA). Três amostras de cada tecido foram submetidas a sequenciamento de indexamento pareado (duas corridas de 151 ciclos) em um equipamento Illumina HiSeq 4000 (Illumina). Os dados do sequenciamento foram analisados mediante o pacote Seurat, na linguagem de programação R (Butler *et al.*, 2018). Para o cálculo dos valores de transcritos por quilobase por milhão (TPM), primeiramente foi dividido o número de leituras dos transcritos de cada gene pelo seu comprimento, em quilobases (leituras

por quilobase, RPK). Na sequência, somou-se o valor de todos os RPKs da amostra, e se dividiu por 10^6 (obtendo-se um fator de escala da amostra, por milhão). Para se obter o TPM de cada gene, cada RPK é dividido por este fator de escala. Os resultados estão expressos como \log_2 (TPM).

2.10 NÍVEIS DE IL-33 NO MEIO DE EXPLANTES DE GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES

Os níveis de IL-33 no meio extracelular foram avaliados por meio do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), com o kit comercial Mouse IL-33 DuoSet (R&D, DY3626), utilizando 100 μ l de amostra, em duplicados.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi conduzida mediante a utilização do software GraphPad Prism 6, e tem seus elementos descritos na legenda de cada figura. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos, e os dados foram representados como média \pm erro padrão da média.

3 RESULTADOS

3.1 VALIDAÇÃO DO MODELO ANIMAL MEDIANTE A CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FLUORESCENTE AMARELA (YFP) NO NÚCLEO ARQUEADO DE CAMUNDONGOS LEPR-YFP

Por meio do cruzamento entre animais LepR-cre e LSL-Rosa26-Chr2-YFP, há a excisão do códon de parada flanqueado por loxP especificamente nas células que expressam LepR, as quais se tornam capazes de produzir a YFP, cuja visualização pode ser usada como repórter da presença das células LepR nos tecidos de interesse (Nagy, 2000; Scott *et al.*, 2009). Para a validação do modelo animal, foi realizada análise de imunofluorescência no núcleo arqueado do hipotálamo, no qual as células LepR possuem elevada expressão e destacada relevância, por exemplo, no controle do peso corporal, ingestão alimentar e gasto energético (Balthasar *et al.*, 2004; Coppari *et al.*, 2005; Caron *et al.*, 2018). Como esperado, foi detectado sinal YFP em células deste núcleo hipotalâmico (Figura 1), indicando a especificidade da recombinação do sistema cre-lox para os animais LepR-YFP.

Para confirmar a funcionalidade do modelo utilizado nesta dissertação, foi avaliada a fosforilação do fator de transcrição STAT3 (do inglês, *signal transducers and activators of transcription 3*), a qual ocorre quando da ligação da leptina ao seu receptor no núcleo arqueado (Vaisse *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 2009). Observou-se a presença da forma fosforilada pSTAT3 nas células YFP do hipotálamo de camundongos LepR-YFP injetados com leptina, o que não ocorreu quando os animais foram injetados com PBS (Figura 1; em detalhe, Figura 2).

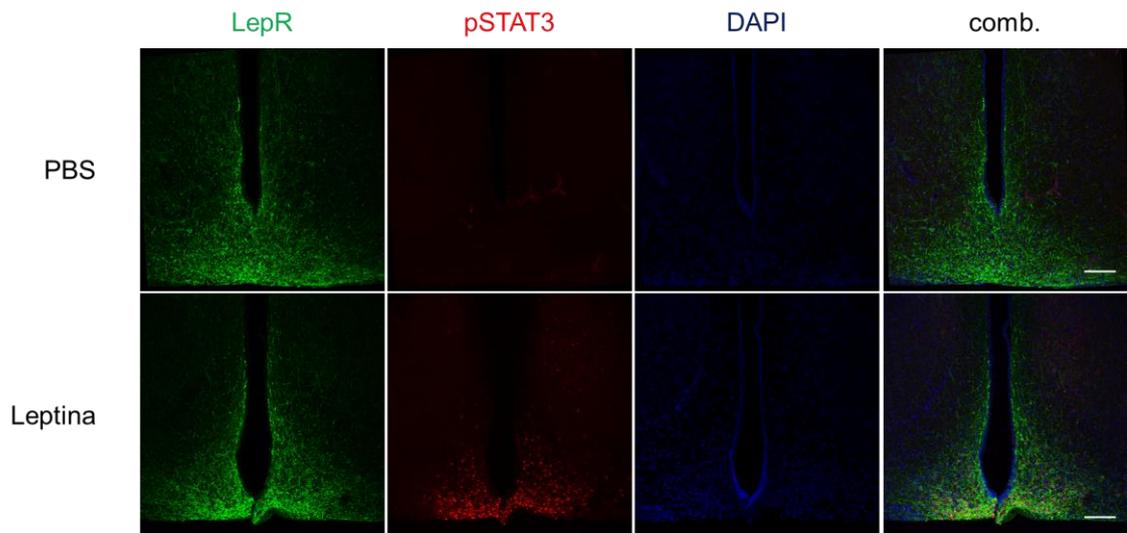


Figura 1

Figura 1 Análise de imunofluorescência com microscopia confocal de fatias do núcleo arqueado do hipotálamo de camundongos tratados com leptina ou PBS. Escala: 100 μ m. Fonte: autor.

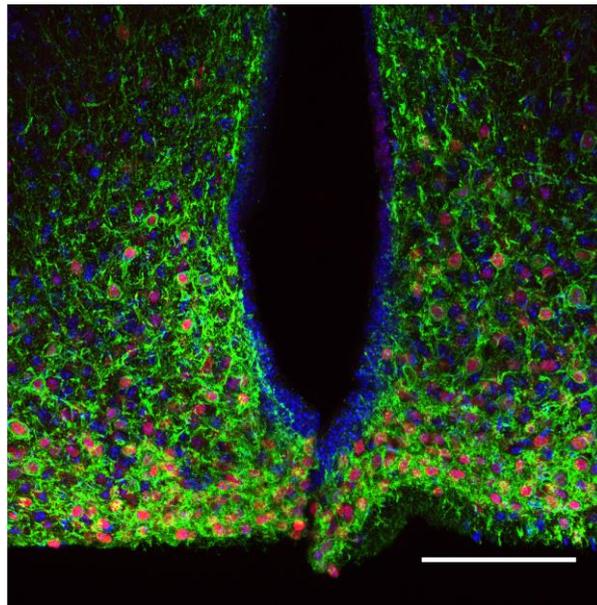


Figura 2 Análise de imunofluorescência com microscopia confocal de fatias do núcleo arqueado do hipotálamo de camundongos tratados com leptina (detalhe da Figura 1). LepR-YFP (verde), pSTAT3 (vermelho), DAPI (azul). Escala: 100 μ m. Fonte: autor.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE CÉLULAS LepR-YFP PRESENTES NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO E EM GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES DE CAMUNDONGOS

Por meio de microscopia confocal, foram observadas células YFP nas fibras nervosas dissecadas do TAsc inguinal de camundongos LepR-YFP (Figura 3), sendo que estas células foram detectadas exclusivamente na periferia das fibras, envolvendo-as (Figura 4). O sinal não foi observado de forma contínua ao longo das fibras; em algumas regiões visualizou-se um sinal em forma de mosaico (Figura 3A), ao passo que outras observou-se um envolvimento completo da fibra (Figura 3B).

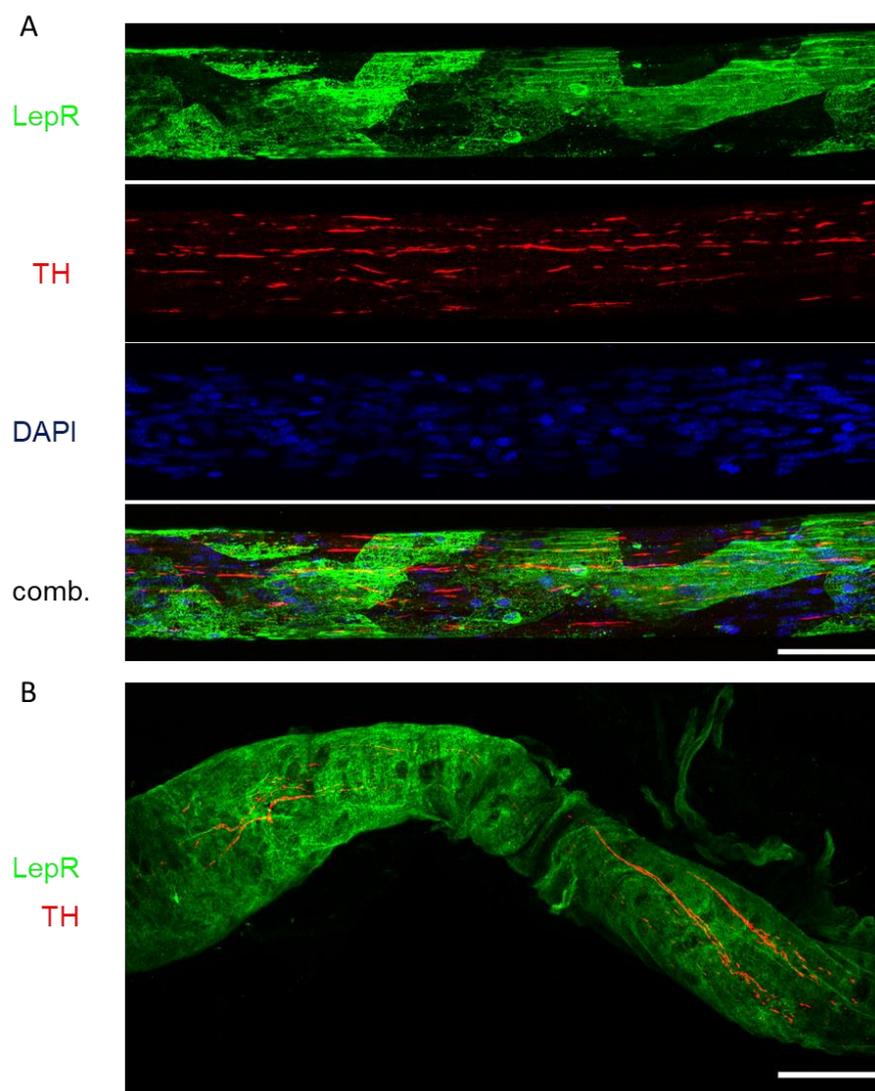


Figura 3 Análise de imunofluorescência com microscopia confocal de fibras nervosas dissecadas do tecido adiposo subcutâneo de camundongos LepR-YFP. Células LepR-YFP envolvem fibras nervosas dissecadas do tecido adiposo subcutâneo inguinal de camundongos. Na região interna, encontram-se as projeções axonais simpáticas marcadas com anti-TH (tirosina hidroxilase). Em **A** observa-se a

expressão com o perfil de mosaico, ao passo que em **B** visualiza-se uma região de cobertura total da fibra pelas células LepR-YFP. Escala: 50 μ m. Fonte: autor.

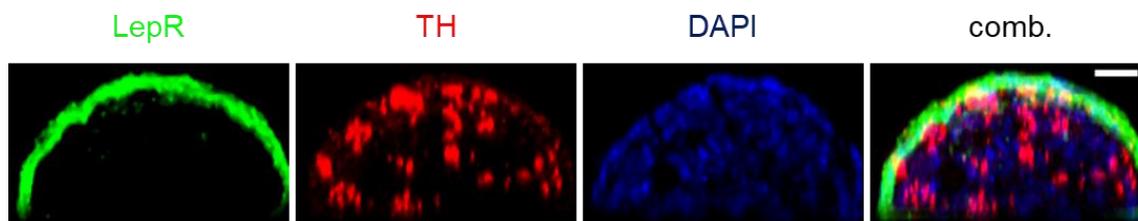


Figura 4 Reconstrução óptica ortogonal (x - z) da Figura 3, destacando-se a localização periférica das células LepR-YFP em relação aos feixes de axônios simpáticos marcados com anti-TH (tirosina hidroxilase). Escala: 10 μ m. Fonte: autor.

Com o intuito de verificar a localização destas células no tecido como um todo, um protocolo de clareamento de tecido adiposo foi otimizado, e observou-se a presença das células LepR-YFP exclusivamente ao redor dos nervos, além de uma leve marcação na parte externa do linfonodo inguinal (Figura 5 A,B). Observa-se também a descontinuidade do sinal ao redor das fibras, como havia sido observado nas fibras dissecadas, evidenciando que este perfil não é devido a deterioração causada pela dissecação, e deve representar a real característica das células no tecido. Embora não tenha sido possível nesta dissertação a otimização de anticorpos para a marcação de neurônios que estivessem compatíveis com o protocolo de clareamento utilizado (e.g. anti-beta3 tubulina ou anti-tirosina hidroxilase), a anatomia dos nervos é facilmente distinguida daquela dos vasos sanguíneos devido a sua morfologia espiralada e à elevada autofluorescência destes (Chi *et al.*, 2018).

As fibras nervosas que inervam o tecido adiposo majoritariamente possuem axônios de neurônios simpáticos (Zeng *et al.*, 2015), e confirmou-se a presença de células LepR-YFP ao redor de neurônios mediante a presença da tirosina hidroxilase (TH), uma enzima limitante na síntese de catecolaminas usada como marcador do SNS devido a sua especificidade neste tecido (Figura 3 e Figura 4). Além disso, foram detectadas células LepR-YFP em GCSs, gânglios nervosos simpáticos (Figura 6). Observa-se que também foram observadas células que expressam o repórter YFP nas fibras nervosas presentes no tecido adiposo marrom, no nervo ciático, bem como na glândula pituitária e nas leptomeninges, que serão objetos de estudo em outros projetos de pesquisa (dados não mostrados).

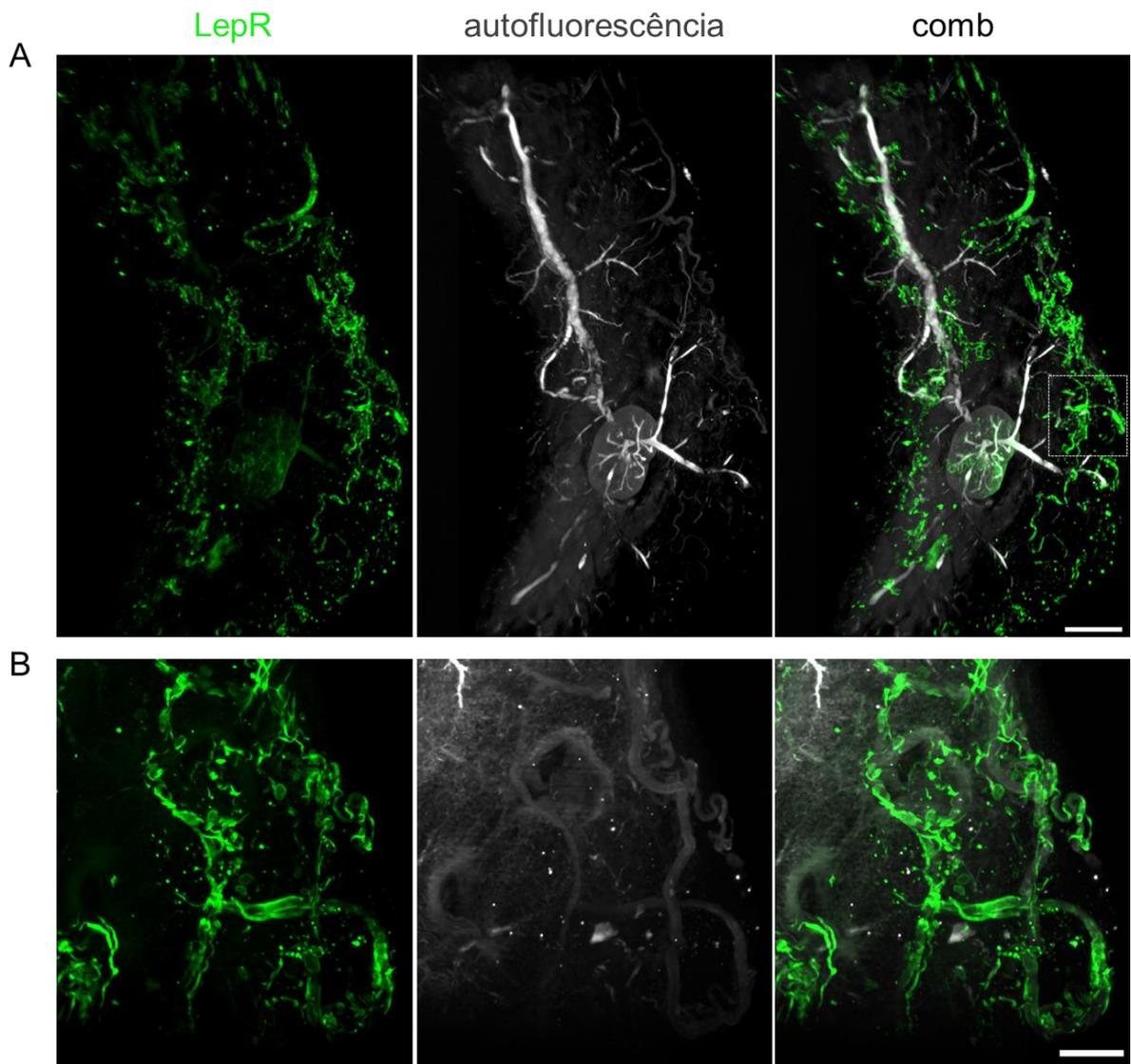


Figura 5 Imageamento do tecido adiposo após protocolo de clareamento seguido de marcação com imunofluorescência. As células LepR-YFP possuem íntima associação com as fibras nervosas, mas não com os vasos sanguíneos no tecido adiposo subcutâneo inguinal (regiões de elevada autofluorescência). Em **A** o tecido clarificado foi imageado por tomografia por projeção óptica; em **B** realizou-se nova aquisição em microscópio *light-sheet* da região hachurada, para visualização detalhada. Escalas: **A** 1000 μm e **B** 200 μm . Fonte: autor.

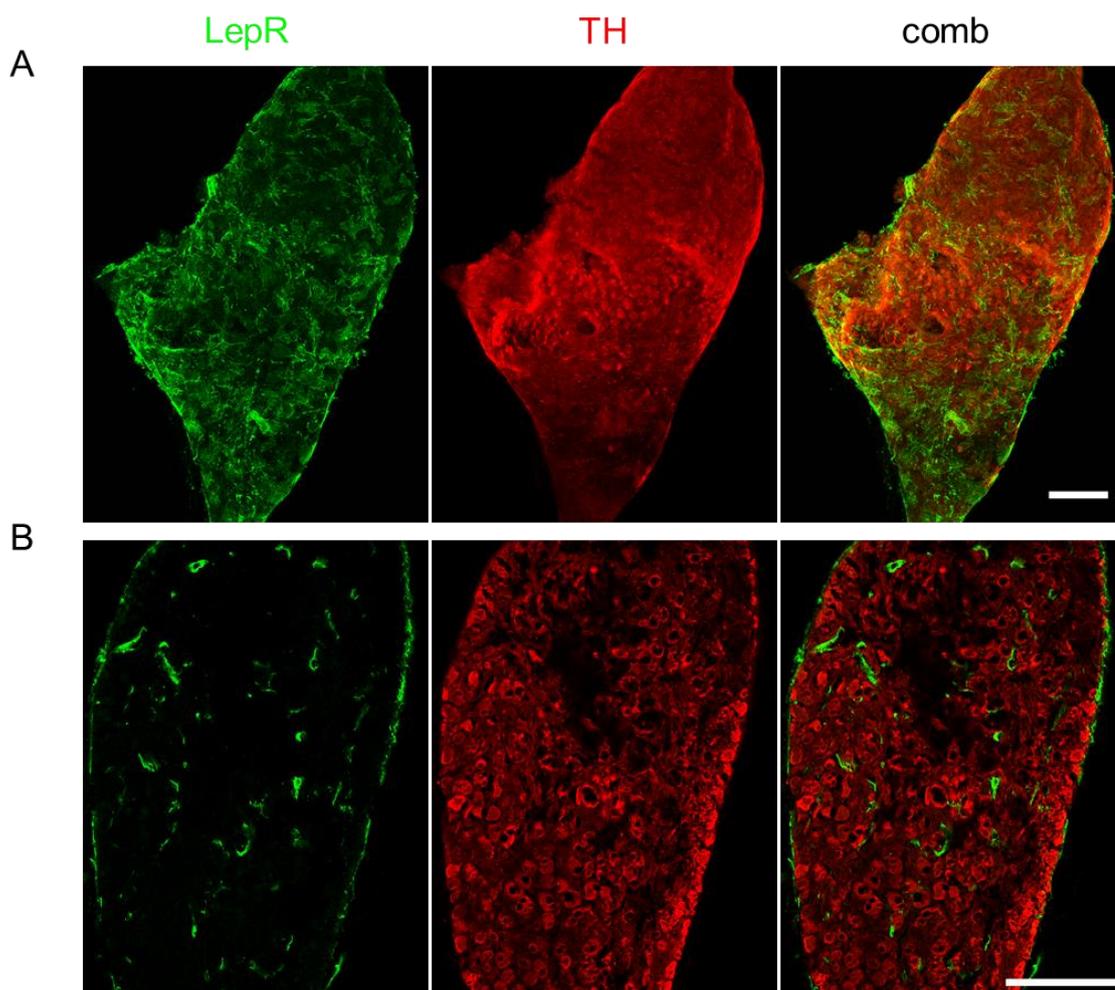


Figura 6 Análise de imunofluorescência com microscopia confocal de gânglios cervicais superiores **A** em *whole mount* e **B** crioseccionados (16 μm) de camundongos LepR-YFP. Escala: 200 μm. Fonte: autor.

A fim de validar molecularmente que a fluorescência detectada provém de células que realmente expressam o receptor de leptina LepR, células com marcação positiva e negativa para YFP foram isoladas por FACS (Figura 7). Por meio da análise de níveis de transcrição de mRNA por rtPCR, verificou-se o enriquecimento de transcritos dos genes que codificam LepR nas células positivas para YFP processadas de três tecidos: fibras nervosas do tecido adiposo subcutâneo inguinal, GCSs, e tecido adiposo visceral (TAv) gonadal (Figura 8).

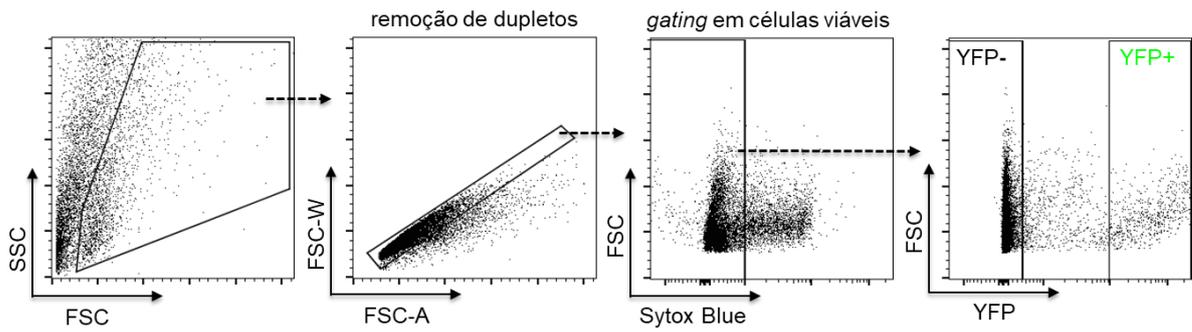


Figura 7 Estratégia de *gating* para a separação de células YFP positivas e negativas de tecidos de camundongos LepR-YFP. Fonte: autor

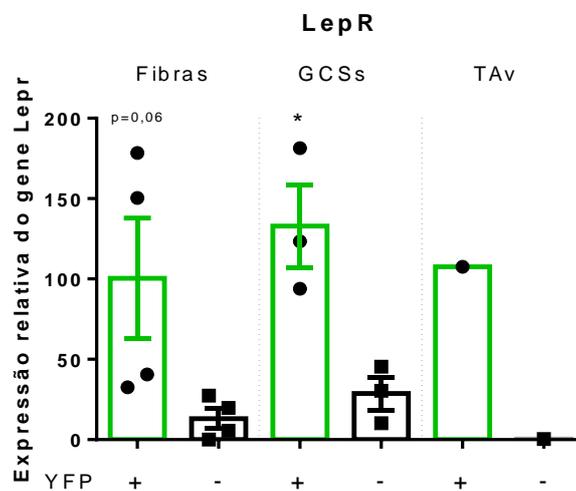


Figura 8 Análise de qRT-PCR representando os níveis de transcritos do gene *LepR* em células LepR-YFP positivas ou negativas separadas de fibras nervosas dissecadas do tecido adiposo subcutâneo visceral (Fibras), de gânglios cervicais superiores (GCSs) e tecido adiposo visceral gonadal (TAv). Cada ponto corresponde à média de três replicados de cada amostra; a barra representa a média \pm erro padrão da média das amostras. Diferenças entre os grupos foram analisadas por um teste t de Student com correção de Welch. Fonte: autor.

A partir dos dados mostrados anteriormente de que as células LepR envolvem as fibras de nervos no tecido adiposo, formulou-se a hipótese de que estas células formariam parte da camada perineural. Para tal caracterização, fibras nervosas de animais LepR-YFP foram dissecadas e fixadas para a análise da sua ultraestrutura por microscopia eletrônica, em colaboração estabelecida com o grupo do Dr. Matteo Iannacone, no Ospedale San Raffaele (Milão, Itália). Primeiramente, com o uso de anti-GFP e anticorpo secundário conjugado com partículas de ouro, observou-se marcação exclusivamente na membrana plasmática das células localizadas na periferia dos nervos (Figura 9A). Estes resultados estão em concordância com o apresentado na Figura 4, e também com o fato que o LepR, marcado com o repórter

YFP, possui localização membranar (Wada *et al.*, 2014). As células marcadas apresentaram morfologia achatada e alongada ao redor de toda a fibra, com a presença de invaginações membranas semelhantes a cavéolas (vesículas envolvidas na transcitose), e uma membrana basal em ambos os lados da célula. Considerando a especificidade e ubiquidade da marcação observada nestas camadas periféricas, as fibras foram processadas utilizando um protocolo de fixação combinando PFA, glutaraldeído e ácido cacodílico. Este protocolo permite uma melhor preservação da morfologia da amostra, porém reduz consideravelmente a antigenicidade das proteínas, limitando o seu uso com a marcação com anticorpos (Griffiths, 1993). Esta técnica permitiu a apresentação de uma ultraestrutura ainda mais resolvida (Figura 9B).

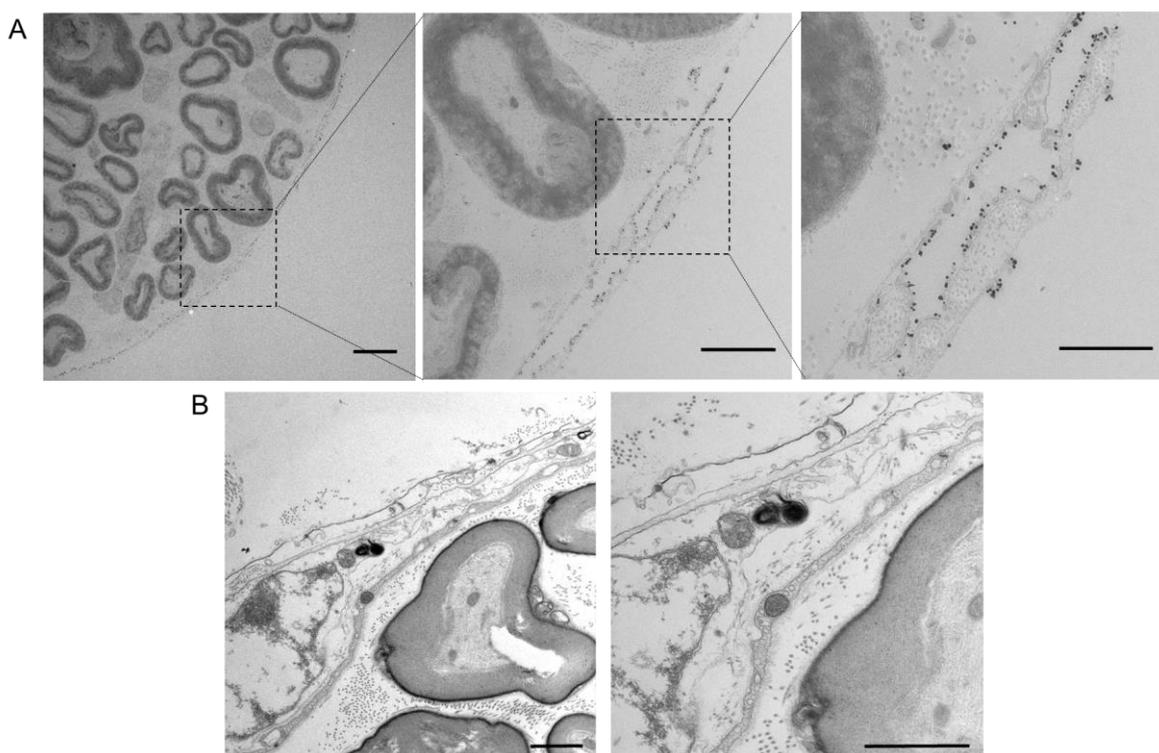


Figura 9 Análise da ultraestrutura das células LepR ao redor das fibras nervosas por microscopia eletrônica de transmissão com uso de **A** anticorpos conjugados com partículas de ouro para determinar a região de marcação das células, e **B** um protocolo de fixação clássico com glutaraldeído para melhor preservação da morfologia das células. Escalas: **A** 5 µm, 2 µm e 1 µm, da esquerda para a direita; **B** 1 µm. Fonte: autor.

Diante dos dados de microscopia eletrônica apresentados, observa-se que a ultraestrutura destas células está de acordo com aquela descrita para as células perineurais (Gamble e Eames, 1964; Peltohen *et al.*, 1987; Pummi *et al.*, 2006; Pina-Oviedo e Ortiz-Hidalgo, 2008). Dentre outros atributos, este tipo celular é

caracterizado por possuir complexos de junções de oclusão nas extremidades de suas células, porém a análise ultramicroscópica foi inconclusiva neste sentido. Além disso, a detecção da imunofluorescência de ocludina, uma proteína com importância funcional para as junções de oclusão, também se apresentou inconclusiva por imunofluorescência, embora o seu sinal tenha sido observado próximo às regiões onde há expressão de LepR-YFP nas fibras nervosas (Figura 10).

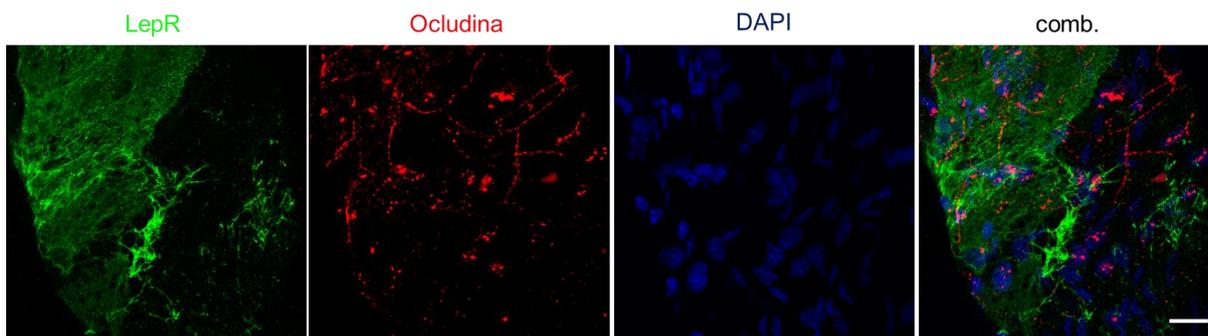


Figura 10 Análise de imunofluorescência com microscopia confocal de fibras nervosas dissecadas do tecido adiposo subcutâneo de camundongos LepR-YFP marcadas com anti-occludina, proteína componente das junções de oclusão. Escala: 20 μ m. Fonte: autor.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CÉLULAS LEPR DOS GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES DE CAMUNDONGOS

Após a caracterização morfológica destas células em nível mesosópico, microscópico e ultramicroscópico, questionou-se qual seria a função destas células, considerando a sua localização intimamente associada a células nervosas em tecidos complexos como o tecido adiposo e gânglios nervosos. Uma das formas de caracterizar células de interesse em nível molecular é a separação destas células por FACS, seguida pela extração de RNA e síntese do seu DNA complementar, para sequenciamento dos nucleotídeos que compõem o ácido nucleico (sequenciamento de RNA), permitindo a quantificação dos níveis dos genes transcritos pela população de células separadas. Para estes estudos, células LepR-YFP extraídas dos GCSs e da glândula pituitária, um tecido também periférico de origem nervosa, foram enviadas para sequenciamento na Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), em Singapura, em colaboração com o grupo do Dr. Florent Ginhoux. Também foram enviadas células LepR-YFP de fibras que inervam o TAsc, contudo a extração de RNA de quantidade e qualidade suficientes para o sequenciamento de RNA mostrou-se desafiante, de forma que esta análise não foi realizada em tempo hábil da conclusão

desta dissertação. No entanto, considerando a relevância desta análise no contexto aqui investigado, estes procedimentos estão sendo repetidos. Observa-se que, além de servir de comparação com os dados de células provenientes dos GCSs, os dados de sequenciamento de RNA de células LepR-YFP extraídas da glândula pituitária não foram abrangidos nesta dissertação, e constituem parte de outro projeto em andamento.

Em consonância com a caracterização morfológica apresentada no item 3.2, verificou-se que as células LepR-YFP dos GCSs apresentaram acentuada expressão de marcadores de células perineurais, como vimentina (Vim), fibronectina (Fn1), α -actina 2 (Acta2), transportador de glicose 1 (Slc2a1), subunidades de laminina (Lama1, Lama3, Lama4 e Lamb2), marcadores de junções de oclusão (Ocln, Cldn1, Tjp1), e o proteoglicano, Ng (Figura 11). Além disso, nota-se diminuta expressão de transcritos para genes marcadores de células musculares (Des), gliais (Gfap e Aif1), linfáticas (Lyve1), neuronais (Neurod1 e Rbfox3). Surpreendentemente, observou-se alta expressão da proteína S100b, a qual é típica de células gliais e é utilizada como critério de distinção de células Schwann de células perineurais no sistema nervoso periférico.

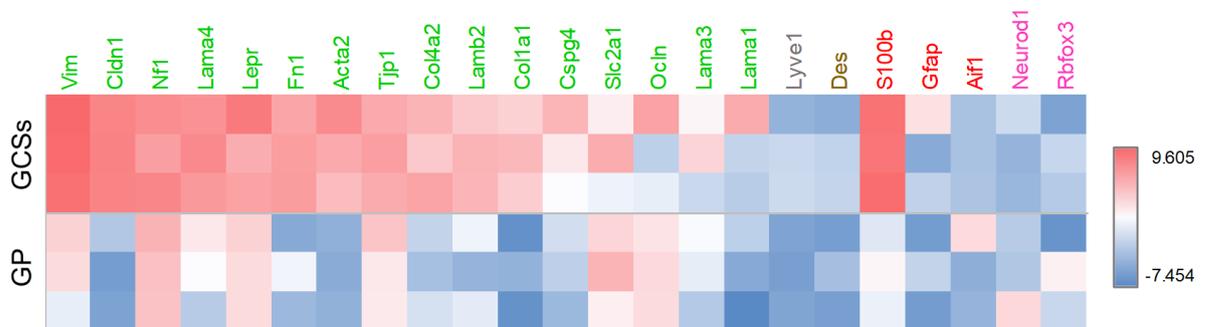


Figura 11 Heatmap representando os níveis de transcrição, em log2 (TPM), de genes marcadores de células perineurais (verde), linfáticas (azul escuro); musculares (cinza), gliais (vermelho), e neuronais (fúcsia) em células LepR-YFP de gânglios cervicais superiores (GCSs) e glândulas pituitárias (GP) separadas por FACS. Fonte: autor.

A seguir, considerando a localização das células LepR-YFP nos GCSs, constituintes do SNS, investigou-se acerca da expressão de receptores que pudessem responder a estímulos adrenérgicos nestas células. Os receptores adrenérgicos beta 2 (Adrb2), alfa 2c (Adra2c) e alfa 2a (Adra2a) apresentaram maiores níveis de expressão (Figura 12). A regulação de Adrb2 tem sido reportada como intimamente relacionada a obesidade (Guarino *et al.*, 2017; Pirzgalska *et al.*, 2017). Dessa forma, decidiu-se aprofundar neste aspecto mediante a verificação por

qRT-PCR deste receptor nas células LepR-YFP de GCSs e fibras nervosas, a qual foi confirmada (Figura 13). Assim, estas células não possuem somente o receptor de leptina, mas também receptores adrenérgicos, de forma que é sensato pensar que as suas funções são realizadas em resposta a estímulos de leptina e/ou adrenérgicos.

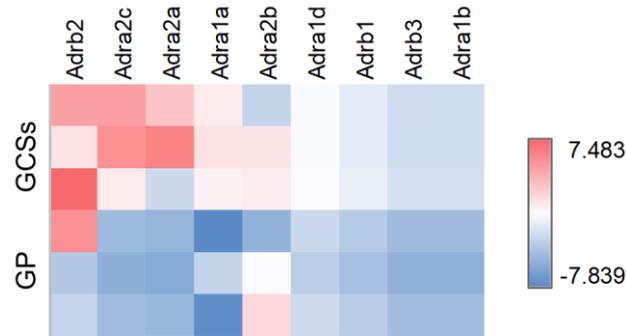


Figura 12 Heatmap representando os níveis de transcrição, em log₂ (TPM), de genes que codificam para receptores adrenérgicos em células LepR-YFP de gânglios cervicais superiores (GCSs) e glândulas pituitárias (GP) separadas por FACS. Fonte: autor.

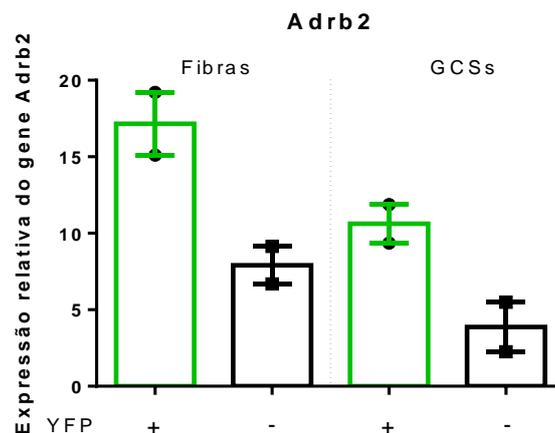


Figura 13 Análise de qRT-PCR representando os níveis de transcritos do gene que codifica o receptor adrenérgico $\beta 2$ em células LepR-YFP positivas ou negativas separadas de fibras nervosas dissecadas do tecido adiposo subcutâneo visceral (Fibras) e de gânglios cervicais superiores (GCSs). Cada ponto corresponde à média de três replicados de cada amostra; a barra representa a média \pm erro padrão da média das amostras. Fonte: autor.

Os GCSs, assim como o tecido adiposo, constituem um tecido complexo que alberga células dos sistemas imunitário e nervoso, sendo que distúrbios na regulação e função destes sistemas estão associados a disfunção do controle metabólico e a obesidade (Guarino *et al.*, 2017; Reilly e Saltiel, 2017). A análise do transcriptoma das células LepR-YFP dos GCSs indicou a expressão gênica de citocinas envolvidas tanto na resposta pró- quanto anti-inflamatória (Figura 14). Chama a atenção a elevada expressão da citocina anti-inflamatória Il33, a qual tem sido recentemente proposta

como ativadora do sistema de resposta imune tipo 2 no tecido adiposo (Miller *et al.*, 2010). Como confirmação por qRT-PCR, observou-se a acentuada expressão da citocina anti-inflamatória Il-33 em células LepR-YFP do TAv (Figura 15). Além disso, também se verificou expressão de Il-33 em células LepR-YFP por imunofluorescência em fibras nervosas extraídas do tecido adiposo (Figura 16).

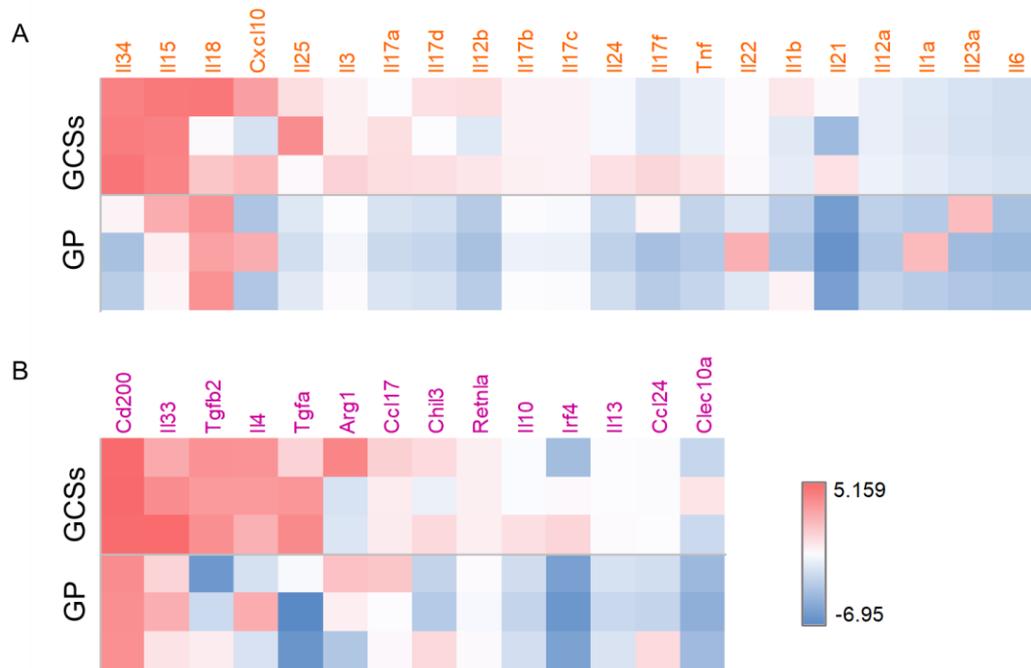


Figura 14 *Heatmap* representando os níveis de transcrição, em log₂ (TPM), de genes que codificam citocinas anti-inflamatórias (laranja) e pró-inflamatórias (magenta) em células LepR-YFP de gânglios cervicais superiores (GCSs) e glândulas pituitárias (GP) separadas por FACS. Fonte: autor.

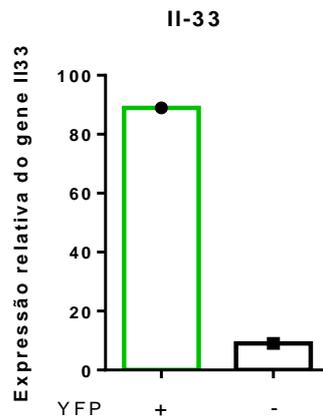


Figura 15 Análise de qRT-PCR representando os níveis de transcritos do gene que codifica a citocina anti-inflamatória Il-33 em células LepR-YFP positivas ou negativas separadas do tecido adiposo visceral. Cada ponto corresponde à média de três replicados de cada amostra. Fonte: autor.

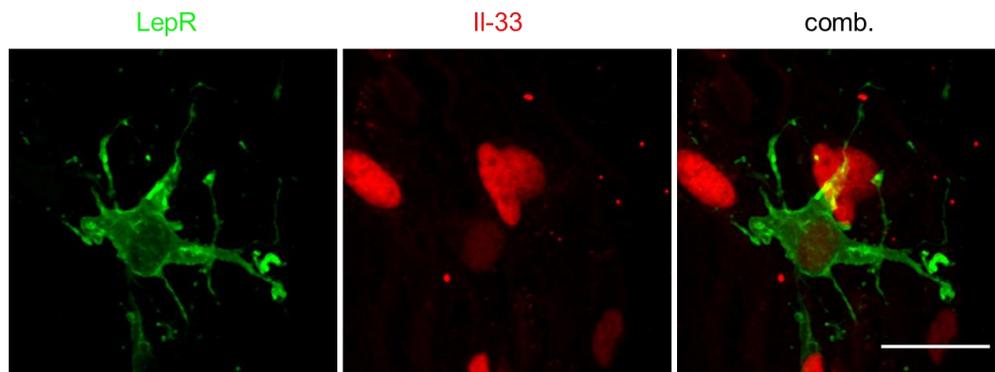


Figura 16 Análise de imunofluorescência com microscopia confocal de fibras nervosas dissecadas do tecido adiposo subcutâneo de camundongos LepR-YFP marcadas com anti-Il33. Escala: 20 µm. Fonte: autor.

3.4 TESTES FUNCIONAIS EM EXPLANTES DE GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES DE CAMUNDONGOS LEPR-YFP TRATADOS COM LEPTINA E ACETILCOLINA

Considerando que a) obesidade é acompanhada por um perfil pró-inflamatório crônica no tecido adiposo, bem como por disfunção na resposta ao SNS (Reilly e Saltiel, 2017); b) indivíduos obesos possuem elevados níveis de leptina (Friedman e Halaas, 1998), e c) conforme apresentado neste trabalho, as células LepR-YFP expressam receptores adrenérgicos e de leptina, bem como a citocina Il-33, postulou-se a hipótese de que as células LepR-YFP responderiam a norepinefrina e/ou leptina, individualmente ou em conjunto, de forma a modular a expressão de Il-33 de acordo com o estímulo. Mais especificamente, que o aumento de leptina causaria redução dos níveis desta citocina anti-inflamatória, correspondendo ao estado inflamatório em obesidade, contexto no qual os níveis de leptina são elevados. Além disso, hipotetizou-se que a norepinefrina seria capaz de reverter este perfil pró-inflamatório, correspondente a um contexto homeostático em que o SNS se encontra funcional.

Para testar esta hipótese, foi realizado o cultivo de explantes de GCSs de camundongos B6, os quais foram tratados com a) leptina, b) acetilcolina, c) leptina + acetilcolina, e d) veículo (meio de cultivo + água) por 24h para análise de expressão gênica dos GCSs e aferimento de níveis de Il-33 no meio de cultivo. O uso de acetilcolina deve-se ao fato de que os neurônios gangliônicos simpáticos são ativados por este neurotransmissor, resultando na liberação de norepinefrina (Pirzgalska *et al.*, 2017). O tratamento com leptina nos explantes de GCSs não afetou a expressão de

Il-33 após 24h, mantendo-se nos mesmos níveis que os explantes que tiveram veículo adicionado (Figura 17). Além disso, apesar de haver um ligeiro aumento na expressão de Il-33 induzida por acetilcolina, não foi observada diferença entre os tratamentos. Os níveis de Il-33 no meio de cultivo não foram detectáveis pela técnica de ELISA utilizada em nenhuma amostra (dados não mostrados).

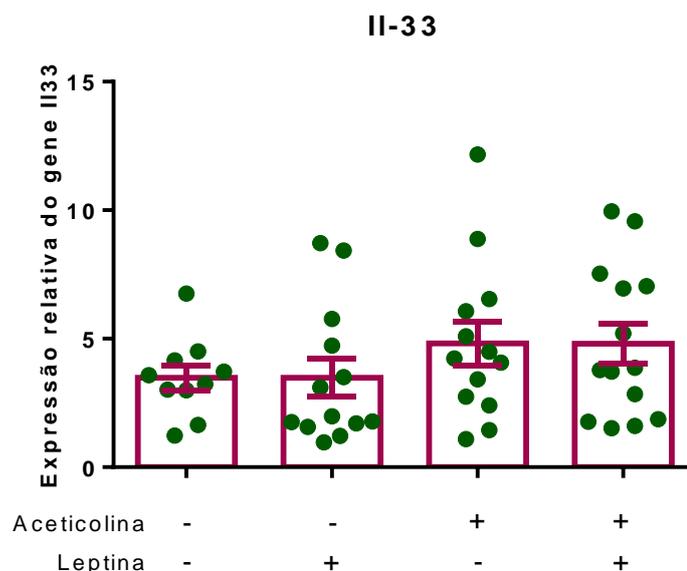


Figura 17 Análise de qRT-PCR representando os níveis de transcritos de Il-33 em explantes de gânglios cervicais superiores tratados com leptina, acetilcolina, e leptina + acetilcolina. Cada ponto corresponde à média de três replicados de cada amostra; a barra representa a média \pm erro padrão da média das amostras. Diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de uma via. Fonte: autor.

As citocinas pró-inflamatória, Il-34, e anti-inflamatória, CD200, apresentaram altos índices de expressão nas células LepR-YFP (Figura 14), e relatos recentes indicam a sua associação com o tecido adiposo e a obesidade (Baer *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014). Ainda a fim de investigar uma possível modulação do estado inflamatório dos GCSs por leptina e/ou acetilcolina, analisou-se a variação da expressão gênica destas citocinas após os tratamentos, porém nenhuma alteração foi observada (Figura 18).

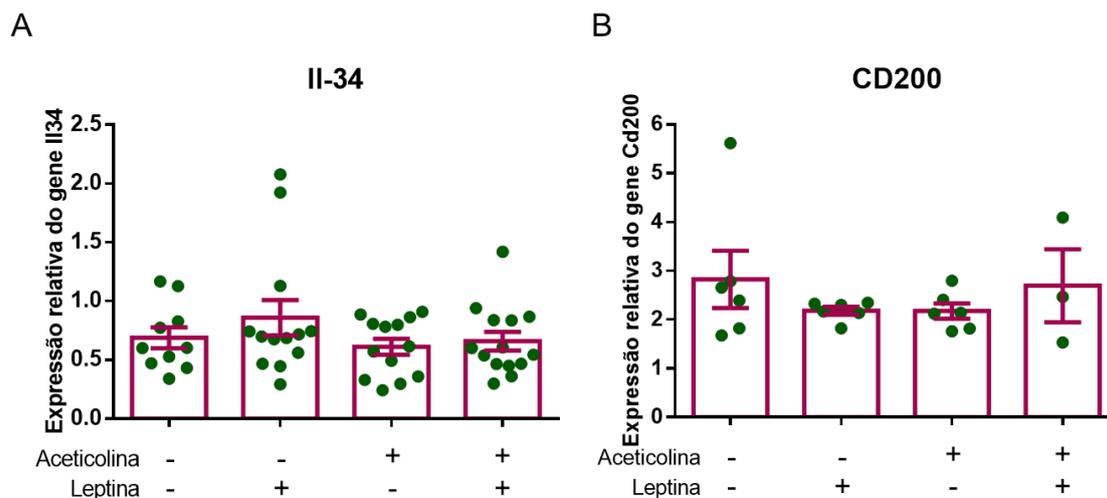


Figura 18 Níveis de expressão gênica de **A** Il-34 e **B** CD200 em explantes de gânglios cervicais superiores tratados com leptina, acetilcolina, e leptina + acetilcolina. Cada ponto corresponde à média de três replicados de cada amostra; a barra representa a média \pm erro padrão da média das amostras. Diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de uma via. Fonte: autor.

3.5 AFERIÇÃO DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE CÁLCIO DAS CÉLULAS LEPR EM EXPLANTES DE GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES TRATADAS COM LEPTINA E ACETILCOLINA

Diante da ausência de efeito da leptina sobre as citocinas analisadas nos GCSs, questionou-se se as células estariam de fato respondendo aos estímulos. Para responder a esta questão, animais LepR-cre foram cruzados com camundongos LSL-GCaMP3 a fim de expressar o indicador de níveis de cálcio geneticamente modificado, GCaMP3, nas células que expressam o receptor de leptina (LepR-GCaMP3). Assim, permite-se a visualização e quantificação dos níveis de cálcio das células LepR mediante o imageamento da fluorescência de GCaMP3, que podem ser utilizados como correlatos de atividade celular em resposta a estímulos (Cai *et al.*, 2014; Gonzalez *et al.*, 2016). A especificidade do sinal foi observada por microscopia confocal em explantes de GCSs em cultivo, os quais apresentaram fluorescência nas células de morfologia e localização similar àquela observada nos gânglios de animais LepR-YFP (Figura 19). A dose de leptina administrada não gerou qualquer alteração do sinal de variação dos níveis de cálcio comparados aos valores de fluorescência basal, apresentando um perfil similar ao das células que tiveram somente o veículo adicionado (Figura 20). No entanto, surpreendentemente, observou-se uma considerável redução na atividade das células após o tratamento com acetilcolina (Figura 20 e 21). Nota-se que os dados de sequenciamento de RNA indicam que as

células LepR-YFP não expressam receptores colinérgicos (Figura 22), de forma que o efeito da administração de acetilcolina deve atuar especificamente nos neurônios. Portanto, estes resultados indicam que as células LepR-GCaMP3 podem ter a sua atividade celular reduzida, e possivelmente silenciada, pelos sinais adrenérgicos causados pelos neurônios simpáticos dos GCSs.

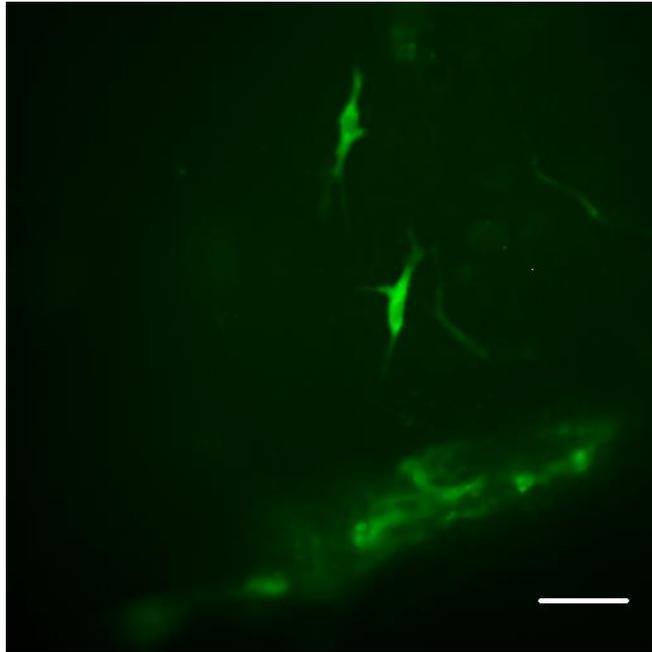


Figura 19 Representação da morfologia de células LepR-GCaMP *ex vivo* em explantes cultivados de gânglios cervicais superiores por microscopia confocal *spinning disk*. Escala: 50 μ m. Fonte: autor.

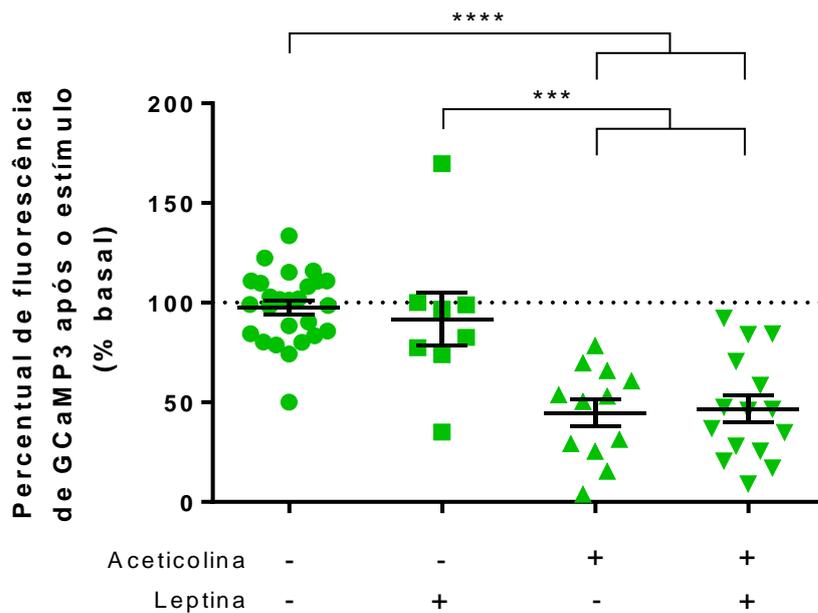


Figura 20 Análise da variação dos níveis de fluorescência de células LepR-GCaMP3 em explantes de gânglios cervicais superiores tratados com leptina, acetilcolina, e leptina + acetilcolina. Cada ponto

corresponde ao percentual da fluorescência aferida 5 minutos após o estímulo sobre a média dos três minutos anteriores a este, para uma célula imageada. A barra representa a média \pm erro padrão da média das amostras. Diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de uma via. Fonte: autor.

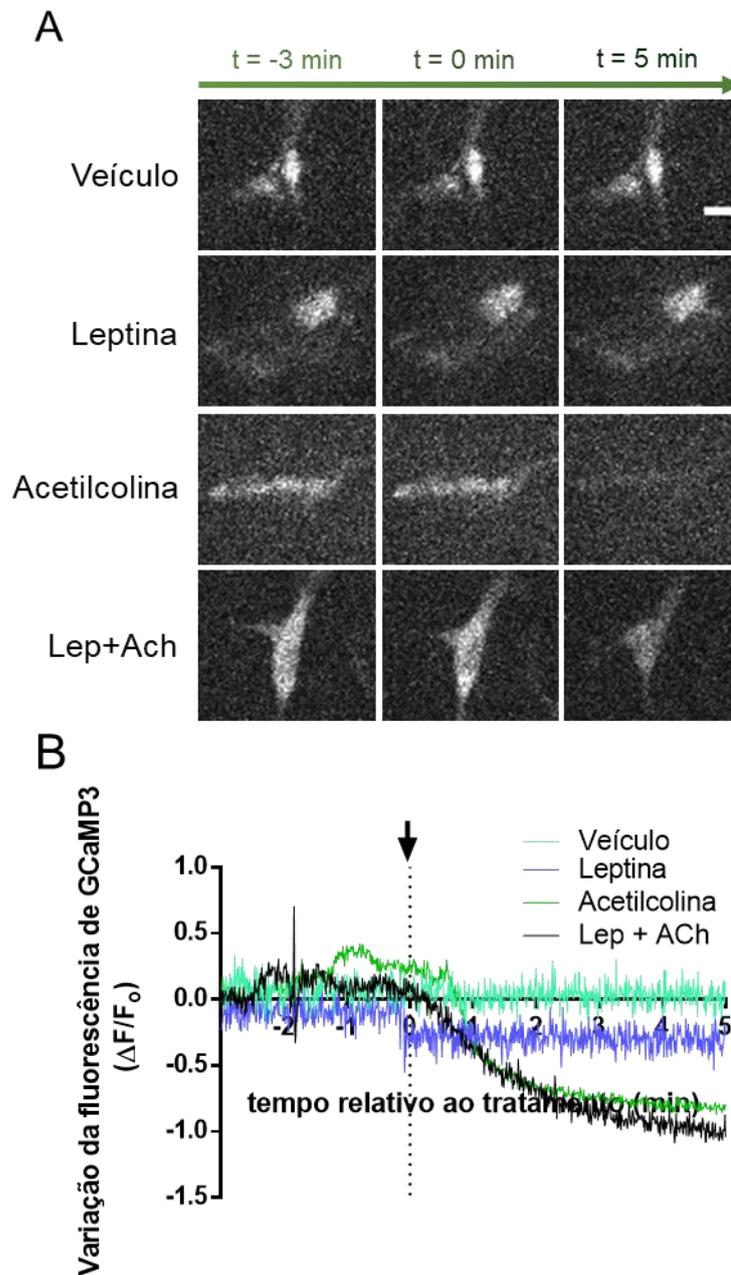


Figura 21 Variação dos níveis de fluorescência de células LepR-GCaMP3 em explantes de GCSs tratados com leptina, acetilcolina, e leptina + acetilcolina (Lep + ACh). **A** imagens de microscopia confocal *spinning disk* representativas da resposta de células LepR-GCaMP 3 min antes (t = -3), imediatamente antes (t = 0) e 5 min após cada tratamento. **B** representação gráfica das variações de fluorescência ao longo do tempo em relação ao tratamento (t = 0, tracejado vertical). Escala: 10 μ m. Fonte: autor.

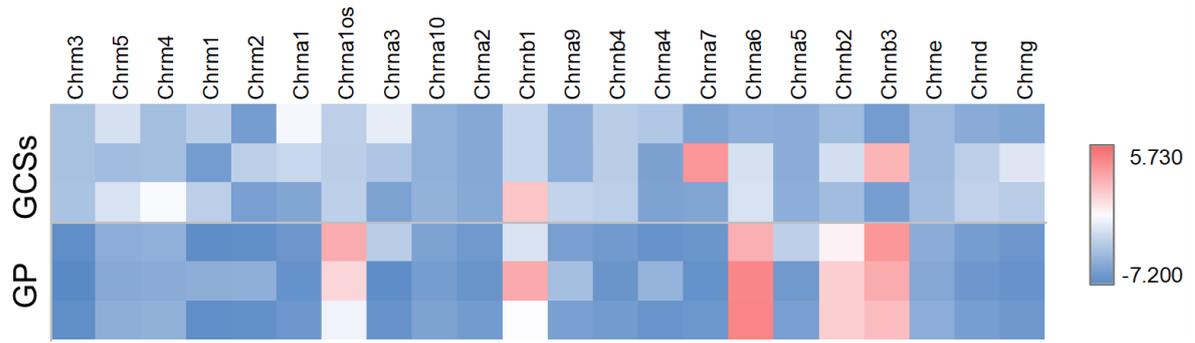


Figura 22 Heatmap representando os níveis de transcrição, em log₂ (TPM), de genes que codificam para receptores colinérgicos em células LepR-YFP de gânglios cervicais superiores (GCSs) e glândulas pituitárias (GP) separadas por FACS. Fonte: autor.

4 DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta a caracterização morfológica em nível mesoscópico, microscópico e ultramicroscópico de células que expressam o receptor de leptina (LepR) na camada perineural de nervos do tecido adiposo subcutâneo (TAsc), bem como nos gânglios simpáticos, GCSs. Os dados de imageamento do tecido adiposo mostram a especificidade do sinal LepR ao redor somente dos nervos presentes neste tecido, e não dos vasos sanguíneos. Por microscopia confocal verificou-se que o sinal é encontrado somente na periferia dos nervos, o que foi confirmado pela marcação observada em microscopia eletrônica de transmissão, indicando que as células observadas constituem a camada perineural. Estes dados foram corroborados pelos níveis de expressão de transcritos de genes reportados como característicos destas células.

O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino por muitos autores, dada a sua complexidade de tipos celulares e sua intercomunicação, síntese de adipocinas com funções endócrinas, como a leptina, e integração metabólica (Kershaw e Flier, 2004; Rosen e Spiegelman, 2014). Neste tecido, observa-se a presença de inúmeros componentes celulares, como adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, linfáticas e células do sistema imune, bem como fibras de nervos periféricos (Kershaw e Flier, 2004; Zeng *et al.*, 2015). Os nervos periféricos possuem três camadas de revestimento, o endoneuro, o epineuro e o perineuro, cada qual com morfologia e função especializadas (Peltonen *et al.*, 2013). O perineuro apresenta função essencial de barreira estrutural que protege os nervos de fatores externos, como patógenos e células do sistema imune (Parmantier *et al.*, 1999). Além do papel de barreira física, outras funções têm sido descritas para estas células, como a orientação na migração neuronal; na ausência das células perineurais em neurônios motores, as células de Schwann falham em envelopar os neurônios motores, indicando um papel de atração ou de estímulo de diferenciação das células de Schwann por meio de fatores secretados pelas células perineurais (Kucenas *et al.*, 2008). O presente trabalho buscou, por meio da caracterização morfológica e molecular, explorar possíveis funções das células perineurais LepR, em especial no papel de comunicação com outras células do tecido adiposo em um contexto inflamatório.

As células perineurais possuem morfologia achatada e alongada que formam camadas concêntricas, cujo número está associado ao diâmetro da fibra nervosa: em regiões menos robustas, encontram-se de uma a três camadas, ao passo este número pode chegar a dezoito nas zonas mais espessas (Reina *et al.*, 2015). A análise da ultraestrutura das fibras nervosas dissecadas do TAsc nesta dissertação identificou muitas seções em que havia somente uma ou duas camadas de células; somente em alguns casos observaram-se três camadas, situação na qual as partículas de ouro marcando as células LepR foram observadas principalmente nas camadas mais internas. Estas observações podem indicar uma certa especificidade da marcação nessas camadas, sendo possível que diferentes camadas expressem diferentes moléculas e apresentem funções distintas. Além disso, a análise da ultraestrutura das células LepR-YFP detectou a presença de uma lâmina basal dupla, de cavéolas, e deposição de colágeno nas regiões imediatamente externas à célula, características que, em conjunto com a sua localização, corroboram com o perfil perineural das células descritas neste estudo (Peltohen *et al.*, 1987; Pina-Oviedo e Ortiz-Hidalgo, 2008; Reina *et al.*, 2015). Considerando que as células perineurais constituem uma barreira celular, as cavéolas, que são caracterizadas por invaginações da membrana que permitem a transcitose, podem proporcionar uma alternativa para o transporte de partículas através das células perineurais, porém ainda se desconhecem os mecanismos deste transporte no perineuro (Peltonen *et al.*, 2013). Em conjunto com a frequente observação de cavéolas nas imagens de microscopia eletrônica neste estudo, verifica-se a elevada e consistente expressão de transcritos dos genes Cav1 e Cav2, que codificam para a proteína caveolina, constitutiva destas estruturas (dados não mostrados). Estes genes geralmente são co-expressos, ao passo que Cav3 possui expressão especificamente em células musculares (Williams e Lisanti, 2004), e não foi observada expressão desta proteína nas células LepR. Observa-se que a presença de expressão de S100b nos dados de sequenciamento de RNA foi surpreendente, e futuros experimentos deverão investigar a expressão deste gene e síntese desta proteína pelas células LepR para esclarecer o papel da S100b na caracterização destas células.

A formação da barreira perineural é caracterizada pela justaposição da sua camada de células, as quais são intimamente unidas por junções de oclusão (Pummi *et al.*, 2006; Pina-Oviedo e Ortiz-Hidalgo, 2008; Liu *et al.*, 2018). Nas seções

observadas por microscopia eletrônica de transmissão neste estudo, bem como na análise de imunofluorescência de ocludina nas fibras inteiras, não se pode concluir acerca da presença dessas junções, porém esforços deverão ser continuados no sentido de otimizar a dissecação das fibras de forma a preservar essas camadas exteriores e seguir investigando os pontos de contato entre as células. Parmantier e cols. (1999) realizaram um estudo sobre o papel da proteína *desert hedgehog*, produzida por células de Schwann na organização estrutural das células perineurais. Na ausência desta proteína, o complexo de junções das células perineurais foi perturbado, e a sua estrutura mais desorganizada, de forma que os autores classificaram estas células como fibroblastos diferenciados que estariam realizando a função de envolvimento dos nervos. Poder-se-ia sugerir que a inconsistência dos resultados aqui apresentados sobre a presença de junções de oclusão nas células LepR consiste no fato de que estas células na realidade sejam os fibroblastos propostos por Parmantier e cols. (1999); no entanto, fibroblastos apresentam retículos endoplasmáticos proeminentes, núcleos compactos, e lâmina basal única (Kucenas, 2015), características que vão de encontro às imagens de microscopia eletrônica de transmissão deste estudo. Além disso, os dados de sequenciamento de RNA aqui apresentados mostram a elevada expressão de marcadores perineurais das células isoladas, sendo esta a primeira hipótese de trabalho, logo a ausência da observação de junções de oclusão nestas células provavelmente se deve a questões de integridade das camadas perineurais na dissecação das fibras do tecido adiposo, bem como do processamento para a análise ultramicroscópica.

Murphy e cols. (2013) sugerem a presença de neurônios que expressam o LepR no tecido adiposo subcutâneo mediante a co-localização do marcador retrógrado Fluorogold com sinal de imunofluorescência de anticorpos anti-LepR no gânglio da raiz dorsal de hamsters. No entanto, estes autores não apresentam dados de marcação de LepR no TA em si que permita a comparação dos seus dados com o apresentado neste trabalho. Além disso, a resposta eletrofisiológica observada por Murphy e cols. (2013) nas fibras nervosas após tratamento com leptina pode não estar relacionada à presença de LepR nos neurônios, porém nas células perineurais, as quais por sua vez respondem à leptina emitindo sinais no microambiente. A presença de LepR deu-se exclusivamente nas células que envolvem as fibras nervosas do tecido adiposo, como analisado em diversos níveis de microscopia, bem como na

ausência da expressão de transcritos neuronais, dados que se opõem ao apresentado por estes autores. Além disso, apesar de que os autores deste grupo já haverem proposto por meio da mesma técnica de marcação retrógrada que neurônios dos gânglios entre T11 e L3 inervam o TAsc (Bartness e Song, 2007; Bartness *et al.*, 2014), somente em 2015 foi visualizado que este tecido é realmente inervado, em especial por neurônios simpáticos que atuam sobre os adipócitos efetivamente provocando lipólise, portanto confirmando que as fibras observadas anteriormente não representavam axônios *en passant* (Zeng, Pirzgalska *et al.* 2015). No entanto, ainda não há consenso sobre a localização dos corpos celulares destes neurônios, e estudos de imagem utilizando marcação por anticorpos seguidos de clareamento do animal, podem responder a esta questão (Pan *et al.*, 2016). Considerando o papel lipolítico direto exercido por estes neurônios, a confirmação da localização de seus corpos celulares, bem como da sua caracterização molecular, é de suma importância considerando o potencial impacto que a modulação farmacológica dessas células no tratamento da obesidade. Adicionalmente, futuros estudos acerca das vias de sinalização utilizadas pelas células LepR para comunicação com os neurônios e outros tipos celulares presentes nos nervos periféricos são necessários para melhor entender como estas células se relacionam dentro do tecido, sendo que os dados obtidos por sequenciamento de RNA neste trabalho podem ser úteis para o levantamento de hipóteses sobre este tema.

Como mencionado, as células do sistema imune são componentes importantes do tecido adiposo, e a obesidade é tipicamente acompanhada de um estado inflamatório crônico neste tecido (Reilly e Sattiel, 2017). O aumento do número de macrófagos é intimamente associado a este estado fisiológico, bem como o aumento da proporção de macrófagos com características pró-inflamatórias em relação a macrófagos anti-inflamatórios (Lumeng *et al.*, 2007; Fujisaka *et al.*, 2009; Amano *et al.*, 2014). Por outro lado, como mecanismo de proteção a este estado pró-inflamatório, o tecido adiposo possui uma série de tipos celulares, como macrófagos anti-inflamatórios residentes, células T reguladoras (Hotamisligil, 2017; Lee *et al.*, 2018). Os dados de sequenciamento de RNA das células LepR descritas neste trabalho indicam que estas expressam citocinas tanto pró- quanto anti-inflamatórias, que podem indicar o seu papel na modulação de um contexto inflamatório. Apesar de ser bem estabelecida a atuação como barreira física das células perineurais como

proteção a infecção exógena aos nervos ou a sinais inflamatórios, não é claro o papel de sinalização destas células no contexto da inflamação, por exemplo mediante a produção e liberação de citocinas (Schröder, 2001; Kucenas *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2018).

Em relação ao papel das células perineurais na resposta inflamatória, grande parte dos estudos explora o seu papel de barreira contra patógenos e células do sistema imune, o qual é perturbado em um contexto de neuropatia (Skaper, 2017; Liu *et al.*, 2018). No entanto, considerando o relevante papel das fibras nervosas e sua comunicação com outros tipos celulares na homeostasia do tecido adiposo (Zeng *et al.*, 2015; Pirzgalska *et al.*, 2017), levantou-se a hipótese de que as células LepR descritas neste estudo poderiam influir na comunicação dentro deste tecido por meio da modulação da expressão de citocinas, que poderiam estar relacionadas ao estado de inflamação crônica encontrado na gordura de indivíduos obesos. Primeiramente, levando em conta relatos recentes indicando a atuação da citocina anti-inflamatória Il-33 na regulação e ativação da resposta imune tipo 2 no tecido adiposo (Molofsky *et al.*, 2015; Vasanthakumar *et al.*, 2015), bem como a alta expressão dos transcritos dessa citocina apresentada por sequenciamento de RNA das células LepR nesta dissertação, hipotetizou-se que leptina e/ou norepinefrina, duas moléculas de suma importância no tecido adiposo para as quais as células LepR possuem receptores, seriam capazes de modular a expressão dessa citocina. Além disso, nota-se que apesar do papel da Il-33 no contexto de proteção anti-inflamatória no tecido adiposo estar sendo investigado por diversos grupos de pesquisa, não há consenso sobre quais células contribuem para a produção e liberação desta citocina neste contexto, sendo que alguns autores sugerem uma identidade endotelial e outros propõem que fibroblastos diferenciados exercem este papel (Molofsky *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2017). Os dados aqui apresentados sugerem que as células LepR possuem identidade perineural e expressam a citocina Il-33, logo é possível que a ativação do sistema imune tipo 2 por esta citocina tenha origem nas células LepR.

Visto que o TAsc recebe projeções axonais de neurônios cujos corpos celulares encontram-se em outras regiões, como os gânglios da cadeia paravertebral (Kandel *et al.*, 2000), a dissecação da gordura para testar esta hipótese no tecido adiposo *ex vivo* levaria ao desmembramento destes neurônios, alterando a sua fisiologia, e muito provavelmente também das células perineurais. Assim, considerando a presença de

células LepR nos gânglios simpáticos, GCSs, explantes deste tecido foram utilizados para verificar a resposta destas células a leptina e/ou acetilcolina, em especial sobre a expressão de citocinas. No entanto, após realizada uma série de experimentos, não foi observada alteração da expressão gênica de Il-33 nos explantes tratados, tampouco foram detectados níveis desta citocina por ELISA no meio de cultivo.

A análise de influxo de cálcio nas células LepR-GCaMP3 após o tratamento dos explantes indicou que a incubação com acetilcolina reduz a atividade destas células cinco minutos após a sua administração, e que talvez a ausência de efeito na expressão gênica de Il-33 esteja diluída, visto que não está sendo estudado o efeito diretamente sobre as células, mas sobre o explante inteiro. Assim, antes de se refutar a hipótese do efeito de leptina e/ou norepinefrina sobre as células LepR neste contexto de inflamação, ao menos duas linhas de experimentos podem ser realizadas: a) o tratamento de explantes LepR-YFP com leptina e acetilcolina, com subsequente separação das células positivas para YFP por FACS e comparação da expressão gênica entre células de explantes tratados e controles; b) a otimização de um protocolo de cultura de células LepR-YFP de fibras do TAsc separadas por FACS, para a aplicação de leptina e acetilcolina e verificação da mobilização de Il-33 por imunofluorescência, bem como níveis de Il-33 no meio de cultivo. Apesar de haverem sido idealizados para o desenvolvimento do presente estudo, estes experimentos requerem o uso de elevado número de animais LepR-YFP para se obterem células suficientes, o que não foi possível de se desenvolver em um tempo hábil. Nota-se que diante do debate acerca da origem celular da Il-33, os dados contribuídos por este trabalho são promissores na caracterização celular da origem desta citocina, contudo os experimentos funcionais não foram conclusivos, e novos ensaios deverão ser realizados para responder a esta questão.

Em relação aos níveis de atividade das células LepR-GCaMP3 após tratamento com acetilcolina, é interessante notar que houve variabilidade no padrão de resposta de diferentes células LepR-GCaMP3. No geral, as células têm seus níveis de cálcio significativamente reduzida 5 minutos após o tratamento; no entanto, ao passo que algumas células simplesmente apresentam uma redução gradual na fluorescência emitida, outras evidenciam uma série de picos cujo nível basal após o estímulo gradualmente diminui, e ainda outras possuem um padrão de um único e longo pico de fluorescência imediatamente após o estímulo, ao final do qual os níveis de atividade

se encontram abaixo do basal anterior ao tratamento. Esta heterogeneidade de resposta também deve ser investigada para se verificar se esta diferença de padrão de resposta representa uma variabilidade populacional, visto que é plausível refletir que a diferença no padrão de resposta ao tratamento com acetilcolina possa representar células com perfil de expressão gênica diferente, constituindo, portanto, populações distintas. Apesar de haver consistência entre os replicados de sequenciamento de RNA para genes marcadores, como LepR e as citocinas investigadas, Il-33, Il-34 e CD200, alguns transcritos apresentaram relativa variabilidade, o que pode indicar diferentes populações de células LepR. Esta hipótese pode ser testada mediante o sequenciamento de RNA de células individuais separadas por FACS (Hu *et al.*, 2016).

Relativamente à ausência de resposta das células LepR-GCaMP3 após tratamento com leptina, ressalta-se que a dose utilizada tinha o intuito de representar uma concentração próxima àquela reportada como fisiológica para os camundongos, em especial no contexto de obesidade com elevados níveis deste hormônio (Cases *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 2011; Burnett *et al.*, 2017). Sabe-se que diversos estudos *in vitro* e *ex vivo* utilizam doses de duas a quatro vezes mais altas que as utilizadas neste trabalho (Dhar *et al.*, 2014; Santos, Bobermin, *et al.*, 2018), as quais representam concentrações suprafisiológicas. Para se entender a importância do papel da leptina na resposta das células perineurais, e estudar o seu contexto na obesidade, possivelmente mediante a modulação dos neurônios simpáticos que se encontram disfuncionais neste contexto, primeiramente é necessário entender se as células verdadeiramente respondem a este estímulo. Logo, diante da ausência de resposta nas doses fisiológicas, há a necessidade de verificar a variação do sinal de células LepR-GCaMP3 em concentrações mais altas, e experimentos de dose-resposta a leptina em explantes serão realizados. Sobre a ausência de níveis detectáveis de Il-33 no meio de cultivo, observa-se que a Il-33 é rapidamente oxidada no ambiente extracelular, em especial após ligar-se ao seu receptor (Cohen *et al.*, 2015), e esta pode ser uma explicação para a ausência desta citocina no meio após 24h. Este período de incubação foi escolhido após revisão da literatura de experimentos que aferem expressão gênica de citocinas *in vitro/ex vivo* (Gaudier-Diaz *et al.*, 2017; Popichak *et al.*, 2018; Santos, Roppa, *et al.*, 2018), e experimentos para verificar a detecção de Il-33 no meio em tempos menores serão realizados.

O presente trabalho apresenta a descrição e caracterização de células perineurais que expressam o receptor de leptina, LepR, no tecido adiposo e em outros tecidos relevantes associados ao sistema nervoso periférico, mediante o congluamento de dados moleculares e morfológicos. Observa-se que ainda há uma plethora de questões abertas sobre as células perineurais e o seu papel fisiológico, e os dados apresentados neste trabalho podem abrir caminho para a melhor compreensão do seu papel no contexto funcional e patológico. Além disso, este trabalho traz como novidade a identificação do LepR como marcador para as células perineurais. Esta descoberta tem o potencial de impactar o estudo deste tipo celular devido à existência de ferramentas biológicas disponíveis, como animais LepR-cre, permitindo o teste de hipóteses de forma imediata, sem a necessidade de diversos marcadores.

REFERÊNCIAS

AMANO, S. U.; COHEN, J. L.; VANGALA, P.; TENCEROVA, M.; NICOLORO, S. M.; YAWE, J. C.; SHEN, Y.; CZECH, M. P.; AOUADI, M. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. **Cell Metab**, v. 19, n. 1, p. 162-171, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24374218> >.

ARMULIK, A.; GENOVE, G.; MAE, M.; NISANCIOGLU, M. H.; WALLGARD, E.; NIAUDET, C.; HE, L.; NORLIN, J.; LINDBLOM, P.; STRITTMATTER, K.; JOHANSSON, B. R.; BETSHOLTZ, C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. **Nature**, v. 468, n. 7323, p. 557-61, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944627> >.

ATASOY, D.; BETLEY, J. N.; SU, H. H.; STERNSON, S. M. Deconstruction of a neural circuit for hunger. **Nature**, v. 488, n. 7410, p. 172-7, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22801496> >.

BAER, P. C.; KUCI, S.; KRAUSE, M.; KUCI, Z.; ZIELEN, S.; GEIGER, H.; BADER, P.; SCHUBERT, R. Comprehensive phenotypic characterization of human adipose-derived stromal/stem cells and their subsets by a high throughput technology. **Stem Cells Dev**, v. 22, n. 2, p. 330-9, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920587> >.

BALTHASAR, N.; COPPARI, R.; MCMINN, J.; LIU, S. M.; LEE, C. E.; TANG, V.; KENNY, C. D.; MCGOVERN, R. A.; CHUA, S. C., JR.; ELMQUIST, J. K.; LOWELL, B. B. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. **Neuron**, v. 42, n. 6, p. 983-91, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207242> >.

BARATEIRO, A.; MAHU, I.; DOMINGOS, A. I. Leptin Resistance and the Neuro-Adipose Connection. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 8, p. 45, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28321206> >.

BARTNESS, T. J.; LIU, Y.; SHRESTHA, Y. B.; RYU, V. Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. **Front Neuroendocrinol**, v. 35, n. 4, p. 473-93, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24736043> >.

BARTNESS, T. J.; SONG, C. K. Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. **J Lipid Res**, v. 48, n. 8, p. 1655-72, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17460327> >.

BARTNESS, T. J.; SONG, C. K.; SHI, H.; BOWERS, R. R.; FOSTER, M. T. Brain–adipose tissue cross talk. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 01, p. 53-64, 2007.

BRAUNE, J.; WEYER, U.; HOBUSCH, C.; MAUER, J.; BRUNING, J. C.; BECHMANN, I.; GERICKE, M. IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. **J Immunol**, v. 198, n. 7, p. 2927-2934, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28193830> >.

BURNETT, L. C.; SKOWRONSKI, A. A.; RAUSCH, R.; LEDUC, C. A.; LEIBEL, R. L. Determination of the half-life of circulating leptin in the mouse. **Int J Obes (Lond)**, v. 41, n. 3, p. 355-359, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28025576> >.

BUTLER, A.; HOFFMAN, P.; SMIBERT, P.; PAPALEXI, E.; SATIJA, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. **Nat Biotechnol**, v. 36, n. 5, p. 411-420, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29608179> >.

CAI, B.; CHEN, X.; LIU, F.; LI, J.; GU, L.; LIU, J. R.; LIU, J. A cell-based functional assay using a green fluorescent protein-based calcium indicator dCys-GCaMP. **Assay Drug Dev Technol**, v. 12, n. 6, p. 342-51, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25105973> >.

CARON, A.; LEE, S.; ELMQUIST, J. K.; GAUTRON, L. Leptin and brain-adipose crosstalks. **Nat Rev Neurosci**, v. 19, n. 3, p. 153-165, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29449715> >.

CASES, J. A.; GABRIELY, I.; MA, X. H.; YANG, X. M.; MICHAELI, T.; FLEISCHER, N.; ROSSETTI, L.; BARZILAI, N. Physiological increase in plasma leptin markedly inhibits insulin secretion in vivo. **Diabetes**, v. 50, n. 2, p. 348-52, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11272146> >.

CHANG, E. J.; LEE, S. K.; SONG, Y. S.; JANG, Y. J.; PARK, H. S.; HONG, J. P.; KO, A. R.; KIM, D. Y.; KIM, J. H.; LEE, Y. J.; HEO, Y. S. IL-34 is associated with obesity, chronic inflammation, and insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 7, p. E1263-71, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24712570> >.

CHANG, S. K.; KOHLGRUBER, A. C.; MIZOGUCHI, F.; MICHELET, X.; WOLF, B. J.; WEI, K.; LEE, P. Y.; LYNCH, L.; DUQUETTE, D.; CEPERUELO-MALLAFRE, V.; BANKS, A. S.; BRENNER, M. B. Stromal cell cadherin-11 regulates adipose tissue inflammation and diabetes. **J Clin Invest**, v. 127, n. 9, p. 3300-3312, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28758901> >.

CHEN, H.; CHARLAT, O.; TARTAGLIA, L. A.; WOOLF, E. A.; WENG, X.; ELLIS, S. J.; LAKEY, N. D.; CULPEPPER, J.; MOORE, K. J.; BREITBART, R. E.; DUYK, G. M.; TEPPER, R. I.; MORGENSTERN, J. P. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 491-5, 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608603> >.

CHI, J.; WU, Z.; CHOI, C. H. J.; NGUYEN, L.; TEGEGNE, S.; ACKERMAN, S. E.; CRANE, A.; MARCHILDON, F.; TESSIER-LAVIGNE, M.; COHEN, P. Three-Dimensional Adipose Tissue Imaging Reveals Regional Variation in Beige Fat Biogenesis and PRDM16-Dependent Sympathetic Neurite Density. **Cell Metab**, v. 27, n. 1, p. 226-236 e3, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29320703> >.

CHUA, S. C., JR.; CHUNG, W. K.; WU-PENG, X. S.; ZHANG, Y.; LIU, S. M.; TARTAGLIA, L.; LEIBEL, R. L. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. **Science**, v. 271, n. 5251, p. 994-6, 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8584938> >.

COHEN, E. S.; SCOTT, I. C.; MAJITHIYA, J. B.; RAPLEY, L.; KEMP, B. P.; ENGLAND, E.; REES, D. G.; OVERED-SAYER, C. L.; WOODS, J.; BOND, N. J.; VEYSSIER, C. S.; EMBREY, K. J.; SIMS, D. A.; SNAITH, M. R.; VOUSDEN, K. A.; STRAIN, M. D.; CHAN, D. T.; CARMEN, S.; HUNTINGTON, C. E.; FLAVELL, L.; XU, J.; POPOVIC, B.; BRIGHTLING, C. E.; VAUGHAN, T. J.; BUTLER, R.; LOWE, D. C.; HIGAZI, D. R.; CORKILL, D. J.; MAY, R. D.; SLEEMAN, M. A.; MUSTELIN, T. Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. **Nat Commun**, v. 6, p. 8327, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26365875> >.

COPPARI, R.; ICHINOSE, M.; LEE, C. E.; PULLEN, A. E.; KENNY, C. D.; MCGOVERN, R. A.; TANG, V.; LIU, S. M.; LUDWIG, T.; CHUA, S. C., JR.; LOWELL, B. B.; ELMQUIST, J. K. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. **Cell Metab**, v. 1, n. 1, p. 63-72, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054045> >.

CORNEJO, M. P.; HENTGES, S. T.; MALIQUEO, M.; COIRINI, H.; BECU-VILLALOBOS, D.; ELIAS, C. F. Neuroendocrine Regulation of Metabolism. **J Neuroendocrinol**, v. 28, n. 7, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27114114> >.

DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J.; ALLEN, J. E.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 986-95, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048120> >.

DHAR, M.; WAYMAN, G. A.; ZHU, M.; LAMBERT, T. J.; DAVARE, M. A.; APPLEYARD, S. M. Leptin-induced spine formation requires TrpC channels and the CaM kinase cascade in the hippocampus. **J Neurosci**, v. 34, n. 30, p. 10022-33, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25057204> >.

EISENHOFER, G.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D. S. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. **Pharmacol Rev**, v. 56, n. 3, p. 331-49, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15317907> >.

FRIEDMAN, J. M. Obesity in the new millennium. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 632-4, 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766249> >.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763-70, 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9796811> >.

FRY, M.; FERGUSON, A. V. The sensory circumventricular organs: brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. **Physiol Behav**, v. 91, n. 4, p. 413-23, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17531276> >.

FUJISAKA, S.; USUI, I.; BUKHARI, A.; IKUTANI, M.; OYA, T.; KANATANI, Y.; TSUNEYAMA, K.; NAGAI, Y.; TAKATSU, K.; URAKAZE, M.; KOBAYASHI, M.; TOBE, K. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2574-82, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19690061> >.

GAMBLE, H. J.; EAMES, R. A. An Electron Microscope Study of the Connective Tissues of Human Peripheral Nerve. **J Anat**, v. 98, p. 655-63, 1964. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14229996> >.

GAUDIER-DIAZ, M. M.; ZHANG, N.; HAINES, A. H.; SURBHI; ZHOU, M.; DEVRIES, A. C. Social interaction modulates the neuroinflammatory response to global cerebral ischemia in male mice. **Brain Res**, v. 1673, p. 86-94, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28807664> >.

GIESECK, R. L., 3RD; WILSON, M. S.; WYNN, T. A. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. **Nat Rev Immunol**, v. 18, n. 1, p. 62-76, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28853443> >.

GOLDEN, P. L.; MACCAGNAN, T. J.; PARDRIDGE, W. M. Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. **J Clin Invest**, v. 99, n. 1, p. 14-8, 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9011568> >.

GONZALEZ-MUNIESA, P.; MARTINEZ-GONZALEZ, M. A.; HU, F. B.; DESPRES, J. P.; MATSUZAWA, Y.; LOOS, R. J. F.; MORENO, L. A.; BRAY, G. A.; MARTINEZ, J. A. Obesity. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17034, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28617414> >.

GONZALEZ, J. A.; JENSEN, L. T.; IORDANIDOU, P.; STROM, M.; FUGGER, L.; BURDAKOV, D. Inhibitory Interplay between Orexin Neurons and Eating. **Curr Biol**, v. 26, n. 18, p. 2486-91, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27546579> >.

GRIFFITHS, G. **Fine Structure Immunocytochemistry**. 1. Berlin, Alemanha: Springer-Verlag, 1993. ISBN 9783642770951.

GROPP, E.; SHANABROUGH, M.; BOROK, E.; XU, A. W.; JANOSCHEK, R.; BUCH, T.; PLUM, L.; BALTHASAR, N.; HAMPEL, B.; WAISMAN, A.; BARSH, G. S.; HORVATH, T. L.; BRUNING, J. C. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 10, p. 1289-91, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16158063> >.

GUALDA, E. J.; VALE, T.; ALMADA, P.; FEIJO, J. A.; MARTINS, G. G.; MORENO, N. OpenSpinMicroscopy: an open-source integrated microscopy platform. **Nat Methods**, v. 10, n. 7, p. 599-600, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749300> >.

GUARINO, D.; NANNIPIERI, M.; IERVASI, G.; TADDEI, S.; BRUNO, R. M. The Role of the Autonomic Nervous System in the Pathophysiology of Obesity. **Front Physiol**, v. 8, p. 665, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28966594> >.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 11 ed. Filadélfia, EUA: Elsevier Saunders, 2005. ISBN 0721602401.

HOTAMISLIGIL, G. S. Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. **Immunity**, v. 47, n. 3, p. 406-420, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28930657> >.

HOYDA, T. D.; SMITH, P. M.; FERGUSON, A. V. Gastrointestinal hormone actions in the central regulation of energy metabolism: potential sensory roles for the circumventricular organs. **Int J Obes (Lond)**, v. 33 Suppl 1, p. S16-21, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19363501> >.

HU, P.; ZHANG, W.; XIN, H.; DENG, G. Single Cell Isolation and Analysis. **Front Cell Dev Biol**, v. 4, p. 116, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27826548> >.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of neural science**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 6, p. 2548-56, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15181022> >.

KNIGHT, Z. A.; HANNAN, K. S.; GREENBERG, M. L.; FRIEDMAN, J. M. Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11376, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20613882> >.

KUCENAS, S. Perineurial glia. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 6, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25818566> >.

KUCENAS, S.; TAKADA, N.; PARK, H. C.; WOODRUFF, E.; BROADIE, K.; APPEL, B. CNS-derived glia ensheath peripheral nerves and mediate motor root development. **Nat Neurosci**, v. 11, n. 2, p. 143-51, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18176560> >.

LAZAR, M. A. How obesity causes diabetes: not a tall tale. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 373-5, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15662001> >.

LEE, G. H.; PROENCA, R.; MONTEZ, J. M.; CARROLL, K. M.; DARVISHZADEH, J. G.; LEE, J. I.; FRIEDMAN, J. M. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**, v. 379, n. 6566, p. 632-5, 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8628397> >.

LEE, Y. S.; WOLLAM, J.; OLEFSKY, J. M. An Integrated View of Immunometabolism. **Cell**, v. 172, n. 1-2, p. 22-40, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29328913> >.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2005.

LIEBERMAN, M.; PEET, A. **Marks' Basic Medical Biochemistry**. 5. Filadélfia, EUA: Lippincott Williams & Wilkins, 2017. ISBN 9781496387721.

LIU, Q.; WANG, X.; YI, S. Pathophysiological Changes of Physical Barriers of Peripheral Nerves After Injury. **Front Neurosci**, v. 12, p. 597, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30210280> >.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175-84, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17200717>

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1716210/pdf/JCI0729881.pdf> >.

MANESS, L. M.; BANKS, W. A.; KASTIN, A. J. Persistence of blood-to-brain transport of leptin in obese leptin-deficient and leptin receptor-deficient mice. **Brain Res**, v. 873, n. 1, p. 165-7, 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10915826> >.

MILLER, A. M.; ASQUITH, D. L.; HUEBER, A. J.; ANDERSON, L. A.; HOLMES, W. M.; MCKENZIE, A. N.; XU, D.; SATTAR, N.; MCINNES, I. B.; LIEW, F. Y. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. **Circ Res**, v. 107, n. 5, p. 650-8, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20634488> >.

MOLOFSKY, A. B.; VAN GOOL, F.; LIANG, H. E.; VAN DYKEN, S. J.; NUSSBAUM, J. C.; LEE, J.; BLUESTONE, J. A.; LOCKSLEY, R. M. Interleukin-33 and Interferon-gamma Counter-Regulate Group

2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 161-74, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26092469> >.

MORTON, G. J.; KAIYALA, K. J.; FISHER, J. D.; OGIMOTO, K.; SCHWARTZ, M. W.; WISSE, B. E. Identification of a physiological role for leptin in the regulation of ambulatory activity and wheel running in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 300, n. 2, p. E392-401, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21062956> >.

MUNZBERG, H.; MORRISON, C. D. Structure, production and signaling of leptin. **Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 13-23, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25305050> >.

MURPHY, K. T.; SCHWARTZ, G. J.; NGUYEN, N. L.; MENDEZ, J. M.; RYU, V.; BARTNESS, T. J. Leptin-sensitive sensory nerves innervate white fat. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 304, n. 12, p. E1338-47, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23612999> >.

MYERS, M. G., JR.; LEIBEL, R. L.; SEELEY, R. J.; SCHWARTZ, M. W. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 11, p. 643-51, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846876> >.

NAGY, A. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. **Genesis**, v. 26, n. 2, p. 99-109, 2000.

O'DEA, K.; ESLER, M.; LEONARD, P.; STOCKIGT, J. R.; NESTEL, P. Noradrenaline turnover during under- and over-eating in normal weight subjects. **Metabolism**, v. 31, n. 9, p. 896-9, 1982. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7121260> >.

ORGANIZATION, W. H. Obesity and overweight. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>, 2017. Acesso em: 20/11/2018.

PAN, C.; CAI, R.; QUACQUARELLI, F. P.; GHASEMIGHARAGOZ, A.; LOURBOPOULOS, A.; MATRYBA, P.; PLESNILA, N.; DICHGANS, M.; HELLAL, F.; ERTURK, A. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. **Nat Methods**, v. 13, n. 10, p. 859-67, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27548807>

<http://www.nature.com/nmeth/journal/v13/n10/pdf/nmeth.3964.pdf> >.

PARKER, J. A.; BLOOM, S. R. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 1, p. 18-30, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22369786> >.

PARMANTIER, E.; LYNN, B.; LAWSON, D.; TURMAINE, M.; NAMINI, S. S.; CHAKRABARTI, L.; MCMAHON, A. P.; JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. Schwann Cell-Derived Desert Hedgehog Controls the Development of Peripheral Nerve Sheaths. **Neuron**, v. 23, n. 4, p. 713-724, 1999.

PARTRIDGE, J. G. Utilizing GCaMP transgenic mice to monitor endogenous Gq/11-coupled receptors. **Front Pharmacol**, v. 6, p. 42, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25805995> >.

PELTOHEN, J.; JAAKKOLA, S.; VIRTANEN, I.; PELLINIEMI, L. Perineurial cells in culture: an immunocytochemical and electron microscopy study. **Laboratory Investigation**, v. 57, n. 5, p. 480-488, 1987.

PELTONEN, S.; ALANNE, M.; PELTONEN, J. Barriers of the peripheral nerve. **Tissue Barriers**, v. 1, n. 3, p. e24956, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24665400> >.

PICELLI, S.; FARIDANI, O. R.; BJORKLUND, A. K.; WINBERG, G.; SAGASSER, S.; SANDBERG, R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. **Nat Protoc**, v. 9, n. 1, p. 171-81, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24385147> >.

PINA-OVIEDO, S.; ORTIZ-HIDALGO, C. The normal and neoplastic perineurium: a review. **Adv Anat Pathol**, v. 15, n. 3, p. 147-64, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18434767> >.

PIRZGALSKA, R. M.; SEIXAS, E.; SEIDMAN, J. S.; LINK, V. M.; SANCHEZ, N. M.; MAHU, I.; MENDES, R.; GRES, V.; KUBASOVA, N.; MORRIS, I.; ARUS, B. A.; LARABEE, C. M.; VASQUES, M.; TORTOSA, F.; SOUSA, A. L.; ANANDAN, S.; TRANFIELD, E.; HAHN, M. K.; IANNAcone, M.; SPANN, N. J.; GLASS, C. K.; DOMINGOS, A. I. Sympathetic neuron-associated macrophages contribute to obesity by importing and metabolizing norepinephrine. **Nat Med**, v. 23, n. 11, p. 1309-1318, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29035364> >.

POPICHAK, K. A.; AFZALI, M. F.; KIRKLEY, K. S.; TJALKENS, R. B. Glial-neuronal signaling mechanisms underlying the neuroinflammatory effects of manganese. **J Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 324, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30463564> >.

PUMMI, K. P.; AHO, H. J.; LAATO, M. K.; PELTONEN, J. T.; PELTONEN, S. A. Tight junction proteins and perineurial cells in neurofibromas. **J Histochem Cytochem**, v. 54, n. 1, p. 53-61, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16087703> >.

REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 11, p. 633-643, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28799554> >.

REINA, M. A.; SALA-BLANCH, X.; ARRIAZU, R.; MACHÉS, F. Microscopic morphology and ultrastructure of human peripheral nerves. In: TUBBS, R. S.; RIZK, E., *et al* (Ed.). **Nerves and Nerve Injuries**. EUA: Academic Press, v.1, 2015. p.700. ISBN 9780124104471.

REINHOLD, A. K.; RITTNER, H. L. Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review. **Pflugers Arch**, v. 469, n. 1, p. 123-134, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27957611> >.

REIS, B. S.; LEE, K.; FANOK, M. H.; MASCARAQUE, C.; AMOURY, M.; COHN, L. B.; ROGOZ, A.; DALLNER, O. S.; MORAES-VIEIRA, P. M.; DOMINGOS, A. I.; MUCIDA, D. Leptin receptor signaling in T cells is required for Th17 differentiation. **J Immunol**, v. 194, n. 11, p. 5253-60, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25917102> >.

RENIER, N.; WU, Z.; SIMON, D. J.; YANG, J.; ARIEL, P.; TESSIER-LAVIGNE, M. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 896-910, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25417164> >.

RICHARD, D. Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity. **Nat Rev Endocrinol**, v. 11, n. 8, p. 489-501, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26122319> >.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. What we talk about when we talk about fat. **Cell**, v. 156, n. 1-2, p. 20-44, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24439368> >.

SANTOS, C. L.; BOBERMIN, L. D.; SOUZA, D. O.; QUINCOZES-SANTOS, A. Leptin stimulates the release of pro-inflammatory cytokines in hypothalamic astrocyte cultures from adult and aged rats. **Metab Brain Dis**, v. 33, n. 6, p. 2059-2063, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30229384> >.

SANTOS, C. L.; ROPPA, P. H. A.; TRUCCOLO, P.; FONTELLA, F. U.; SOUZA, D. O.; BOBERMIN, L. D.; QUINCOZES-SANTOS, A. Age-Dependent Neurochemical Remodeling of Hypothalamic Astrocytes. **Mol Neurobiol**, v. 55, n. 7, p. 5565-5579, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28980158> >.

SAXENA, N. K.; IKEDA, K.; ROCKEY, D. C.; FRIEDMAN, S. L.; ANANIA, F. A. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. **Hepatology**, v. 35, n. 4, p. 762-71, 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11915021> >.

SCHRÖDER, J. M. Inflammatory Neuropathies (Neuritis, Polyneuritis, Vasculitis, Perineuritis; Sarcoidosis). In: (Ed.). **Pathology of Peripheral Nerves**. Berlim, Alemanha: Springer, 2001. p.380. ISBN 978-3-642-56808-4.

SCOTT, M. M.; LACHEY, J. L.; STERNSON, S. M.; LEE, C. E.; ELIAS, C. F.; FRIEDMAN, J. M.; ELMQUIST, J. K. Leptin targets in the mouse brain. **J Comp Neurol**, v. 514, n. 5, p. 518-32, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350671> >.

SEOANE-COLLAZO, P.; FERNO, J.; GONZALEZ, F.; DIEGUEZ, C.; LEIS, R.; NOGUEIRAS, R.; LOPEZ, M. Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. **Endocrine**, v. 50, n. 2, p. 276-91, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26089260> >.

SKAPER, S. D. Impact of Inflammation on the Blood-Neural Barrier and Blood-Nerve Interface: From Review to Therapeutic Preview. **Int Rev Neurobiol**, v. 137, p. 29-45, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29132542> >.

SPELLBERG, B.; EDWARDS, J. E., JR. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 1, p. 76-102, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118387> >.

SRINIVASAN, R.; LU, T. Y.; CHAI, H.; XU, J.; HUANG, B. S.; GOLSHANI, P.; COPPOLA, G.; KHAKH, B. S. New Transgenic Mouse Lines for Selectively Targeting Astrocytes and Studying Calcium Signals in Astrocyte Processes In Situ and In Vivo. **Neuron**, v. 92, n. 6, p. 1181-1195, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27939582> >.

THORP, A. A.; SCHLAICH, M. P. Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome. **J Diabetes Res**, v. 2015, p. 341583, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064978> >.

VAISSE, C.; HALAAS, J. L.; HORVATH, C. M.; DARNELL, J. E., JR.; STOFFEL, M.; FRIEDMAN, J. M. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. **Nat Genet**, v. 14, n. 1, p. 95-7, 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782827> >.

VASANTHAKUMAR, A.; MORO, K.; XIN, A.; LIAO, Y.; GLOURY, R.; KAWAMOTO, S.; FAGARASAN, S.; MIELKE, L. A.; AFSHAR-STERLE, S.; MASTERS, S. L.; NAKAE, S.; SAITO, H.; WENTWORTH, J. M.; LI, P.; LIAO, W.; LEONARD, W. J.; SMYTH, G. K.; SHI, W.; NUTT, S. L.; KOYASU, S.; KALLIES, A. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. **Nat Immunol**, v. 16, n. 3, p. 276-85, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25599561> >.

WADA, N.; HIRAKO, S.; TAKENOYA, F.; KAGEYAMA, H.; OKABE, M.; SHIODA, S. Leptin and its receptors. **J Chem Neuroanat**, v. 61-62, p. 191-9, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25218975> >.

WILLIAMS, T. M.; LISANTI, M. P. The caveolin proteins. **Genome Biol**, v. 5, n. 3, p. 214, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003112> >.

WOODS, A. J.; STOCK, M. J. Leptin activation in hypothalamus. **Nature**, v. 381, n. 6585, p. 745, 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657278> >.

XU, J.; BARTOLOME, C. L.; LOW, C. S.; YI, X.; CHIEN, C. H.; WANG, P.; KONG, D. Genetic identification of leptin neural circuits in energy and glucose homeostases. **Nature**, v. 556, n. 7702, p. 505-509, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29670283> >.

YUAN, X.; CARON, A.; WU, H.; GAUTRON, L. Leptin Receptor Expression in Mouse Intracranial Perivascular Cells. **Front Neuroanat**, v. 12, p. 4, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29410615> >.

ZENG, W.; PIRZGALSKA, R. M.; PEREIRA, M. M.; KUBASOVA, N.; BARATEIRO, A.; SEIXAS, E.; LU, Y. H.; KOZLOVA, A.; VOSS, H.; MARTINS, G. G.; FRIEDMAN, J. M.; DOMINGOS, A. I. Sympathetic neuro-adipose connections mediate leptin-driven lipolysis. **Cell**, v. 163, n. 1, p. 84-94, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26406372> >.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, 1994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236> >.

ZHOU, B. O.; YUE, R.; MURPHY, M. M.; PEYER, J. G.; MORRISON, S. J. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. **Cell Stem Cell**, v. 15, n. 2, p. 154-68, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24953181> >.