

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TESE

**A INFLUÊNCIA DA GRELINA SOBRE O COMPORTAMENTO ANÁLOGO À
ANSIEDADE E A ATIVIDADE DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO E DA AMÍGDALA BASOLATERAL EM
RATOS**

Raoni da Conceição dos Santos

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**A INFLUÊNCIA DA GRELINA SOBRE O COMPORTAMENTO ANÁLOGO À
ANSIEDADE E A ATIVIDADE DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO E DA AMÍGDALA BASOLATERAL EM
RATOS**

RAONI DA CONCEIÇÃO DOS SANTOS

Sob a orientação do Professor

Luís Carlos Reis

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

d237i dos-Santos, Raoni da Conceição , 1989-
A INFLUÊNCIA DA GRELINA SOBRE O COMPORTAMENTO
ANÁLOGO A ANSIEDADE E A ATIVIDADE DE NEURÔNIOS DO
NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO E DA AMÍGDALA
BASOLATERAL EM RATOS / Raoni da Conceição dos-Santos,
- 2019.
140 f. : il.

Orientador: Luís Carlos Reis. Tese (Doutorado). --
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas, 2019.

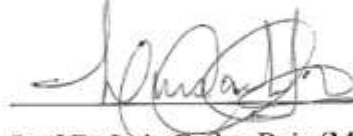
1. grelina. 2. controle da ingestão alimentar. 3.
comportamento análogo à ansiedade. 4. amígdala
basolateral. 5. núcleo paraventricular do hipotálamo.
I. Reis, Luís Carlos, 1952-, orient. II Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

RAONI DA CONCEIÇÃO DOS SANTOS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor **em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em: Fisiologia e Farmacologia.

TESE APROVADA EM 15/02/2019



Prof Dr Luis Carlos Reis (Membro Interno – Orientador - UFRRJ)



Prof Dr Wellington da Silva Côrtes (Membro Interno – UFRRJ)



Prof Dr David do Carmo Malvár (Membro Interno – UFRRJ)



Profª Drª Isis Hara Trevenzoli (Membro Externo – UFRJ)



Prof Dr Danilo Lustrino Borges (Membro Externo – UFS)

“Pobre cultura, a dos países onde se defende a deletéria teoria de que as Universidades e Faculdades devam ser simples fábricas de médicos, engenheiros e advogados”

Thales Martins, 1952

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Edson Cordeiro dos Santos e Márcia da Conceição dos Santos, cujo constante incentivo me permitiu alcançar esse objetivo.

AGRADECIMENTOS

Esta etapa da minha trajetória acadêmica se encerra com este documento. E ela não foi fácil. Foi um longo período de uma carga excruciante de trabalho, com poucas perspectivas de futuro profissional e um constante embate com uma fonte inesgotável de frustrações. No entanto, eu sou extremamente grato às dezenas de pessoas que tornaram todo esse caminho possível. Quero agradecer aos meus orientadores Luís Carlos Reis e André de Souza Mecawi, que me acompanham desde o mestrado e aos quais eu atribuo o meu amadurecimento profissional. Quero agradecer também ao professor Alastair Victor Ferguson, da Queen's University, Ontario - Canadá, que me recebeu por um ano em seu laboratório, e a todos os demais profissionais que participaram ativamente deste processo como o Franklin, Raquel, Bruna, Pauline, Kathleen, Vicente, Seu Juca, dentre outros. Quero agradecer também aos professores que apesar de não estarem diretamente ligados à confecção deste documento colaboraram com a minha formação, seja pelas aulas ou pelo exemplo, como os professores Welington, Bruno, Fábio, Anderson e Davi.

Quero agradecer também aos meus pais, a quem dedico esta tese, o mínimo que eu posso fazer para agradecer a tudo que vocês fizeram e fazem é tentar dar um pouco de orgulho de volta. Quero agradecer também à minha noiva, Isabela, eu espero que um dia consiga ser a pessoa que você vê quando olha pra mim. Ainda, quero agradecer aos meus amigos que conseguiram a proeza de me aturar todo este tempo, mesmo quando a minha falta de esperança puxava todo mundo pra baixo, como o Felipe, Renata, Phellipe, Thaís, Mayara, Júlia, Bruna e Wallace. E aos amigos/colegas, com os quais, além do vínculo de amizade existia um vínculo de trabalho, Bruno, Lívia, Verônica, Hanna, Raquel, César, Cláudio, Máyla, Sabrina, Vivi e Evandro. Esta não é, de maneira nenhuma, uma lista exaustiva, quero agradecer também às demais pessoas com as quais convivi nesses últimos quatro anos.

Eu acho que me falta a eloquência necessária para agradecer devidamente a todas as pessoas que eu mencionei. Todos vocês participaram da minha vida nestes últimos anos, e muitos há bem mais tempo que isso. Eu espero que as experiências que a gente dividiu tenham sido valiosas pra vocês assim como foram pra mim.

Finalmente, quero agradecer à CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, que financiou a pesquisa realizada durante todo esse período.

MEMORIAL

Passei minha infância e a maior parte da minha vida em um bairro pobre na periferia de Nova Iguaçu, um município do estado do Rio de Janeiro. Na minha comunidade o conhecimento e o estudo sempre tiveram pouco valor. Por sorte, na minha casa era diferente. Lá em casa, eu tive a influência dos meus pais que desafiaram as condições e as expectativas da região e se formaram professores. Lá em casa, sempre houveram livros, sobre todos os assuntos. Lá em casa, sempre se valorizou o questionamento, a dúvida e a pesquisa. A única coisa que meu pai sempre me exigiu foi que eu tinha a obrigação de ter um título a mais do que ele. Na época isso significava um mestrado. Após o fim da minha educação básica meu objetivo pessoal era conseguir um emprego em que tivesse uma boa condição financeira. Com este objetivo em mente estudei e consegui ingressar em uma instituição pública de ensino superior para estudar engenharia mecânica. Meu flerte com a engenharia durou pouco tempo, em menos de um período abandonei este curso para fazer algo com a qual eu me identificasse de forma mais próxima. Decidi ser professor.

Em seguida, ingressei na Licenciatura Plena em Educação Física na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ. A educação física é um ramo dividido entre duas vertentes filosóficas. Tanto em vista da sua estrutura curricular quanto da atuação profissional, este curso apresenta uma dicotomia entre uma ciência humana e uma ciência biológica. Durante minha graduação tive maior afinidade pelas ciências biológicas, especialmente após o contato com o saudoso professor Pancrácio Esmeraldo, que lecionava as disciplinas de anatomia e fisiologia do exercício. O professor Pancrácio era apaixonado pelo trabalho docente e, apesar de bastante exigente, era amado pela maioria dos alunos. Em virtude da influência deste professor iniciei minha carreira acadêmica como aluno voluntário de iniciação científica no Laboratório de Fisiologia e Desempenho Humano, sob orientação do professor Anderson Luiz Bezerra da Silveira. A linha de pesquisa que abordamos avaliava os efeitos da utilização de diferentes modalidades de alongamento sobre o desempenho em valências físicas relacionadas ao esporte. Além do impacto desta prática sobre os variáveis cardiovasculares como a pressão arterial e a variabilidade da frequência cardíaca. Neste período tive a oportunidade de trabalhar com diversos colegas que influenciaram sobremaneira a minha formação acadêmica como a Andressa Lopes Rocha, a Paula Soares Rodrigues dos Santos e o César Rafael Marins Costa. Apesar da total ausência de recursos financeiros, os trabalhos realizados neste período foram publicados em 2012 na revista Coleção Pesquisa em Educação Física, com o título “EFEITO AGUDO DO ALONGAMENTO BALÍSTICO E AQUECIMENTO SOBRE O DESEMPENHO E RESPOSTA SIMPATO-VAGAL EM SPRINT DE 400 METROS”. Com o passar do tempo, novos alunos ingressaram neste laboratório, dentre eles a Karolyne da Silva Magalhães, Wallace Martins Viana Ribeiro e Welington Vilela de Paula. Nesta época, os alunos mais antigos assumiam uma função de orientação, colaborando na iniciação destes alunos na vida acadêmica. Gosto de pensar que a minha pequena contribuição seja uma parte significativa da formação desses colegas, assim como a contribuição deles foi na minha.

Na UFRRJ os alunos de educação física não tinham contato com a ciência básica que era realizada na instituição. O departamento de ciências fisiológicas (DCFis) tinha, historicamente, uma maioria esmagadora de alunos da medicina veterinária, com pequena

participação de alunos da zootecnia e da biologia, possivelmente porque o curso de medicina veterinária tinha um maior contato com as disciplinas ministradas por docentes deste departamento. Porém, por sugestão do professor Anderson, procurei o DCFis para dar continuidade aos meus estudos. Neste departamento participei de um processo seletivo para ser orientado pelo professor Luís Carlos Reis, com ele adquiri uma bolsa de estudos de iniciação científica, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ. De certa forma fui pioneiro neste departamento, uma vez que fui um dos primeiros alunos de educação física a buscar uma formação em fisiologia básica. Até o fim da minha graduação participei concomitante dos dois grupos de estudos, gerenciando meu tempo entre as atividades pertinentes aos dois laboratórios, além das atividades acadêmicas relacionadas à graduação. No DCFis, acompanhei alunos que estavam no final de seus mestrados ou no começo do doutorado, como a Fabrícia Viana Fonseca, Cláudio da Silva Almeida, Roberto Laureano Melo e Raquel do Nascimento de Souza. Além de colegas que estavam, assim como eu, iniciando sua vida acadêmica como a Lívia Natalino Monteiro, Bruno Paes Leme e Verônica Lopes Menezes. Durante este período fomos expostos à experimentação animal e a diversas técnicas de pesquisa. Especificamente, entrei em maior contato com as avaliações de comportamentos de ingestão de água, alimentos e sódio, e à análises de modelos relacionados à ansiedade e depressão. Além de aprender algumas técnicas cirúrgicas como a estereotaxia.

Ainda durante a graduação, o professor Anderson me ofereceu a oportunidade de ministrar, sob sua tutela, algumas aulas na sua disciplina de fisiologia do exercício para as turmas de educação física. Escolhi as aulas referentes ao sistema cardiovascular, um tema de destaque para mim foi a eletrofisiologia do coração. A eletrofisiologia é um tema extremamente complexo, de forma que um esforço maior é necessário para que ocorra o processo ensino-aprendizagem, no entanto, este foi o meu primeiro desafio no exercício da atividade docente. Apesar da minha inexperiência, a formação adquirida em um departamento voltado para a fisiologia básica me possibilitou ministrar essa aula com um certo grau de sucesso. Em retrospecto, eu mudaria diversos pontos da forma que ministrei essa aula, para tornar o tema menos árido e facilitar o aprendizado.

Em 2013 defendi minha monografia intitulada “Efeitos do Alongamento e Aquecimento Sobre a Variabilidade da Frequência Cardíaca e Desempenho”, apresentando os dados referentes às minhas atividades de iniciação científica no LFDH, sob orientação do professor Anderson, e avaliação dos professores Ricardo Ruffoni e Aldair José de Oliveira. No ano seguinte publicamos estes dados em mais um artigo, “Effects of Pre-Exercise Activities on Progressive Cycling Test Performance and Autonomic Response.” na revista JOURNAL OF EXERCISE PHYSIOLOGY ONLINE. Imediatamente após a graduação ingressei no mestrado em ciências fisiológicas na UFRRJ sob orientação do professor Luís Carlos Reis. Eu, em conjunto com os alunos Fernando Seara, Phelipe Fontanezi Campos Garcia Fontes, Bruno Paes Leme e Carla Franzini, compusemos a primeira turma do programa de pós-graduação em ciências Fisiológicas da UFRRJ. Durante meu mestrado avaliamos os efeitos da angiotensina-1-7 sobre a sede osmótica. Nosso interesse sobre este peptídeo se deu, principalmente, devido a sua possível participação como um modulador endógeno dos efeitos hipertensivos da angiotensina II. Durante o meu mestrado fui auxiliado enormemente pelo professor André de Souza Mecawi, que acabava de ingressar nessa instituição. Defendi meu mestrado em 2015, com a dissertação intitulada “A ANGIOTENSINA-(1-7) ESTÁ ENVOLVIDA NA RESPOSTA À PRIVAÇÃO HÍDRICA?”, aonde fui arguido pela banca composta por meu orientador e pelos professores Emerson

Lopes Olivares e Charles Colin Thomas Hindmarch. Este último um colaborador internacional, portanto a minha dissertação foi escrita em português e inglês e a apresentação foi bilíngue.

Posteriormente, os achados de meu mestrado foram publicados na revista *Experimental Physiology*, com o título “Central angiotensin 1-7 increases osmotic thirst”. Apesar de não ter sido meu primeiro artigo, esse artigo foi um ponto de transição pra mim por alguns motivos. Foi o primeiro artigo publicado como primeiro autor em uma revista indexada pelo pubmed. Em seguida, este artigo foi citado em outra publicação. Pra mim foi uma sensação indescritível saber que alguém teve interesse no trabalho que eu desenvolvi e que eu estava contribuindo para o avanço da ciência. Já fui citado outras vezes desde então, mas ainda acho difícil conciliar a informação de que outras pessoas possam estar interessadas no que eu escrevo.

Em seguida, ingressei em meu doutorado também sob orientação do professor Luís Carlos Reis, com colaboração do professor André de Souza Mecawi. No meu doutorado, estudei os efeitos da grelina, um peptídeo envolvido na expressão da fome, sobre neurônios envolvidos com o controle de eixos neuroendócrinos e com o controle do comportamento análogo à ansiedade em ratos. Bem como o impacto da privação alimentar, um desafio fisiológico que aumenta a grelina plasmática, sobre aspectos comportamentais em ratos. Durante meu doutorado realizei um período de estágio do tipo sanduíche na Queen’s University, em Kingston - Canadá, sob orientação do professor Alastair Victor Ferguson. Um prolífico pesquisador envolvido, principalmente, com a influência de diferentes peptídeos sobre a atividade de neurônios que controlam o metabolismo e a resposta cardiovascular.

Ainda, durante o meu período de pós-graduação realizei o estágio docente em diversas temas nas disciplinas de biofísica, fisiologia e farmacologia, sob a orientação dos diferentes professores do departamento. Esta experiência docente foi de incomensurável valor para a minha formação, acredito que tenha alcançado uma melhora palpável das primeiras aulas ministradas durante o mestrado e as aulas do final do doutorado. Além disso, realizei atividades paralelas dignas de menção, como as colaborações com outros pesquisadores e as diversas participações em congressos. Além da participação na comissão organizadora do “III Symposium Miguel Ozorio de Almeida”. Experiências que contribuíram para minha formação acadêmica.

RESUMO

Dos-Santos, Raoni da Conceição. **A INFLUÊNCIA DA GRELINA SOBRE O COMPORTAMENTO ANÁLOGO À ANSIEDADE E A ATIVIDADE DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO E DA AMÍGDALA BASOLATERAL EM RATOS**. 2019. 140p Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A grelina é um hormônio orexigênico produzido principalmente pelo estômago. Além de seu efeito indutor da fome a grelina também afeta uma série de variáveis fisiológicas como o controle neuroendócrino, a função autonômica e cardiovascular, a resposta ao estresse e os comportamentos análogos à ansiedade e depressão. O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e a amígdala basolateral (BLA) são núcleos encefálicos importantes na integração de diversos dos efeitos da grelina. Para elucidar os efeitos da grelina sobre a atividade de neurônios do PVN nós utilizamos registros eletrofisiológicos extracelulares e intracelulares em fatias de encéfalo *ex vivo*, e observamos que a grelina pode aumentar ou diminuir a frequência de disparos dos neurônios do PVN, porém, os efeitos excitatórios são diretos, enquanto os efeitos inibitórios são indiretos. Verificamos também que a grelina afeta a maioria dos neurônios desse núcleo sejam eles pré-autonômicos, neuroendócrinos parvocelulares ou neuroendócrinos magnocelulares; e que a maioria dos neurônios TRH, CRH e OT do PVN é hiperpolarizada pela grelina. Similarmente, realizamos registros intracelulares de neurônios da BLA e verificamos que a grelina é capaz de aumentar ou diminuir o potencial de membrana de neurônios deste núcleo. Em seguida, analisamos as alterações comportamentais causadas pela privação alimentar, um estímulo fisiológico que aumenta a grelina plasmática, e da administração exógena de grelina sobre os comportamentos análogos à ansiedade e sobre a atividade exploratória. Nestes experimentos verificamos que a privação alimentar diminui o comportamento análogo à ansiedade no labirinto em cruz elevado ($4,55 \pm 0,97$ vs $13,82 \pm 3,02$ %; $p = 0,01$; teste t não pareado) e não altera a atividade exploratória no campo aberto e no campo aberto modificado. No entanto, a grelina não afetou o comportamento análogo à ansiedade no labirinto em cruz elevado. Em conjunto os resultados descritos nessa tese demonstram que a grelina afeta núcleos encefálicos envolvidos com o controle de diversas funções fisiológicas, e provê um substrato neurobiológico para algumas funções deste hormônio. No entanto, não observamos efeitos comportamentais da grelina, o que sugere a necessidade de estudos futuros para elucidar a participação do hormônio nas respostas comportamentais que medeiam a resposta à situações de déficit calórico, como a privação alimentar.

Palavras-chave: grelina, controle da ingestão alimentar, comportamento análogo à ansiedade, amígdala basolateral, núcleo paraventricular do hipotálamo.

ABSTRACT

Dos-Santos, Raoni da Conceição. **THE INFLUENCE OF GHRELIN ON ANXIETY-LIKE BEHAVIOR AND THE ACTIVITY OF PARAVENTRICULAR HYPOTHALAMIC NUCLEUS AND BASOLATERAL AMYGDALA NEURONS IN RATS**. 2019. 140p Thesis (Doctorate in Physiological Sciences). Institute of Biological and Health Sciences, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Ghrelin is an orexigenic hormone produced by the stomach. Additional to its effects on food intake, ghrelin also affects a series of physiological variables, such as the neuroendocrine control, autonomic and cardiovascular function, the response to stress, and anxiety-like and depression-like behaviors. The paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) and the basolateral amygdala (BLA) are brain nuclei involved in the integration of several of ghrelin's effects. To elucidate the effects of ghrelin on the activity of PVN neurons we used extracellular and intracellular electrophysiological recordings in *ex vivo* brain slices and observed that ghrelin may increase or decrease the spike frequency of PVN neurons; however, the excitatory effects are direct while the inhibitory effects are indirect. We also observed that ghrelin affects the majority of neurons in this nucleus, whether they are pre-autonomic, neuroendocrine parvocellular or neuroendocrine magnocellular; and that the most TRH, CRH and OT PVN neurons are hyperpolarized in response to ghrelin. Similarly, we performed intracellular recordings in BLA neurons and showed that ghrelin increases or decreases the membrane potential in neurons in this nucleus. Next, we analyzed the behavioral alterations caused by food deprivation, a physiological stimulus that increases plasma ghrelin, and the exogenous administration of ghrelin on anxiety-like behaviors and exploratory activity. In these experiments we showed that food deprivation decreases anxiety-like behavior in the elevated plus maze (4.55 ± 0.97 vs 13.82 ± 3.02 %; $p = 0.01$; unpaired t test) and does not change exploratory activity on the open field and modified open field. However, ghrelin did not affect anxiety-like behavior in the elevated plus maze. Taken together the results described in this thesis showed that ghrelin affects brain nuclei involved in the control of several physiological functions, thus providing a neurobiological substrate for ghrelin's effects for some functions of this hormone. However, we did not observe behavioral alterations caused by ghrelin, which suggests that future studies are necessary to elucidate the participation of ghrelin on the behavioral responses that mediate the response to situations of caloric deficits, such as food deprivation.

Key words: ghrelin, food intake control, anxiety-like behavior, basolateral amygdala, paraventricular hypothalamic nucleus

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Artigos sobre grelina em indexador das ciências da saúde.	2
Figura 2. Biossíntese da grelina acilada.	3
Figura 3. Influência do PVN sobre a ingestão alimentar.	7
Figura 4. Imagem representativa do aparelho utilizado para registros extracelulares.	26
Figura 5. Diagrama representativo do <i>whole cell patch-clamp</i> .	27
Figura 6. Diagrama representativo das diferentes populações do PVN.	28
Figura 7. Micrografia representativa do posicionamento do PVN sobre a sonda.	31
Figura 8. Registros extracelulares representativos.	32
Figura 9. A grelina afeta a frequência de disparo de neurônios do PVN.	33
Figura 10. Proporção e magnitude das respostas de neurônios do PVN à grelina nas concentrações de 1 (A), 10 (B) e 100 (C) nM.	34
Figura 11. Efeitos da grelina sobre neurônios neuroendócrinos do PVN.	37
Figura 12. Efeitos da grelina sobre neurônios magnocelulares do PVN.	38
Figura 13. Efeitos da grelina sobre neurônios pré-autonômicos do PVN.	39
Figura 14. A figura ilustra traçados representativos de neurônios responsivos à grelina, os insets demonstram os respectivos gráficos de amplificação de RNAm para β -Actina, AVP, OT, CRH, TRH.	40
Figura 15. Identificação biomolecular dos neurônios do PVN. As proporções de resposta à grelina para cada gene (A) demonstram que neurônios TRH e CRH hiperpolarizam em resposta à grelina e que a maioria das despolarizações advém de neurônios que não possuem os transcritos testados. Os dados individuais de neurônio neuroendócrino (B), pre-autonômicos (C) e magnocelulares (D) mostram que o RNAm para AVP é expresso na maioria dos neurônios e que a maioria dos neurônios CRH coexpressam AVP.	41
Figura 16. A grelina altera o potencial de membrana em neurônios da BLA.	42
Tabela I. Comportamentos exploratórios	44
Figura 17. Efeitos da privação alimentar sobre os comportamentos análogo à ansiedade e exploratório.	45
Figura 18. Efeitos da grelina sobre o comportamento análogo à ansiedade.	46

LISTA DE ABREVIACÕES

2DG	<i>2-desoxi-d-glicose</i>
aCSF	<i>Artificial Cerebrospinal fluid</i> – fluído cerebrospinal artificial
ACTH	<i>Adrenocorticotrophic hormone</i> – hormônio adrenocorticotrófico
AGRP	<i>Agouti-related protein</i> – proteína relacionado ao Agouti
AP	Área postrema
ARC	<i>Arcuate Nucleus</i> – núcleo Arqueado
ATP	<i>Adenosine tri-phosphate</i> – Trifosfato de adenosina
AVP	Vasopressina
BBB	<i>Blood-brain barrier</i> – barreira hematoencefálica
BLA	<i>Basolateral amygdala</i> – amígdala basolateral
CB1	Receptor canabinoide do tipo 1
CeL	<i>Lateral portion of the central amygdala</i> – porção lateral da amígdala central
CeM	<i>Medial portion of the central amygdala</i> – porção medial da amígdala central
CRH	<i>Corticotropin releasing hormone</i> – hormônio liberador de corticotropina
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i> – fluido cerebrospinal
CVOs	<i>Circunventricular organs</i> – órgãos circunventriculares
EPM	<i>Elevated plus maze</i> – labirinto em cruz elevado
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> – ácido γ-aminobutírico
GH	<i>Growth Hormone</i> – hormônio do Crescimento
GHRL	Gene produtor de pré-pro-grelina
GHSR	<i>Growth Hormone Secretagogue Receptor</i> – receptor para secretagogos do hormônio do crescimento
GOAT	Grelina O-Acil Transferase
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
icv	Intra-cerebroventricular
LHA	<i>Lateral hypothalamic área</i> – área hipotalâmica lateral
MC3/4R	<i>Melanocortin type 3/4 receptor</i> – receptores para melanocortina do tipo 3/4

mOF	<i>Modified Open Field</i> – campo aberto modificado
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário
OF	<i>Open Field</i> – campo aberto
OT	Ocitocina
POMC	Pró-opio melanocortina
PVN	<i>Paraventricular nucleus</i> – núcleo paraventricular do hipotálamo
SFO	<i>Subfornical organ</i> – órgão subfornicial
TRH	<i>Thyrotropin releasing hormone</i> – hormônio liberador de tireotrofina
TSH	<i>Thyroid stimulating hormone</i> – hormônio tireoestimulante
α -MSH	<i>α melanocyte stimulating hormone</i> – hormônio estimulador de melanócitos do tipo α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Vias para ação central da grelina	4
1.2 A grelina e o PVN	6
1.2.1 A grelina e o PVN: efeitos sobre a atividade neuronal	9
1.2.2 A grelina e o PVN: Efeitos sobre a ingestão alimentar e metabolismo	10
1.2.3 A grelina e o PVN: Efeitos sobre eixos neuroendócrinos	13
1.3 Os efeitos da grelina sobre os comportamentos análogos à ansiedade e depressão	18
2 HIPÓTESES	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Animais	24
4.2 Eletrofisiologia	25
4.2.1 Registros extracelulares	25
4.2.2 Registros intracelulares	26
4.3 PCR de célula única	28
4.4 Experimentos comportamentais	29
4.4.1 Campo Aberto	29
4.4.2 Campo Aberto Modificado	30
4.4.3 Labirinto em Cruz	30
4.5 Análise estatística	30
5 RESULTADOS	32
5.1 Registros extracelulares	32
5.2 Registros intracelulares	35
5.3 Experimentos comportamentais	45
6 DISCUSSÃO	49
6.1 Efeitos da grelina sobre neurônios do PVN	49
6.2 Efeitos da grelina sobre a atividade de neurônios da amígdala basolateral	53
6.3 Efeitos da grelina sobre o comportamento análogo à ansiedade	55
7 CONCLUSÕES	59
7.1 Significância e perspectivas	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
Anexo A – Artigo publicado na revista <i>Frontiers in Cellular Neurosciences</i>.	
Anexo B – Artigo submetido à revista <i>Annals of the New York Academy of Sciences</i>.	

1 INTRODUÇÃO

O encéfalo monitora constantemente a disponibilidade de substratos energéticos no corpo, ajustando o comportamento ingestivo, as alterações de níveis plasmáticos de diversos hormônios e do gasto energético como necessário para manter o estado metabólico (YI; TSCHÖP, 2012). O trato gastrointestinal participa da regulação da ingestão alimentar, uma vez que secreta diversos hormônios como a colecistocinina, polipeptídeo insulino-trópico glicose-dependente, oxintomodulina, peptídeo YY, peptídeo análogo ao glucagon tipo 1, peptídeo análogo ao glucagon tipo 2 e a grelina, que além de seus efeitos periféricos também comunicam ao encéfalo a disponibilidade nutricional (CÔTÉ et al., 2014). O encéfalo, por sua vez, integra a informação proveniente destes hormônios com pistas visuais, olfatórias e gustativas, controlando a ingestão alimentar e o metabolismo energético (MORTON et al., 2006). Interessantemente, todos os hormônios produzidos pelo trato gastrointestinal inibem a ingestão alimentar, exceto a grelina.

A grelina, um hormônio produzido principalmente pelo estômago, é o ligante endógeno do receptor para secretagogos do hormônio do crescimento (*growth hormone secretagogue receptor* – GHSR), tendo em vista essa ação de liberação do hormônio do crescimento o hormônio recebeu o seu nome que deriva da palavra *ghre* (radical de origem da palavra *growth*, crescimento em inglês) (KOJIMA et al., 1999), desde então a grelina tem sido um tema amplamente estudado, gerando milhares de trabalhos na literatura científica (**Figura 1**). A grelina afeta uma vasta gama de funções fisiológicas, como: a estimulação da motilidade no trato gastro-intestinal e da secreção ácida gástrica; modulação do sono; regulação do metabolismo da glicose; regulação da termogênese no tecido adiposo marrom; modulação da resposta ao estresse e no comportamento análogo à ansiedade; proteção contra atrofia muscular; e melhora da função cardiovascular (MÜLLER et al., 2015). No entanto, seu efeito mais notório é a indução da ingestão alimentar.

O primeiro artigo a relacionar a grelina à ingestão alimentar e metabolismo energético demonstrou que a administração periférica crônica de grelina em camundongos induziu um aumento da adiposidade, decorrente de uma diminuição da utilização de lipídeos como substratos energéticos, sem alterações do gasto energético total, da atividade locomotora e da ingestão alimentar após 24 horas; e que esses efeitos foram independentes da liberação de hormônio do crescimento (*Growth Hormone* – GH) (TSCHÖP et al., 2000). Adicionalmente,

os autores demonstraram que o jejum aumenta enquanto a realimentação diminui os níveis plasmáticos de grelina, e que o enchimento do estômago com água não afeta os níveis plasmáticos de grelina (TSCHÖP et al., 2000), isto indica que a grelina plasmática flutua em função do estado alimentar e que o enchimento do estômago *per se* não é um indutor da liberação de grelina, uma vez que o enchimento com água não afeta a liberação de grelina.

Contrariamente ao encontrado em administrações periféricas, a administração crônica intra-cerebroventricular (icv) de grelina induziu um aumento dose-dependente da ingestão alimentar, aliado aos supracitados aumentos do peso corporal e da adiposidade em ratos (TSCHÖP et al., 2000). No mesmo ano, outros autores demonstraram que a administração tanto central quanto periférica de grelina induz aumento da ingestão alimentar após quatro horas (WREN et al., 2000). Ou seja, o aumento da ingestão alimentar induzido pela grelina está restrito às primeiras horas após a administração e é compensado por uma diminuição em períodos mais longos, de forma que não há alterações após 24 horas. Em seguida, demonstrou-se que uma única administração icv de grelina aumenta a ingestão alimentar de forma dose-dependente e aumenta a expressão de c-FOS – um marcador de atividade neuronal – em núcleos envolvidos com a regulação da ingestão alimentar como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e núcleo arqueado (ARC) (NAKAZATO et al., 2001).

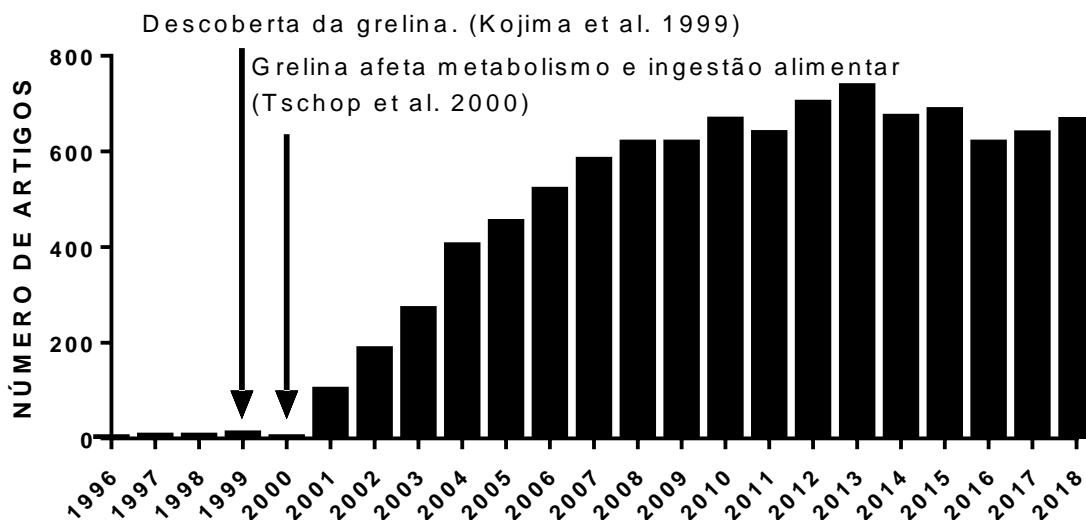


Figura 1: Artigos sobre grelina em indexador das ciências da saúde. Número de artigos no site www.pubmed.com, que contenham a palavra “Ghrelin” no título, no resumo ou nas palavras-chave, até o fim de 2018. As menções anteriores a 1999 são atribuídas a artigos tratavam do GHSR.

O gene da preprorelina (GHRL) produz pró-grelina, um pró-hormônio que inclui a grelina e a obestatina. A pró-grelina é acilada pela enzima grelina O-acil-transferase (GOAT); em seguida a pró-grelina é clivada, gerando diferentes peptídeos que são secretados para a circulação periférica (**Figura 2**) (RIOUX, 2016). Somente a forma acilada da grelina é capaz de atuar sobre o GHSR, uma vez que a des-acil grelina não apresenta afinidade por esse receptor (HOSODA et al., 2000). No sangue, o radical acil é prontamente removido por esterases (DE VRIESE et al., 2004; SATOU et al., 2010) e, conseqüentemente, a maior parte da grelina plasmática está na forma des-acil, que possui algumas funções fisiológicas apesar da falta de um receptor descrito (FERNANDEZ et al., 2016a, 2016b; STARK et al., 2016). O GHSR é um receptor ligado à proteína G α 11/Gq11 que age pelas vias do inositol 3-fosfato / proteína cinase C (FERRINI et al., 2009) e do monofosfato cíclico de adenosina / proteína cinase A (KAGEYAMA et al., 2011; MALAGÓN et al., 2003). Adicionalmente, o GHSR apresenta uma alta atividade constitutiva (HOLST et al., 2003; LÓPEZ SOTO et al., 2015), o que indica uma atividade independente de ligante que pode mediar algumas funções do sistema da grelina. O GHSR é expresso principalmente no encéfalo e adenoipófise (GUAN et al., 1997), com menor expressão em outros tecidos como pâncreas, adrenais, tireoide e miocárdio (MÜLLER et al., 2015). Por quase duas décadas, a grelina foi conhecida como o único hormônio indutor de fome (MÜLLER et al., 2015), até a recente descoberta da asprosin, um hormônio orexigênico proveniente do tecido adiposo (DUERRSCHMID et al., 2017).

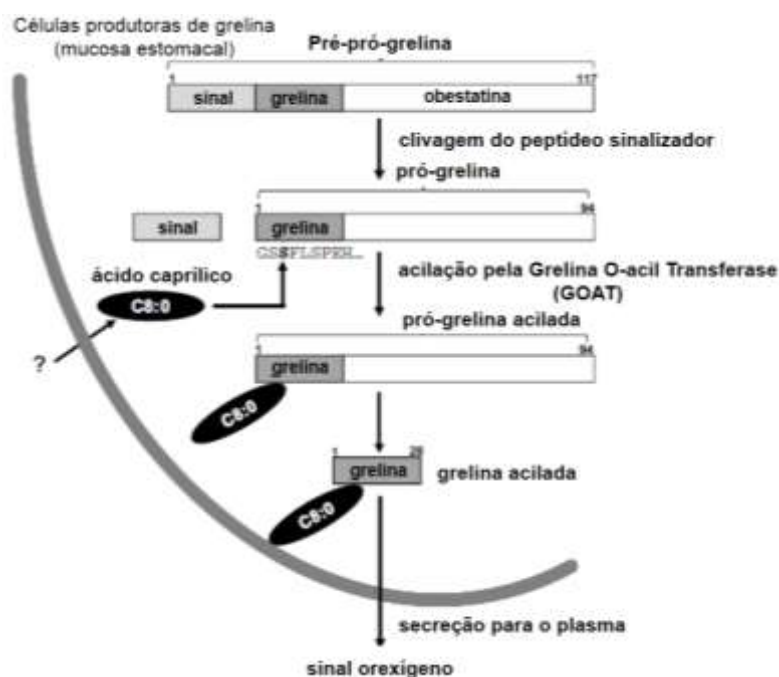


Figura 2. Biossíntese da grelina acilada. Nas células oxínticas do estômago a grelina é produzida como um pró-hormônio, que é acilado e clivado, para produção da forma ativa da grelina. Modificado de Rioux, et al. 2016.

1.1 Vias para a ação central da grelina

Apesar de centenas de estudos demonstrarem que os efeitos da grelina são mediados por ações no encéfalo, ainda não se tem um consenso sobre o caminho através do qual um hormônio produzido pelo estômago atua centralmente. Uma hipótese é que a grelina atravessa a barreira hematoencefálica (*blood-brain barrier* – BBB) no núcleo arqueado para acionar a circuitaria que modula a ingestão alimentar (MÜLLER et al., 2015). Classicamente, o ARC apresenta duas populações de neurônios que estão envolvidos com o controle da ingestão alimentar: neurônios que expressam a proteína relacionada ao gene *Agouti* (*Agouti-related protein* – AGRP), que induzem a ingestão alimentar, e neurônios que expressam pro-ópio-melanocortina (POMC), que inibem a ingestão alimentar (MORTON et al., 2006). Recentemente, uma segunda população de neurônios orexigênicos foi demonstrada no ARC, neurônios tirosina hidroxilase/dopamina (ZHANG; VAN DEN POL, 2016). Os neurônios AGRP do ARC co-expressam neuropeptídeo Y (NPY) e aumentam sua atividade após a restrição alimentar (HAHN et al., 1998), além disso, os neurônios NPY/AGRP aumentam a ingestão alimentar e induzem comportamentos que permitem a busca e aquisição de comida (APONTE; ATASOY; STERNSON, 2011; KRASHES et al., 2011). O efeito orexigênico da grelina pode ser inibido pelo bloqueio da ação do NPY e do AGRP (NAKAZATO et al., 2001), o que sugere que, pelo menos em parte, o efeito da grelina sobre a ingestão alimentar é dependente da modulação desta via. Diversos estudos corroboram a hipótese de que o ARC participa do efeito da grelina sobre a ingestão alimentar. A administração icv aguda de grelina aumenta o RNAm para AGRP no ARC (KAMEGAI et al., 2000), enquanto a administração crônica aumenta AGRP e NPY no ARC (KAMEGAI et al., 2001). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a grelina aumenta a atividade de neurônios NPY/AGRP e a liberação de ácido γ -aminobutírico (*gamma-aminobutyric acid* – GABA) em neurônios POMC e, consequentemente, diminui a atividade de neurônios POMC (COWLEY et al., 2003). Ainda, a aplicação de grelina após bloqueio farmacológico da ação de NPY e GABA induz despolarização em neurônios POMC (COWLEY et al., 2003). Logo, a grelina aumenta a atividade de neurônios NPY/AGRP no ARC, estes liberam NPY e GABA em neurônios POMC, diminuindo sua atividade, este efeito possivelmente medeia o aumento da ingestão alimentar que ocorre em função da administração de grelina. Adicionalmente, este estudo verificou que a aplicação de grelina diminui as correntes inibitórias pós-sinápticas em neurônios do PVN, em um efeito dependente do NPY, principalmente em neurônios que expressam hormônio liberador de corticotropina (*corticotropin releasing hormone* – CRH),

sem efeito sobre os neurônios que expressam hormônio liberador de tireotrofina (*thyrotropin releasing hormone* – TRH).

Em camundongos, a grelina atravessa a BBB no sentido cérebro-sangue e não no sentido sangue-cérebro (BANKS et al., 2002), o que sugere que o acesso através da BBB é pouco provável, pelo menos nessa espécie. No entanto, estudos mais recentes apresentaram evidências de que a grelina plasmática rapidamente atravessa capilares fenestrados na eminência mediana por difusão passiva, alcançando o fluido cerebrospinal (*Cerebrospinal Fluid* – CSF), e se liga à neurônios presentes no núcleo arqueado (SCHAEFFER et al., 2013). Ainda, os autores demonstraram que a grelina periférica se liga à subpopulações de neurônios NPY e POMC no arqueado e que a privação alimentar aumenta enquanto a realimentação diminui o número de neurônios NPY afetados pela grelina (SCHAEFFER et al., 2013). Ou seja, o estado alimentar parece afetar a capacidade da grelina periférica se ligar a neurônios do ARC. Em camundongos submetidos à supernutrição perinatal, um estímulo que predispõe os animais à desenvolvimento de obesidade na idade adulta, há diminuição da grelina plasmática e resistência aos efeitos da administração periférica de grelina, no entanto, a administração icv não é afetada por esse estímulo (COLLDEN et al., 2015). Os autores demonstraram que essa alteração do efeito orexigênico da grelina se dá por uma diminuição do transporte da grelina através da eminência mediana (COLLDEN et al., 2015). Em ratos submetidos à supernutrição perinatal a grelina plasmática total é diminuída, devido à diminuição da des-acil grelina sem alterações da grelina, e o RNAm para GHSR e GOAT é aumentado no ARC, essas alterações são revertidas no animal adulto. Adicionalmente, o estudo demonstrou que menos grelina se liga a neurônios do PVN após administração periférica, indicando que este estímulo modula a permeabilidade do encéfalo (SOMINSKY et al., 2017). Ainda, demonstrou-se que a grelina administrada perifericamente é internalizada por tanicitos presentes na eminência mediana que transportam a grelina para o CSF, aonde ela rapidamente alcança os núcleo arqueado e em seguida se difunde até a parede do terceiro ventrículo, aonde pode afetar outros núcleos hipotalâmicos, ou seja, a difusão da grelina para o CSF, e conseqüentemente para os demais núcleos que expressam o GHSR, é mais lenta do que sua atuação sobre o ARC (URIARTE et al., 2018).

Outra hipótese é que neurônios em núcleos específicos seriam capazes de sintetizar grelina, que então poderia ser liberada como neurotransmissor. Revisões recentes analisaram essa questão e chegaram a conclusões diametralmente opostas sobre a síntese central de grelina (CABRAL et al., 2017b; EDWARDS; ABIZAID, 2017). Independente da via através

da qual a grelina acessa o sistema nervoso central, efeitos diretos da grelina sobre diversos núcleos encefálicos já foram demonstrados (CABRAL et al., 2017b; EDWARDS; ABIZAID, 2017; MÜLLER et al., 2015). Adicionalmente, mecanismos para efeitos indiretos da grelina sobre o sistema nervoso central já foram propostos, como a atuação através de órgãos circumventriculares (FRY; FERGUSON, 2010) ou de aferentes vagais (DATE et al., 2002, 2005). Órgãos circumventriculares (CVOs) são núcleos encefálicos desprovidos de BBB, portanto, capazes de serem afetados por hormônios circulantes (MIYATA, 2015). CVOs sensoriais, como a área postrema (AP) e o órgão subfornicial (*subfornical organ* - SFO), são afetados por peptídeos plasmáticos e transmitem essa informação para diversos núcleos encefálicos (FRY; FERGUSON, 2010). O SFO é parte da lâmina terminal e enviam projeções eferentes para o ARC e o PVN (PULMAN et al., 2006), através das quais influencia a atividade destes núcleos, enquanto a AP está próxima ao núcleo do trato solitário (NTS), para o qual se projeta (PRICE; HOYDA; FERGUSON, 2008). O GHSR é expresso em ambos o SFO (PULMAN et al., 2006) e a AP (MANI et al., 2014; ZIGMAN et al., 2006) e a grelina afeta neurônios nestes núcleos (CABRAL et al., 2017a; FRY; FERGUSON, 2009; PULMAN et al., 2006). O NTS também recebe projeções de neurônios aferentes vagais, que são influenciados pela grelina periférica (DATE et al., 2002). Ou seja, alterações dos níveis plasmáticos de grelina são sentidas pela AP e por aferentes vagais, ambos os sinais alcançam o NTS que, por sua vez, pode afetar a atividade do PVN, concomitantemente, a grelina plasmática afeta o SFO, que se projeta diretamente para o PVN e o ARC, apresentando uma via indireta pela qual a grelina pode contornar a BBB para atuar sobre núcleos encefálicos.

1.2 A grelina e o PVN

Dentre os núcleos encefálicos envolvidos com o controle da ingestão alimentar, um núcleo de especial interesse é o PVN (**Figura 3**). Os neurônios do PVN podem ser divididos funcional e morfológicamente em três categorias: magnocelulares, parvocelulares neuroendócrinos e parvocelulares pré-autonômicos. Neurônios magnocelulares secretam vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) diretamente na circulação periférica através da neuroipófise (MECAWI et al., 2015), além disso, estudos recentes mostraram que os neurônios magnocelulares apresentam projeções colaterais que se dirigem a núcleos no sistema límbico e estão envolvidos com o controle do comportamento (HERNÁNDEZ et al., 2015, 2016; ZHANG et al., 2016). Neurônios parvocelulares neuroendócrinos produzem

hormônio liberador de tireotropina (TRH), hormônio liberador de corticotropina (CRH) e AVP, que são liberados na eminência mediana e alcançam a adenoipófise aonde influenciam a secreção de hormônio tireoestimulante (TSH) e hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (JOSEPH-BRAVO et al., 2015; KELLER-WOOD, 2015). Os demais neurônios são descritos como pré-autonômicos, estes incluem neurônios que controlam o sistema nervoso autonômico e todas as projeções do PVN para outras regiões do encéfalo (LUTHER et al., 2002; STERN, 2001), possivelmente incluindo os neurônios que inibem a ingestão alimentar.

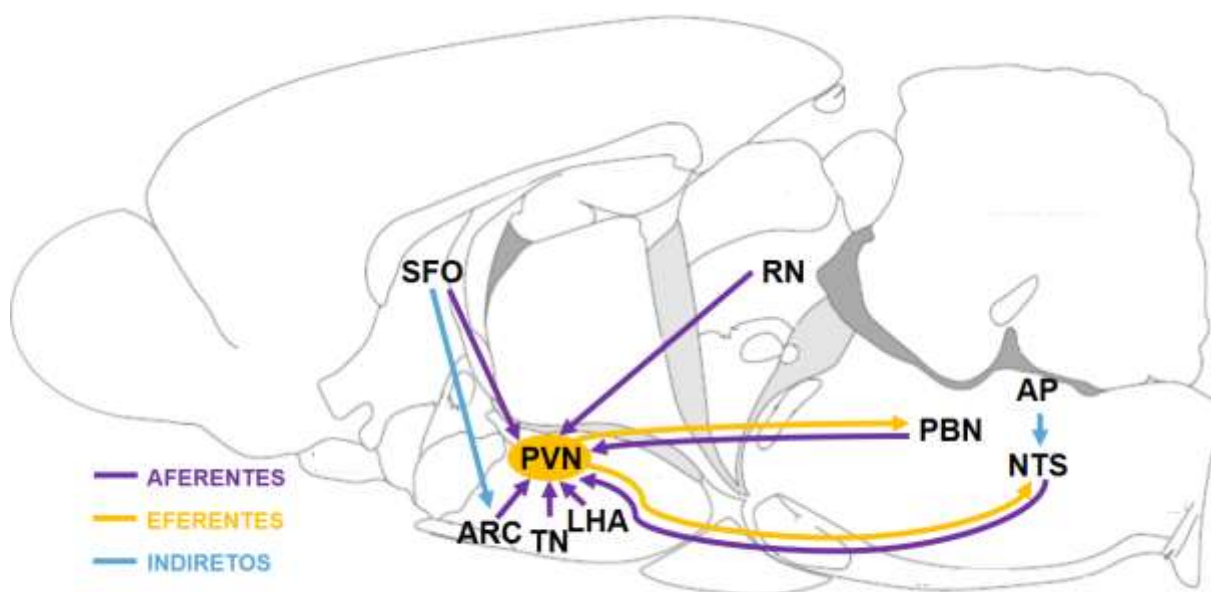


Figura 3. Influência do PVN sobre a ingestão alimentar. O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) está intimamente envolvido com o controle da ingestão alimentar. Este núcleo recebe projeções de diversos núcleos hipotalâmicos, dentre eles o subfornicial (SFO), o arqueado (ARC), núcleo tuberal (TN) e área hipotalâmica lateral (LHA), integra essas informações e envia projeções eferentes para os núcleos parabraquial (PBN) e do trato solitário (NTS), que são os núcleos de saída do controle da ingestão alimentar. Além disso, o PVN recebe projeções dos núcleos da rafe (RN), do PBN e do NTS, que estão envolvidos com a resposta à grelina, além de uma influência indireta mediada pelo SFO e área postrema (AP).

O PVN está implicado no controle da ingestão alimentar, uma vez que lesões bilaterais deste núcleo aumentam a ingestão alimentar e induzem a obesidade, indicando que este núcleo inibe a ingestão alimentar (WANG et al., 2007, 2013). Neste sentido, as projeções tirosina hidroxilase/dopamina (ZHANG; VAN DEN POL, 2016) e NPY/AGRP (XU et al., 2016) do ARC inibem neurônios do PVN. Em contrapartida, neurônios POMC do ARC se projetam ao PVN, a POMC é clivada para α -MSH (*α melanocyte stimulating hormone* – hormônio estimulador de melanócitos do tipo α) que é secretado e ativa receptores para

melanocortina do tipo 3 e 4 (MC3/4), aumentando a atividade de neurônios do PVN e inibindo a ingestão alimentar (SCHWARTZ et al., 2000). Além disso, outros núcleos se projetam para o PVN, como o *nucleus tuberalis lateralis*, um núcleo pouco estudado que se encontra lateral ao ARC no camundongo. Um estudo recente mostrou que neurônios dessa região expressam somatostatina e GABA, se projetam para o PVN, e a estimulação de neurônios dessa região inibe neurônios do PVN e aumenta a ingestão alimentar em resposta à administração de grelina (LUO et al., 2018). Similarmente, neurônios serotoninérgicos da rafe mesencefálica, como os núcleos dorsal da rafe e mediano da rafe, se projetam para o PVN e diminuem a ingestão alimentar (VOIGT; FINK, 2015), o que sugere que estes neurônios aumentam a atividade de neurônios anorexigênicos do PVN. Além disso, o PVN está bidirecionalmente conectado ao núcleo do trato solitário (TER HORST et al., 1989) e ao núcleo parabraquial (SUTTON; MYERS; OLSON, 2016), estas conexões são os supostos alvos dos neurônios anorexigênicos do PVN (MORTON et al., 2006; SCHWARTZ et al., 2000; SUTTON; MYERS; OLSON, 2016). Logo, o PVN tonicamente inibe a ingestão alimentar e integra sinais provenientes de diversas regiões, estas informações aferentes modulam a atividade de neurônios anorexigênicos do PVN de acordo com as necessidades calóricas, aumentando ou diminuindo a ingestão alimentar.

A grelina administrada ICV se liga a GHSRs expressos no PVN (CABRAL; FERNANDEZ; PERELLO, 2013; HARROLD et al., 2008), o GHSR é expresso no PVN (GUAN et al., 1997; HARROLD et al., 2008; MITCHELL et al., 2001; PERELLO et al., 2012; YOKOTE et al., 1998; ZIGMAN et al., 2006) e o PVN recebe projeções aferentes de neurônios que expressam grelina em ratos (COWLEY et al., 2003) e humanos (MENYHÉRT et al., 2006). O *knockdown* de GHSR no PVN diminui o peso corporal sem alterar a ingestão alimentar (SHRESTHA; WICKWIRE; GIRAUDO, 2009). A administração periférica de grelina aumenta a expressão de c-FOS em neurônios do PVN (KOBELT et al., 2005, 2006, 2008; PIRNIK et al., 2011; RÜTER et al., 2003) e também aumenta a atividade neuronal medida por ressonância magnética *in vivo* (KUO et al., 2007; SÁRVÁRI et al., 2014). A administração periférica de anticorpo antigrelina também aumenta a expressão de c-FOS no PVN (SOLOMON; DE FANTI; ALFREDO MARTÍNEZ, 2005), ou seja, tanto a grelina quanto o anticorpo anti-grelina aumentam c-FOS, possivelmente devido a heterogeneidade dos neurônios dessa região. Em hamsters, a administração periférica de grelina aumenta c-FOS no ARC e no PVN, enquanto a administração periférica de grelina e icv de antagonista para GHSR reverte a expressão de c-FOS apenas no PVN (THOMAS; RYU; BARTNESS,

2016), o que sugere diferenças entre os efeitos da administração icv de grelina, uma vez que a expressão de c-FOS no ARC não foi afetada. A grelina icv também aumenta c-FOS no PVN (NAKAZATO et al., 2001; OLSZEWSKI et al., 2007b; SCOTT; MCDADE; LUCKMAN, 2007). Este efeito é mantido na ausência de comida, o que indica que o aumento de c-FOS é dependente da grelina e não da ingestão alimentar (LAWRENCE et al., 2002). No entanto, o efeito da grelina sobre neurônios do PVN pode variar em função de mudanças no estado metabólico uma vez que a privação alimentar potencializa os efeitos da administração icv de grelina sobre a expressão de c-FOS no PVN (SCOTT; MCDADE; LUCKMAN, 2007). Adicionalmente, a administração de grelina diretamente no PVN também aumenta a expressão de c-FOS no próprio PVN, o que sugere efeitos diretos da grelina sobre este núcleo (OLSZEWSKI et al., 2003b).

1.2.1 A grelina e o PVN: efeitos sobre a atividade neuronal

Um estudo eletrofisiológico *in vivo* em ratos demonstrou que a grelina inibe a maioria dos neurônios parvocelulares glicossensíveis do PVN e não afeta os neurônios parvocelulares glicoinsensíveis (CHEN et al., 2005). A grelina também diminui as correntes inibitórias pós-sinápticas de neurônios do PVN em fatias de encéfalo de ratos, um efeito similar à aplicação de NPY e coerente com a ativação de uma via ARC-PVN; essa desinibição ocorre em neurônios CRH PVN, sem alterações nos neurônios TRH PVN (COWLEY et al., 2003). Um estudo conjugou a grelina a um componente fluorescente para verificar os sítios de ligação da grelina. Este estudo verificou que a grelina fluorescente se liga a terminais GABAérgicos no PVN de camundongos e diminui a liberação de GABA de explantes do PVN (CABRAL et al., 2012). Adicionalmente, o aumento de c-FOS induzido por grelina em neurônios CRH PVN é diminuído em camundongos após administração intra-PVN de muscimol, um agonista de receptor GABA-A (CABRAL et al., 2016). Estas observações sugerem que a grelina age pré-sinápticamente em neurônios NPY/GABA do ARC que fazem sinapses com neurônios CRH no PVN diminuindo sua atividade e, conseqüentemente, desinibindo neurônios CRH. Um estudo independente demonstrou que a grelina inibe as correntes excitatórias pós-sinápticas em neurônios parvocelulares do PVN de camundongos, por um mecanismo dependente da ativação de receptores CB1 (KOLA et al., 2008). Estes resultados conflitantes podem ser explicados por estudos posteriores que demonstraram que a grelina é capaz de diminuir ambas as correntes excitatórias e inibitórias pós-sinápticas em neurônios parvocelulares do PVN, e

ambos os efeitos podem ser revertidos por aplicação de antagonistas para CB1 (SORIA-GÓMEZ et al., 2014). Estes resultados implicam o sistema endocanabinoide na regulação intra-PVN dos efeitos da grelina e ressaltam que a grelina pode aumentar ou diminuir a atividade de neurônios do PVN. Adicionalmente, quando as fatias encefálicas são incubadas com grelina por 3-4 horas, os antagonistas para receptores CB1 apenas diminuem as correntes excitatórias, isto é, a atividade inibitória sobre neurônios do PVN prevalece (SORIA-GÓMEZ et al., 2014). Este estudo indica que a modulação dos efeitos da grelina no PVN pelo sistema canabinoide é plástica; no entanto, os dados disponíveis não apresentam o mecanismo ou a relevâncias destas observações, de forma que mais estudos são necessários sobre a relação entre esses dois sistemas.

Interessantemente, a administração periférica de anticorpo para grelina em ratos também aumenta a expressão de c-FOS no PVN (SOLOMON; DE FANTI; ALFREDO MARTÍNEZ, 2005), o que sugere que a grelina pode exercer efeitos excitatórios ou inibitórios sobre diferentes populações de neurônios do PVN. Em resumo, a grelina afeta a atividade de neurônios do PVN, podendo agir pré-sinápticamente para inibir a inibição (COWLEY et al., 2003), a excitação (KOLA et al., 2008) ou ambos (SORIA-GÓMEZ et al., 2014). Os efeitos pré-sinápticos podem ser revertidos por antagonistas CB1 (SORIA-GÓMEZ et al., 2014) ou tri-fosfato de adenosina (*Adenosine tri-phosphate*, ATP) (HAAM et al., 2014; XU et al., 2016). O ATP é provavelmente liberado por astrócitos após liberação dendrítica de AVP (HAAM et al., 2014), essa sinalização retrógrada foi demonstrada em neurônios magnocelulares AVP, no entanto, é plausível assumir que outras populações de neurônios do PVN se comuniquem desta forma.

1.2.2 A grelina e o PVN: efeitos sobre a ingestão alimentar e metabolismo

Diversos estudos demonstraram que a administração de grelina diretamente no PVN aumenta a ingestão alimentar em ratos (BOMBERG et al., 2007; CURRIE et al., 2005, 2010, 2011; MELIS et al., 2002; OLSZEWSKI et al., 2003b; SHRESTHA; WICKWIRE; GIRAUDO, 2004; SZENTIRMAI et al., 2007; TUCCI et al., 2004; WREN et al., 2001). Ainda, a lesão bilateral do PVN potencializa os efeitos orexigênicos da grelina em ratos (WANG et al., 2013), o que sugere que o papel do PVN na resposta à grelina é complexo. Interessantemente, a administração intra-PVN de grelina não afeta a ingestão alimentar em camundongos (CABRAL et al., 2012), estes resultados indicam que podem haver diferenças

entre ratos e camundongos em relação aos efeitos da grelina. Os efeitos da grelina sobre a ingestão de alimentos podem ser alterados por diversos outros sistemas, por exemplo, a administração prévia de melanotan-II, um agonista MC3/4, reverte os efeitos da grelina intra-PVN (OLSZEWSKI et al., 2007a; SHRESTHA; WICKWIRE; GIRAUDO, 2004) e a administração icv de melanotan-II não altera a ingestão alimentar em ratos com lesão do PVN (WANG et al., 2007). Estes resultados indicam que os receptores MC3/4 do PVN antagonizam os efeitos da grelina, no entanto, estudos posteriores demonstraram que a administração de α -MSH, o agonista endógeno dos receptores MC3/4, não diminui a ingestão alimentar induzida por grelina, sugerindo que o PVN não é o alvo primário para integração do α -MSH endógeno com a grelina (OLSZEWSKI et al., 2007a).

O aumento da ingestão alimentar em resposta à grelina intra-PVN pode ser diminuído pela injeção subcutânea de L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase, indicando que a produção endógena de óxido nítrico é necessária para a ação da grelina em neurônios do PVN (ABTAHI et al., 2017). A ingestão alimentar em resposta à grelina intra-PVN também pode ser revertida por administração prévia de urocortina-I (CURRIE et al., 2011) ou antagonistas do receptor Y5 para NPY (MELIS et al., 2002). Similarmente, um estudo demonstrou que a administração de antagonistas para receptor CB1 no PVN também diminuem a ingestão alimentar em resposta à grelina (TUCCI et al., 2004). Um estudo posterior demonstrou que a administração de AM251, um antagonista CB1, diretamente no PVN diminui a ingestão alimentar em animais com alimentação livre e potencializa a hiperfagia induzida por jejum; uma hora após a administração de grelina o AM251 não afeta a ingestão alimentar, porém, quatro horas após administração de grelina o AM251 aumenta a ingestão alimentar (SORIA-GÓMEZ et al., 2014). Ou seja, a participação dos receptores CB1 na ingestão alimentar induzida por grelina é controversa, uma vez que o bloqueio de sinalização do CB1 pode diminuir (TUCCI et al., 2004), aumentar ou não alterar (SORIA-GÓMEZ et al., 2014), a ingestão alimentar induzida por grelina.

Ambos AGRP e grelina aumentam a ingestão alimentar quando microinjetados no PVN, no entanto, quando coadministrados eles não apresentam um efeito aditivo, de forma que os autores sugerem que os efeitos da grelina são dependentes de neurônios AGRP que se projetam para o PVN (SHRESTHA; WICKWIRE; GIRAUDO, 2006). No entanto, o pré-tratamento com grelina no PVN potencializa o efeito orexigênico do NPY (CURRIE et al., 2005, 2011). A administração de grelina no PVN induz ao aumento de ingestão alimentar e ao despertar em ratos, os efeitos sobre o despertar, no entanto, são mais pronunciados após

administração em outras áreas como a área hipotalâmica lateral (*lateral hypothalamic área* – LHA) e núcleo pré-óptico mediano (SZENTIRMAI et al., 2007). Uma vez que neurônios que expressam orexina são expressos principalmente na LHA, estes resultados sugerem que a grelina afeta o circuito orexigênico LHA-PVN. Em suporte à essa hipótese, o GHSR está presente na LHA (HARROLD et al., 2008), a administração de grelina no LHA aumenta a expressão de c-FOS no PVN (OLSZEWSKI et al., 2003a) e a administração de antagonistas para o receptor de orexinas revertem os efeitos da administração de grelina sobre a expressão de c-FOS no PVN (SO et al., 2018).

A administração periférica do anticorpo para grelina diminui a ingestão alimentar em resposta à insulina ou 2-desoxiglicose (2DG), sugerindo que a grelina é necessária para o controle da glicemia. Adicionalmente, os autores implicaram o PVN na modulação destas respostas um vez que a insulina e a 2DG aumentam FOS neste núcleo e o anticorpo para grelina aumenta FOS em neurônios CRH do PVN (SOLOMON; DE FANTI; ALFREDO MARTÍNEZ, 2005). Este estudo indica que a grelina inibe neurônios CRH no hipotálamo, logo, inibindo o estímulo anorexigênico alimentar mediado por estes neurônios. Ainda, a lesão bilateral do PVN aumenta os efeitos da grelina sobre a ingestão alimentar em ratos, o que indica que o PVN participa da resposta ingestiva à grelina (WANG et al., 2013).

Além do aumento homeostático da ingestão alimentar, que é uma resposta à déficits energéticos e regulada principalmente pelo hipotálamo, alguns estudos focaram na alimentação hedônica, que tem maior relação com o sistema de recompensa. Neste sentido, Jewett et al. (2006) destacam que há diferenças entre a sensação de fome e o aumento da ingestão alimentar *per se*, isto é, a ingestão alimentar pode aumentar em animais saciados. Para estudar se a grelina afeta a sensação de fome, eles treinaram ratos à pressionar uma alavanca quando estivessem com fome e demonstraram que a administração intra-PVN de grelina alcança os mesmo efeitos que a privação alimentar por 22 horas. Ainda neste sentido, quando os ratos tem a opção de uma ração normal ou alta em gorduras, o bloqueio farmacológico crônico do GHSR no PVN faz com que os animais ingiram mais da dieta hiperlipídica (PATTERSON et al., 2013a). No entanto, quando as opções eram uma dieta rica em calorias com gosto normal ou uma dieta pobre em calorias porém altamente palatável, a administração icv ou intra-PVN de grelina só aumenta o consumo de dieta rica em calorias (BOMBERG et al., 2007). Estes resultados indicam que a ingestão alimentar induzida por grelina no PVN está relacionada com a reposição calórica e não com o valor hedônico da alimentação.

A administração intra-PVN de grelina também aumenta o coeficiente de troca respiratória, uma forma indireta de medição do metabolismo, indicando que as vias metabólicas privilegiam o uso de carboidratos ao invés de lipídeos (ABTAHI et al., 2018; CURRIE et al., 2005, 2010, 2012), estas respostas possivelmente contribuem para a adiposidade aumentada encontrada após administração crônica de grelina (TSCHÖP et al., 2000). O efeito da grelina sobre o gasto energético é mediado pelo sistema nervoso autonômico simpático, uma vez que a administração icv de grelina inibe a atividade de nervos simpáticos que se projetam para o tecido adiposo marrom (YASUDA et al., 2003). A administração de grelina diretamente no PVN também inibe as projeções simpáticas para o tecido adiposo marrom (MANO-OTAGIRI et al., 2009). Além disso, a grelina também afeta outros parâmetros associados com a atividade do sistema nervoso autonômico. A administração intra-PVN de grelina aumenta a motilidade gastrointestinal, um efeitos que pode ser bloqueado pela coadministração de um antagonista para GHSR (WANG et al., 2015). Ainda, os efeitos da grelina sobre o coeficiente de troca respiratória também podem ser revertidos pela administração de urocortina-I (CURRIE et al., 2011) e serotonina ou agonistas para os receptores 5-HT_{2A/2C} (CURRIE et al., 2010), o que sugere que estes neurotransmissores podem modular a resposta à grelina no PVN. Neste sentido, administração aguda de um agonista para receptor 5-HT_{1a} no núcleo mediano da rafe aumenta o efeito orexigênico da grelina intra-PVN (WAUSON et al., 2015), sugerindo fortemente que neurônios serotoninérgicos reduzem os efeitos da grelina em neurônios do PVN. Os efeitos da grelina sobre o metabolismo energético podem ser prevenidos por administração periférica ou intra-PVN de exendina-4, um análogo do GLP-1 (ABTAHI et al., 2018), sugerindo que o GLP-1 e a grelina apresentam efeitos opostos sobre o metabolismo energético.

1.2.3 A grelina e o PVN: Efeitos sobre eixos neuroendócrinos

Além de sua participação essencial no controle da ingestão alimentar e do metabolismo energético, o PVN também participa no controle de diversos eixos neuroendócrinos, dentre eles o PVN controla a liberação de hormônios do estresse. Neurônios parvocelulares do PVN secretam CRH e AVP na eminência mediana, estes alcançam a adenoipófise e estimulam a liberação de ACTH dos corticotrofos. O ACTH age no córtex das adrenais para aumentar o níveis plasmáticos de glicocorticoides, corticosterona em roedores e cortisol em humanos (KELLER-WOOD, 2015). Os glicocorticoides induzem a utilização de

glicose e a liberação dos estoques de glicose, provendo energia para a resposta a um estressor (SMITH; VALE, 2006). Em humanos a administração de grelina aumenta o ACTH (ARVAT et al., 2001; COIRO et al., 2005, 2011) e o cortisol (ARVAT et al., 2001; COIRO et al., 2011) plasmáticos. A grelina também ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) em roedores, a administração periférica (ASAKAWA et al., 2001) ou icv (WREN et al., 2000, 2002) de grelina aumentam o ACTH plasmático, enquanto a administração periférica também aumenta os níveis de corticosterona (PEKARY; SATTIN, 2012). O efeito estimulatório da grelina sobre o eixo HHA parece ser devido à efeitos centrais, uma vez que a administração de grelina aumenta a liberação de CRH e AVP em explantes hipotalâmicos de ratos (MOZID et al., 2003; WREN et al., 2002). Similarmente, na linhagem de células 4B, que é um modelo de cultura de neurônios do PVN de ratos, a grelina aumenta a liberação de CRH e AVP e o RNAm para estes hormônios (KAGEYAMA et al., 2011). Ainda, na mesma linhagem celular a administração de dexametasona aumenta o RNAm para os genes de preprogrelina e GHSR e a expressão proteica de grelina e GHSR, um efeito que pode ser bloqueado por administração de antagonistas de receptores para glicocorticoides (KAGEYAMA et al., 2012), estes resultados indicam que o aumento de glicocorticoides podem regular a expressão de grelina e GHSR. Em camundongos, tanto a administração icv quanto periférica de grelina aumentam c-FOS em neurônios CRH PVN e os níveis de corticosterona plasmática, independente da ingestão alimentar (CABRAL et al., 2012). Notavelmente, neurônios CRH do PVN de camundongos não expressam GHSR e a grelina parece ativar esses neurônios através da inibição do tônus GABAérgico local independente do ARC (CABRAL et al., 2016). Logo, apesar de os efeitos da grelina sobre o controle da ingestão alimentar exercido pelo PVN serem diferentes entre ratos e camundongos (CABRAL et al., 2012), a grelina consistentemente aumenta a atividade do eixo HHA em ambas as espécies. Adicionalmente, estudos anteriores demonstraram que a grelina também pode inibir neurônios CRH PVN (SOLOMON; DE FANTI; ALFREDO MARTÍNEZ, 2005), estas diferenças podem ser atribuídas à diferentes populações de neurônios do PVN, isto é, neurônios CRH PVN que inibem a ingestão alimentar (WANG et al., 2007) ou neurônios CRH PVN que controlam o eixo HHA (KELLER-WOOD, 2015), podem apresentar respostas diferentes à grelina.

Se por um lado a grelina estimula o eixo HHA, liberando hormônios do estresse, por outro diversos modelos de estresse também afetam a liberação de grelina. A separação materna, um modelo de estresse em neonatos, diminui a glicemia, aumenta a grelina plasmática, diminui o RNAm para CRH no PVN e ativa o eixo HHA. A administração

periférica de antagonista para GHSR reverte parcialmente os efeitos da separação materna sobre todas essas variáveis (SCHMIDT et al., 2006), sugerindo que a grelina participa no aumento da liberação dos hormônios do estresse neste desafio. Em camundongos *knockout* para grelina o aumento nos níveis sanguíneos de ACTH em resposta ao estresse é diminuído (SPENCER et al., 2012), indicando que a grelina endógena é necessária para esta resposta. O estresse crônico de derrota social aumenta a ingestão alimentar, o peso corporal e a grelina plasmática em camundongos (PATTERSON et al., 2013b, 2013a). Estas alterações podem ser revertidas pela administração central de antagonista para GHSR ou em camundongos *knockout* para GHSR (PATTERSON et al., 2013b). Estas observações sugerem que a ativação de GHSR no PVN diminui a liberação de corticosterona durante o estresse crônico. Contrariamente, a grelina aumenta o ACTH após estresse agudo, aumentando a liberação de noradrenalina no PVN (KAWAKAMI et al., 2008), de fato, outros autores demonstraram que os efeitos da grelina em neurônios CRH são possivelmente mediados por aferentes provenientes de outras regiões (CABRAL et al., 2012).

Em resumo, a administração de grelina ativa a resposta endócrina ao estresse (ASAKAWA et al., 2001; CABRAL et al., 2012; WREN et al., 2000) e a grelina plasmática aumenta em resposta ao estresse (HUANG et al., 2017; PATTERSON et al., 2013b, 2013a; SCHMIDT et al., 2006; SPENCER et al., 2012), todavia, os efeitos da grelina sobre a resposta ao estresse dependem do modelo utilizado. A grelina potencializa a liberação de glicocorticoides em resposta ao estresse de restrição (KAWAKAMI et al., 2008; SPENCER et al., 2012) e separação materna (SCHMIDT et al., 2006), enquanto diminui a resposta endócrina ao estresse crônico de derrota social (PATTERSON et al., 2013a). Logo, estes estudos indicam que o estresse agudo aumenta a grelina plasmática que, por sua vez, aumenta ainda mais a resposta endócrina ao estresse, no entanto, durante o estresse crônico os efeitos da grelina mudam, diminuindo a resposta ao estresse (SPENCER et al., 2015). O estresse agudo diminui a ingestão alimentar, movendo a energia disponível da necessidade de consumir comida para a resposta mais urgente de luta ou fuga, contrariamente, durante o estresse crônico psicológico a ingestão alimentar aumenta, especialmente o consumo de alimentos com alta palatabilidade (SOMINSKY; SPENCER, 2014). Esta inversão nos efeitos da grelina sobre a liberação de CRH possivelmente está envolvida com o efeito dual do estresse sobre a ingestão alimentar. Mais estudos são necessários para elucidar a complexa participação da grelina na integração entre o estresse e a ingestão alimentar.

Neurônios parvocelulares neuroendócrinos do PVN secretam TRH na eminência mediana, o TRH então alcança a adenoipófise onde estimula a liberação de TSH pelos tireotrofos. O TSH é liberado na circulação sistêmica e induz a liberação dos hormônios tireoidianos T3 e T4 pela tireoide (JOSEPH-BRAVO et al., 2015). Os hormônios tireoidianos aumentam a atividade metabólica, produzindo calor e aumentando o gasto energético, além de diversos efeitos sobre outros parâmetros fisiológicos como a reprodução, o sistema imune, o desenvolvimento (HULBERT, 2000). A relação entre a grelina e o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide é suportada por observações de que o hipotireoidismo aumenta enquanto o hipertireoidismo diminui a grelina plasmática em ratos (CAMINOS et al., 2002) e humanos (GIMÉNEZ-PALOP et al., 2005). Em humanos, o tratamento de disfunções da tireoide reverte as alterações nos níveis plasmáticos de grelina (GIMÉNEZ-PALOP et al., 2005; RIIS et al., 2003; RÖJDMARK et al., 2005). O aumento da grelina plasmática foi proposto como um mecanismo fisiológico para combater o efeito anoréxico do hipotireoidismo (KOKKINOS et al., 2007). O primeiro estudo a relacionar o eixo da tireoide à grelina em humanos demonstrou que a grelina não altera o TSH plasmático (TAKAYA et al., 2000), no entanto, estudos posteriores demonstraram que a grelina diminui o TSH plasmático (KLUGE et al., 2010, 2013). Em ratos, a administração de grelina diminui o TSH plasmático (KORDI; KHAZALI, 2015; MAHMOUDI et al., 2011; WREN et al., 2000), bem como os níveis de T3 e T4 (KORDI; KHAZALI, 2015; MAHMOUDI et al., 2011). A administração crônica icv de grelina diminui o TSH e o T4, além de alterar a morfologia dos tireotrofos (SOSIĆ-JURJEVIĆ et al., 2009). Em conjunto estes resultados indicam que a grelina e o eixo do TRH são inversamente relacionados, ou seja, que a grelina inibe a liberação de TRH. As alterações dos níveis de TRH após administração de grelina não foram medidos diretamente, porém nos animais privados de alimento a liberação de TRH diminui (JOSEPH-BRAVO et al., 2015) e a administração de leptina – um hormônio indutor de saciedade – aumenta a liberação de TRH (GHAMARI-LANGROUDI et al., 2010; GUO et al., 2004), sugerindo fortemente que a grelina inibe o eixo do TRH.

Neurônios magnocelulares AVP-positivos estão principalmente envolvidos na regulação da resposta a desafios à homeostase hidroeletrólítica, como desidratação e hemorragia. Quando o volume e/ou a pressão sanguíneos diminuem ou a osmolalidade plasmática aumenta o AVP é secretado para a circulação e induz a reabsorção de água nos rins e a constrição de vasos sanguíneos, restabelecendo a homeostase (MECAWI et al., 2015). A administração intravenosa de grelina aumenta os níveis plasmáticos de AVP em humanos

(COIRO et al., 2005). Em ratos, a administração icv de grelina aumenta os níveis plasmáticos de AVP (ISHIZAKI et al., 2002) e a grelina aumenta a liberação de AVP de explantes do hipotálamo (GÁLFI et al., 2016; MOZID et al., 2003; WREN et al., 2002). Estudos anteriores demonstraram diretamente que a grelina aumenta a atividade de neurônios vasopressinérgicos magnocelulares (HAAM et al., 2014). Este aumento induz a liberação sináptica e dendrítica de AVP; por sua vez, o AVP induz a liberação de ATP por astrócitos justapostos ao neurônio, em seguida o ATP liberado pelos astrócitos atua em receptores P2X pré-sinápticos em neurônios GABA no PVN. Esses neurônios, em seguida, liberam GABA em neurônios AVP PVN aumentando a sua atividade em uma alça de retroalimentação positiva (HAAM et al., 2014). Em neurônios magnocelulares AVP, a ativação do receptor GABA-A leva a uma resposta excitatória, devido à alteração do E_{GABA} causada por uma expressão diferenciada de canais para cloreto nestes neurônios (HAAM et al., 2012). Um estudo independente posterior demonstrou que esses receptores P2X pré-sinápticos estão presentes em aferentes provenientes do ARC (XU et al., 2016). Logo, a grelina afeta a atividade de neurônios AVP magnocelulares, aumentando os níveis plasmáticos deste hormônio, possivelmente a grelina está envolvida com uma integração entre as respostas hidrominerais/cardiovasculares e a ingestão alimentar em situações de déficit calórico, como a privação alimentar. Em suporte a esta hipótese, a administração periférica e icv de grelina diminuem a ingestão hídrica em condições basais (HASHIMOTO et al., 2007) e a grelina icv diminui a sede induzida por angiotensina II ou sobrecarga salina (MIETLICKI; NOWAK; DANIELS, 2009). No entanto, os níveis plasmáticos de grelina estão inversamente relacionados à pressão arterial e os efeitos hipotensivos da grelina são possivelmente mediados pela inibição do sistema nervoso simpático (MAO; TOKUDOME; KISHIMOTO, 2016), de forma que estudos posteriores são necessários para elucidar a participação da grelina no controle cardiovascular e hidromineral.

Neurônios OT do PVN secretam OT no sangue; a OT plasmática age na indução do parto e da lactação, mas também está implicado em respostas a desafios ao equilíbrio hidromineral, uma vez que facilitam a liberação de ANP e a natriurese (MECAWI et al., 2015). Adicionalmente, uma subpopulação de neurônios OT do PVN inervam o NTS e induzem efeitos anoréticos (OLSON et al., 1991; PERELLO; RAINGO, 2013), o que indica uma relação entre a grelina e a OT. Em ratos, a administração periférica de grelina aumenta os níveis plasmáticos de OT (PEKARY; SATTIN, 2012) e a administração icv aumenta c-FOS em neurônios OT PVN (OLSZEWSKI et al., 2007b). Em culturas de células hipotalâmicas, a grelina aumenta a liberação de OT e estes efeitos podem ser bloqueados por antagonistas de

GHSR (GÁLFI et al., 2016). A estimulação elétrica gástrica, um tratamento para obesidade que ativa neurônios relacionados à saciedade no hipotálamo, aumenta a expressão de OT em neurônios magnocelulares do PVN e núcleo supraóptico, ao mesmo tempo que diminui a expressão de grelina no mesmo núcleo (ZHANG et al., 2008). Neurônios do núcleo supraóptico são similares funcional e estruturalmente à neurônios magnocelulares do PVN, e a grelina diminui o *input* excitatório para estes neurônios (YOKOYAMA et al., 2009), o que sugere que a grelina inibe neurônios neste núcleo. Assim como no caso dos neurônio CRH PVN as diferentes respostas de neurônios OT do PVN podem ser hipoteticamente atribuídas à diferentes populações de neurônios neste núcleo respondendo de forma diferente à grelina. Em humanos, a administração intravenosa de OT diminui a grelina plasmática (VILA et al., 2009) e não influencia o aumento de GH, prolactina, ACTH e cortisol em resposta à administração de grelina (COIRO et al., 2011). Manipulações dos níveis de grelina em camundongos fêmea prenhes alteram a composição corporal, início da puberdade e maturação sexual da prole (TORRES et al., 2018). Ainda, os níveis de grelina variam durante a prenhez e a lactação em vacas, que são mais suscetíveis à privação alimentar quando prenhas (CHOUZOURIS et al., 2018). Logo, a grelina plasmática possivelmente se altera durante a prenhes e a lactação, o que pode sugerir uma relação entre a grelina e a OT na função reprodutiva.

1.3 Os efeitos da grelina sobre os comportamentos análogos à ansiedade e depressão

A ansiedade é uma emoção relacionada à comportamentos de aferição de risco que acontece em situações de ameaça potencial, como um contexto novo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). A ansiedade é uma resposta fisiológica envolvida com a sobrevivência, uma vez que permite que os animais evitem situação de perigo (GRAEFF, 2007). Em situações que a exploração do ambiente é necessária para a sobrevivência, o estímulo para explorar tem que sobrepujar o estímulo pra se manter em segurança, logo a ansiedade é diminuída (DIETZE et al., 2016). Neste contexto, estudos anteriores demonstraram que a fome diminui a ansiedade (GENN et al., 2003; INOUE et al., 2004; MANISCALCO et al., 2015; MARTIN-IVERSON; STEVENSON, 2005). Ratos submetidos à restrição alimentar (GENN et al., 2003; INOUE et al., 2004) ou à um jejum durante a noite (MARTIN-IVERSON; STEVENSON, 2005) diminuem o comportamento análogo à ansiedade no labirinto em cruz elevado. Ainda, o jejum durante a noite (MANISCALCO et al., 2015) ou a privação alimentar (MARTIN-IVERSON; STEVENSON, 2005) também diminuem o reflexo de sobressalto. Logo, o balanço energético negativo diminui a ansiedade.

Adicionalmente, estudos anteriores ressaltaram que o balanço negativo de energia poderia induzir um aumento da atividade locomotora, induzindo uma falsa observação de efeitos sobre a ansiedade quando o labirinto em cruz elevado é utilizado, e sugerem que o efeito da privação alimentar sobre a atividade locomotora deve ser analisado (MANISCALCO et al., 2015).

A grelina aumenta em resposta a déficits calóricos (DRAZEN et al., 2006; WREN et al., 2001), possivelmente, a alteração da grelina plasmática possa participar na redução da ansiedade encontrada após privação alimentar. Neste sentido, os efeitos da grelina sobre o comportamento análogo à ansiedade são controversos. A administração periférica (ASAKAWA et al., 2001) ou icv (ASAKAWA et al., 2001; CARLINI et al., 2002) de grelina aumentam o comportamento análogo à ansiedade. A administração de grelina diretamente a núcleos encefálicos como o ARC (BROCKWAY et al., 2016a; CURRIE et al., 2012) ou o PVN (BROCKWAY et al., 2016a; CURRIE et al., 2012; WAUSON et al., 2015) também aumentam o comportamento análogo à ansiedade e um antagonista de GHSR reverte parcialmente esses efeitos (BROCKWAY et al., 2016a). Se o rato for submetido à administração de agonista 5HT1a no núcleo mediano da rafe antes da administração de grelina no PVN, os efeitos ansiogênicos são revertidos enquanto os efeitos orexigênicos são aumentados (WAUSON et al., 2015). Estes resultados sugerem que os efeitos sobre a ansiedade e sobre a ingestão alimentar podem estar sob controle de diferentes populações neurais neste mesmo núcleo. Ainda, diferentes núcleos encefálicos podem apresentar diferentes respostas à grelina, por exemplo, a administração de grelina diretamente na amígdala diminui a ansiedade (ALVAREZ-CRESPO et al., 2012). Os efeitos crônicos da administração de grelina também são controversos. Estudos anteriores já demonstraram aumento (HANSSON et al., 2011) ou diminuição (HUANG et al., 2017) dos comportamentos análogos à ansiedade e depressão em ratos. Interessantemente, a dose necessária para aumentar a ansiedade após administração no PVN e no ARC é quatro vezes maior que a dose necessária para induzir a ingestão alimentar (CURRIE et al., 2012). Em camundongos, no entanto, a grelina parece apresentar efeitos ansiolíticos, uma vez que a administração periférica aguda diminui o comportamento análogo à ansiedade (JENSEN et al., 2016; LUTTER et al., 2008), camundongos *knockout* para GOAT são mais ansiosos (STARK et al., 2016) e camundongos *knockout* para GHSR não apresentam diminuição da ansiedade após privação alimentar (LUTTER et al., 2008).

Um núcleo encefálico importante no contexto de controle do comportamento é a amígdala. Este núcleo é parte do sistema límbico e é composto por diferentes subnúcleos com diferentes funções. Dentre estes subnúcleos encontram-se amígdala central, que se divide em duas porções: medial (CeM) e lateral (CeL); a CeL envia projeções inibitórias para a CeM, que é o núcleo de saída do circuito amigdalár no controle da ansiedade (ALLSOP et al., 2014). A amígdala basolateral (BLA), apresenta conexões bilaterais com a amígdala central e com outros núcleos envolvidos na resposta comportamental, como por exemplo o hipocampo e a *stria terminallis*, sendo portanto um núcleo importante para a integração de informações provenientes de vários sistemas (ALLSOP et al., 2014; SHARP, 2017). A BLA é composta majoritariamente por neurônios piramidais glutamatérgicos que se projetam para a amígdala central (ALLSOP et al., 2014). Os diversos efeitos da grelina sobre o comportamento análogo à ansiedade sugerem que a amígdala pode ser um alvo para as ações deste hormônio. Neste sentido, um estudo demonstrou que a grelina reduz as correntes excitatórias pós-sinápticas de neurônios piramidais da amígdala basolateral em fatias de encéfalo *ex vivo* (ALVAREZ-CRESPO et al., 2012). Estes resultados suportam a hipótese de um efeito direto da grelina sobre neurônios da amígdala basolateral, os efeitos da grelina sobre o potencial de membrana destes neurônios, no entanto, não foi medido. Os resultados conflitantes acerca da resposta ansiolítica da grelina ressaltam a complexidade das respostas centrais à grelina e levantam questão sobre a participação da grelina em contextos fisiológicos que aumentam a grelina plasmática, como a privação alimentar ou o estresse.

Como descrito na seção anterior, diferentes modelos de estresse alteram os níveis plasmáticos de grelina e a grelina está relacionada à atividade do eixo HHA. Além da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o estresse também induz aumento dos comportamentos análogos à ansiedade e depressão em roedores (HUANG et al., 2017). Apesar de os efeitos da grelina sobre o comportamento análogo à ansiedade serem controversos em condições basais, após estresse crônico os estudos apontam um efeito ansiolítico e antidepressivo da grelina. A administração icv de grelina diminui a depressão induzida por bulbectomia olfatória bilateral (CARLINI et al., 2012) e o estresse crônico de derrota social é mais eficiente em induzir depressão em camundongos *knockout* para GHSR (LUTTER et al., 2008), o que sugere um efeito antidepressivo da grelina em camundongos. Similarmente, camundongos *knockout* para grelina são mais ansiosos (SPENCER et al., 2012) e os comportamentos análogos à ansiedade e depressão induzidos por um estresse crônico moderado e imprevisível são diminuídos pela administração crônica periférica de grelina (HUANG et al., 2017). Ainda, a administração de

des-acil grelina aumenta a ansiedade em condições basais e diminui a ansiedade após o estresse de restrição (STARK et al., 2016). Estes resultados sugerem que o estresse agudo ativa o eixo do CRH e aumenta a liberação de grelina, em seguida, a grelina aumenta ainda mais a atividade do eixo do CRH e colabora com a indução de comportamento análogo à ansiedade, no entanto, no estresse crônico o efeito da grelina passa a ser de diminuição do atividade do eixo do CRH e dos comportamentos análogos à ansiedade e depressão (SPENCER et al., 2015). Possivelmente, a grelina está envolvida com a manutenção de níveis baixos de ansiedade durante o estresse de privação alimentar, permitindo que o animal busque comida e, portanto, permitindo a sobrevivência.

2 HIPÓTESES

Tendo em vista as informações descritas acima, as hipóteses alternativas testadas no presente trabalho foram:

- i. Que a grelina é capaz de afetar neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo e da amígdala basolateral;
- ii. Que a grelina teria um efeito diferente nas diversas populações de neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo;
- iii. Que a privação alimentar altera o comportamento análogo à ansiedade, sem alterações da atividade locomotora/exploratória;
- iv. Que a administração exógena intraperitoneal de grelina alcançaria efeitos similares à privação alimentar.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Elucidar os efeitos da grelina sobre os núcleos paraventricular do hipotálamo e da amígdala basolateral. Além dos efeitos da privação alimentar e da administração da grelina sobre os comportamentos exploratórios e análogos à ansiedade.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Avaliar os efeitos eletrofisiológicos da grelina sobre neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo;
- II. Correlacionar as respostas à grelina aos diferentes fenótipos neuronais presentes no núcleo paraventricular do hipotálamo;
- III. Elucidar o efeitos da grelina sobre neurônios da amígdala basolateral;
- IV. Aferir a influência da privação alimentar sobre os comportamentos exploratórios e análogos à ansiedade;
- V. Verificar se a grelina periférica alcança efeitos similares à privação alimentar sobre os comportamentos análogos à ansiedade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal do Estado de São Paulo (protocolo: 3408231118) ou da Queen's University (protocolo: Ferguson-2013-032-Or) e estão em consonância com as legislações vigentes nacionais e internacionais. Foram utilizados para realização dos experimentos de eletrofisiologia ratos Sprague-Dawley machos (Charles River, Quebec, Canada), com 25-30 dias de idade e aproximadamente 50-100g. Ratos nesta faixa etária são comumente utilizados para registros eletrofisiológicos uma vez que o acesso é mais difícil em fatias provenientes de animais adultos. No entanto, cabe ressaltar que estes animais ainda não completaram o seu desenvolvimento, de forma que os resultados encontrados podem ser diferenciados em animais na idade adulta. Estes ratos foram mantidos no biotério institucional da Queen's University. Para os demais experimentos foram utilizados ratos Wistar machos, obtidos e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCFis – IB – UFRRJ). Todos os animais foram mantidos em caixas coletivas (contendo 4 animais cada), ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luz acesa entre as 06 e as 18 horas), temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e com acesso *ad libitum* à água e à ração.

Para os experimentos testando os efeitos da privação alimentar, os animais controle (CTRL), mantiveram o acesso à água e comida durante todo o experimento; o grupo privação alimentar (PA) teve a comida removida por 48 horas antes dos experimentos. Este tempo de 48 horas foi utilizado uma vez que um estudo anterior demonstrou que a administração intraperitoneal de 3,5 nmol/kg de grelina alcança níveis similares de concentração plasmática de grelina que a privação alimentar de 48 horas em ratos (WREN et al., 2001). Nos experimentos aferindo os efeitos da grelina sobre o comportamento análogo à ansiedade, ratos foram injetados por via intraperitoneal com 3 doses de grelina (0,35, 3,5 e 35 nmol/kg) ou veículo (NaCl 0,9%), no volume de 1 mL, 20 minutos antes do teste comportamental. A dose de 3.5 nmol/kg induz a alimentação em ratos saciados (RÜTER et al., 2003; WREN et al., 2001), e se correlaciona com seus níveis plasmáticos após 48 horas de privação alimentar (WREN et al., 2001), de forma que esta foi usada como a dose média para a construção de uma curva dose-resposta.

4.2 Eletrofisiologia

Os animais foram decapitados e os encéfalos removidos e imersos em *slicing solution* (87 NaCl, 2,5 KCl, 25 NaHCO₃, 0,5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 25 glicose e 75 sacarose, mM) a 0°C e continuamente aerados com mistura gasosa de 95% O₂/ 5% CO₂. O encéfalo foi *emblocado* e fatias coronais de 300 µm contendo o PVN ou a BLA foram cortadas usando um vibrátomo (VT1000 S; Leica, Nussloch, Alemanha). Em seguida as fatias foram incubadas por pelo menos uma hora a 32° C em fluido cerebrospinal artificial (aCSF) (124 NaCl, 2,5 KCl, 20 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1,3 MgSO₄, 1,24 KH₂PO₄ e 10 glucose, mM), para serem usadas para os registros intracelulares ou extracelulares. Todas as soluções foram preparadas no dia do experimento. A grelina foi comprada da Phoenix Pharmaceutical (Belmont, CA), todos os reagentes do RT-PCR foram comprados da Applied Biosystems (Foster City, CA). E os sais usados para a preparação do aCSF, e soluções intracelular e de corte foram comprados da Sigma Pharmaceuticals (Oakville, Ontario, Canada).

4.2.1 Registros extracelulares

Os registros extracelulares foram feitos em um sistema de multi-eletrodos (MED-64 system; Alpha MED Sciences, Osaka, Japão) (**Figura 4**). O sistema apresenta um arranjo de 8 x 8 eletrodos de 1 mm, com eletrodos de 50 µm² com uma distância de 150 µm entre eletrodos. Os sinais foram obtidos com uma taxa de amostragem de 20 kHz e resolução de 16 bits. As fatias foram colocadas sobre a sonda, submersas em aCSF e mantidas no lugar por uma âncora. O posicionamento correto era aferido com o microscópio e, em seguida, a sonda era conectada ao MED64, no qual um fluxo de 1-2 mL/min de aCSF *carbogenado*, aquecido a 35 °C foi mantido. Após um período de estabilização de 10 minutos, a frequência de disparo média de repouso foi aferida por 5 minutos. Em seguida, a grelina 10 nM foi aplicada por dois minutos e o registro prosseguiu por mais 30 minutos. Canais posicionados sobre o PVN que demonstraram atividade foram considerados para análise. O software Mobius (Alpha MED Sciences, Osaka, Japão) foi utilizado para automaticamente identificar neurônios sendo registrados por cada canal. Potenciais com similaridade maior do que 60% que apareciam um mínimo de 100 vezes foram considerados, os limites de detecção foram colocados acima dos níveis de ruído para cada canal (entre |10| a |15| µV). A frequência de disparo para cada neurônio foi *plotada* em caixas de 30 s. Neurônios foram considerados afetados quando a aplicação de grelina alterava a frequência de disparo em mais de 20% da média do repouso.

Para avaliar se os efeitos da grelina eram diretos ou dependentes de uma ativação anterior de neurônios glutamatérgicos ou GABAérgicos, os efeitos da grelina foram medidos na presença de bicuculina (10 mM) ou ácido kianurênico (10 mM), respectivamente, antagonistas para receptores GABA-A ou de glutamato (LATCHFORD; FERGUSON, 2004). Após 10 minutos de estabilização, a linha de base foi medida por 5 minutos, após os quais o aCSF foi substituído por aCSF contendo os antagonistas. Após 5 minutos de registro com os antagonistas a grelina 10 mM diluída em aCSF com os antagonistas, foi aplicada por 2 minutos e as respostas foram analisadas como descrito anteriormente.



Figura 4. Imagem representativa do aparelho utilizado para registros extracelulares. A câmara de registro do MED-64 foi preenchida com aCSF e continuamente perfundida com mistura gasosa. As fatias de encéfalos foram colocadas sobre a sonda. A sonda possui 64 canais de registro eletrofisiológico que medem alterações de correntes iônicas, causadas pelo disparo de neurônios próximos. Imagem obtida do sítio: <http://www.med64.com/products/med64-basic/>

4.2.2 Registros intracelulares

As pipetas de registro foram manufaturadas com vidro de borossilicato (World Precision Instruments, Sarasota, Florida) puxados em um puxador de micropipetas (P-97; Sutter Instrument, California, Estados Unidos), preenchidas com solução intracelular (125 gluconato de potássio, 10 KCl, 2 MgCl₂, 0,1 CaCl₂, 5,5 EGTA, 10 HEPES, 2 NaATP, e ajustados para um pH de 7,2 com KOH, mM). Micropipetas com resistências 3-5 mΩ foram usadas. Fatias contendo o PVN ou o BLA foram transferidas para a câmara de registro, continuamente perfundidas com aCSF carbogenado, aquecido a 35° C em um fluxo de 1,5-2 mL/min e utilizadas para registro de *whole-cell current clamp* (**Figura 5**). Neurônios foram visualizados em objetiva de imersão x40 montada em um microscópio com óticas de contraste de interferência diferencial (Scientifica, East Sussex, Reino Unido). Um selo de pelo menos 1

$G\Omega$ de resistência foi obtido, uma breve sucção era aplicada para romper a membrana e obter acesso à célula inteira. O registro de célula inteira foi obtido usando um amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, California, Estados Unidos), com uma taxa de amostragem de 10 kHz, filtrada a 2,4 kHz, utilizando uma interface Micro1401 mk II e o software Spike2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) para análise *offline*.

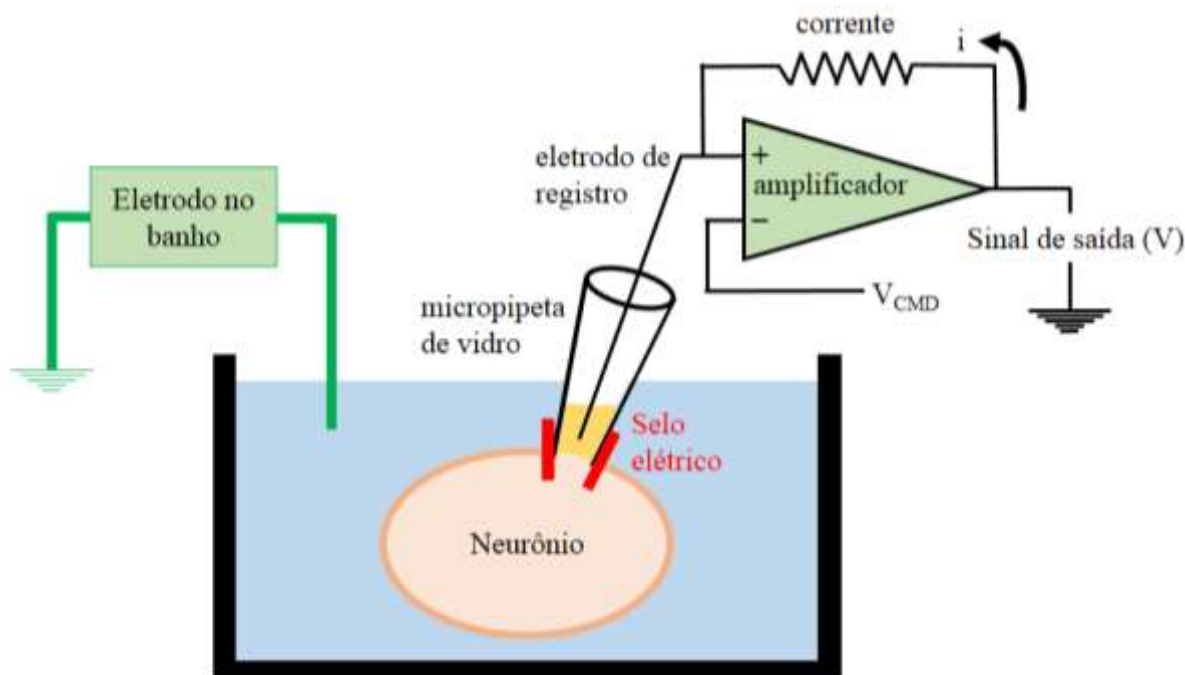


Figura 5. Diagrama representativo do *whole cell patch-clamp*. A micropipeta foi colocada em contato com a membrana dos neurônios de interesse na fatia. A aplicação de pressão negativa rompe a membrana celular e faz com que a solução intracelular presente na micropipeta entre em contato com o meio intracelular. Um eletrodo de registro está em contato com o aparato de registro, permitindo a medição do potencial de membrana da célula.

Os neurônios foram submetidos a um protocolo padrão de pulsos e classificados pelas suas respostas eletrofisiológicas. Neurônios com corrente A, uma corrente transiente de saída, foram classificados como magnocelulares (TASKER; DUDEK, 1991), neurônios com *spikes* de cálcio de baixo limiar foram classificados como pré-autônômicos (STERN, 2001) e neurônios sem características definidas foram classificados como neuroendócrinos (LUTHER et al., 2002) (**Figura 6**). Em seguida, grelina diluída em aCSF foi aplicada ao banho por 2 minutos e as respostas foram registradas até o retorno aos valores de repouso. 100 s imediatamente antes da aplicação da droga e 100 s de efeito máximo foram comparados, os

efeitos foram considerados como significativos quando a diferença entre o início e o máximo era maior que o dobro dos desvios padrões do repouso e 2 mV. Um potencial de junção líquida foi calculado para todos os potenciais de membrana reportados, com uma subtração de 15 mV.

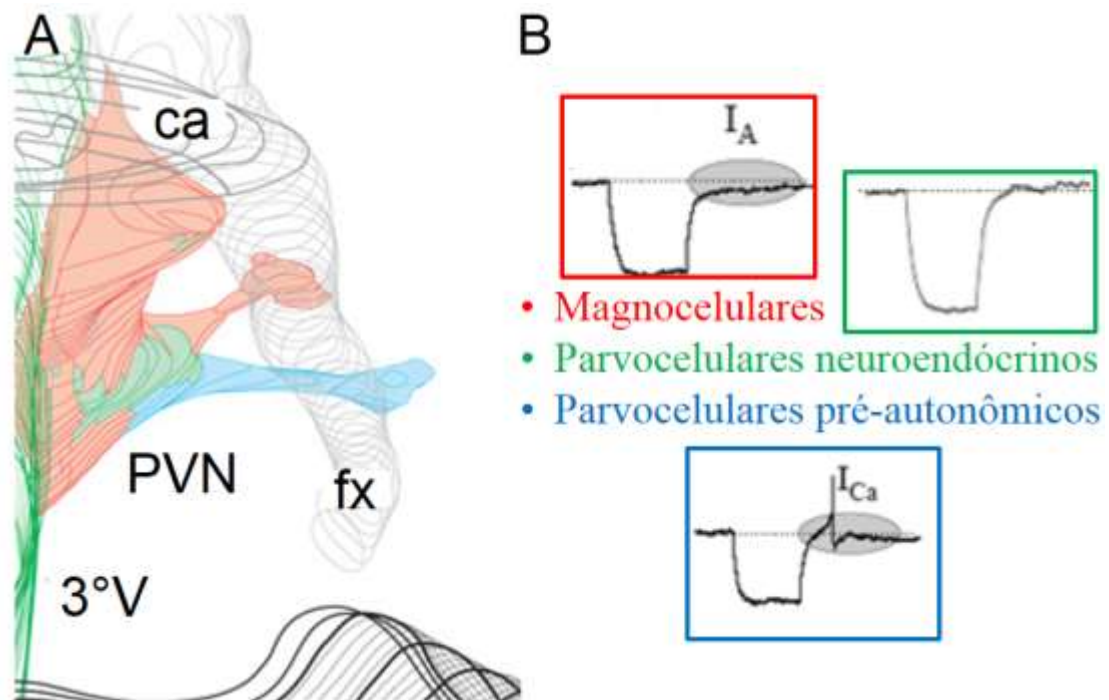


Figura 6. Diagrama representativo das diferentes populações do PVN. A) reconstrução tridimensional da estrutura do PVN, com destaque para as três populações que o compõem. B) representação das correntes características de neurônio magnocelulares, neuroendócrinos e pré-autonômicos. ca = comissura anterior; 3°V = terceiro ventrículo; fx = fórnix; I_A = corrente retificadora de potássio; I_{Ca} corrente de cálcio de baixo limiar; modificado de imagens de: FERGUSON; LATCHFORD & SAMSON (2008); e SIMMONS & SWANSON (2008).

4.3 PCR de célula única

O RT-PCR para célula única foi realizado como previamente descrito (PIRES DA SILVA et al., 2016), resumidamente, imediatamente após o registro eletrofisiológico o conteúdo da micropipeta foi coletado e usado para geração de cDNA com o High Capacity cDNA Reverse transcription kit (Invitrogen), em seguida um estágio de pré-amplificação foi feito (TaqMan Pre-Amp Master Mix Kit, Invitrogen) com as sondas para vasopressina (Rn00566449_m1), ocitocina (Rn00564446_g1), CRH (Rn01462137_m1), TRH (Rn00564880_m1) e β -Actina (Rn00667869_m1). Posteriormente, o RT-PCR foi feito em simplex e triplicata, usando as sondas supracitadas e TaqMan Universal PCR Master Mix kit

(Invitrogen). Todas as reações foram efetuadas de acordo com as recomendações dos fabricantes e β -Actina foi usada como gene controle. Amostras nas quais a β -Actina não estava presente foram excluídas da análise, as remanescentes foram classificadas pela presença ou ausência de RNAm para os genes alvo. O RNAm era considerado como presente quando o limiar de amplificação ocorria antes do ciclo 36.

4.4 Experimentos Comportamentais

Todos os experimentos foram feitos de manhã, entre 8 e 12 horas. Uma vez que neste período os animais normalmente não comem (DRAZEN et al., 2006; TOLLE et al., 2002) e mostram níveis baixos de grelina plasmática (DRAZEN et al., 2006). Os animais foram levados às salas de experimentação comportamental 48 horas antes do experimento para adaptação. Os testes foram gravados e analisados pelo software *Any-Maze software* (V. 5.0, Stoelting Co, Estados Unidos). As arenas foram limpas com álcool 10% entre os animais. Cada animal foi submetido a apenas um teste comportamental.

4.4.1 Campo Aberto

Para aferir o efeito da privação alimentar sobre a atividade exploratória, o campo aberto (OF) foi usado (PRUT; BELZUNG, 2003). Imediatamente antes do ensaio, cada animal foi inserido individualmente no centro de uma caixa de acrílico (80 cm x 80 cm x 30 cm) dividida igualmente em 25 quadrantes distribuídos em três diferentes zonas (central, intermediária e periférica), onde os mesmos podiam explorar o ambiente por 5 minutos ($n = 7$ em ambos os grupos). Nesse protocolo, foi avaliada a distância total percorrida nas zonas central e periférica, o número de *rearings* (levantamento das patas dianteiras pressionadas contra a parede da arena) e episódios de *grooming* (autolimpeza). Neste teste, a atividade locomotora/exploratória é avaliada pela distância total percorrida em todos os quadrantes e pelo número de *rearings*. Por fim, as respostas semelhantes à ansiedade estão ligadas ao tempo de permanência nos quadrantes centrais (MCILWAIN et al., 2001).

4.4.2 Campo Aberto Modificado

Para aferir se a apresentação de alimento alteraria as respostas comportamentais, o campo aberto modificado (mOF) foi utilizado. Este teste utiliza o mesmo aparato do OF, com a adição de uma luz forte (~350 LUX), e uma placa de Petri, contendo ração, no quadrante central, de forma a se juntar um estímulo aversivo e a recompensa da alimentação (DIETZE et al., 2016). O animal foi colocado no canto do campo aberto e todos os parâmetros supracitados foram avaliados, com a adição da incidência de alimentação (controle, n = 12; privação alimentar, n = 13). O aumento da incidência de alimentação pode ser considerado como uma diminuição da ansiedade uma vez que este teste foi validado contra diversas drogas ansiolíticas, os animais com diminuição do comportamento análogo à ansiedade atravessam o ambiente aversivo para interagir com a ração (REX et al., 1998).

4.4.3 Labirinto em Cruz Elevado

A relação entre o OF e a ansiedade já foi questionada (PRUT; BELZUNG, 2003), de forma que, para se aferir com acurácia o comportamento relacionado à ansiedade o OF deve ser usado em conjunto com outros testes como o labirinto em cruz elevado (EPM) (PELLOW et al., 1985). O labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos (50 x 10 cm) cruzados por dois braços opostos fechados com as mesmas dimensões, situados a 40 cm de altura em uma sala com luz vermelha. Os braços são conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). Desse modo, os ratos foram inseridos individualmente na plataforma central da cruz com a cabeça voltada para um dos braços fechados, sendo permitida a exploração do aparato por 5 minutos (controle, n = 11; privação alimentar, n = 12). O tempo gasto nos braços abertos é inversamente proporcional à atividade ansiogênica; e o número de entradas nos braços é um indicador de atividade exploratória (PELLOW et al., 1985). Em seguida, um outro grupo de animais foi submetido à administração intraperitoneal de grelina e após 20 minutos testado no EPM (controle, n = 11; grelina 0,35 nM, n = 11; grelina 3,5 nM, n = 12; grelina 35 nM, n = 11), como descrito acima.

4.5 Análise estatística

Todos os dados estão descritos como média \pm erro padrão da média, e a significância adotada foi de $p < 0,05$. O teste exato de Fisher foi usado para se comparar as incidências de

alimentação no mOF, o teste T de Student foi usado em todas as comparações entre controle e privação alimentar. A análise de variância de uma via com teste *post-hoc* de Tukey foi usada para comparar os efeitos da grelina no EPM. Quanto aos resultados da eletrofisiologia, as proporções de neurônios foram comparadas pelo teste de qui-quadrado; magnitudes foram comparadas com a análise de variância de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni.

5 RESULTADOS

5.1 Registros extracelulares

Uma figura representativa do posicionamento da fatia de encéfalo sobre as sondas de registro está representado na **figura 7A**. E um diagrama de todas as respostas encontradas após aplicação de grelina ao banho está representado na **figura 7B**, o diagrama demonstra que as respostas à grelina não apresentam uma clara distribuição anatômica. Uma análise representativa (**Figura 8**) demonstra um exemplos de 2 canais onde disparos extracelulares foram detectáveis, um registrado na ausência de antagonistas (**Figura 8A**), e outro onde os antagonistas de receptores para GABA e glutamato foram previamente adicionados ao banho (**Figura 8B**). O limiar de detecção foi ajustado individualmente para cada canal para se manter acima do ruído (**Figura 8, A1 e B1**). O *software* detecta diferentes neurônios em cada canal em função do formato do disparo (**Figura 8, A2 e B2**). A frequência de disparo para cada neurônio foi *plotada* em caixas de 30 segundos e a resposta à grelina foi observada (**Figura 8, A3 e B3**). Nestes registros representativos, a aplicação de grelina ao banho aumentou, diminuiu ou não alterou a frequência de disparo em neurônios do PVN (**Figura 8A**), enquanto a aplicação de grelina na presença de antagonistas apenas aumenta ou não altera a frequência da disparo (**Figura 8B**). Na ausência de antagonistas, 48 canais detectaram disparos em 7 fatias, nas quais 1-3 neurônios/canal foram identificados. Um total de 97 neurônios foram registrados, dos quais 29 (30 %) aumentaram a frequência de disparo e 37 (38 %) diminuiram a frequência de disparo; na presença de antagonistas, 27 canais detectaram disparos provenientes de 1-2 neurônios em 2 fatias, totalizando 53 neurônios, dos quais 23 (43 %) aumentaram a frequência de disparo, 30 (57 %) não foram afetados e nenhum neurônio foi inibido pela grelina (0 %) (**Figura 9**). As proporções de neurônios responsivos à grelina foi significativamente diferente na presença ou ausência de antagonistas (qui-quadrado = 27,14, $df = 2$, $p < 0,001$). Estes resultados indicam que os efeitos excitatórios da grelina são diretos e que a sinalização de receptores GABA-A ou para glutamato é necessária para os efeitos inibitórios da grelina.

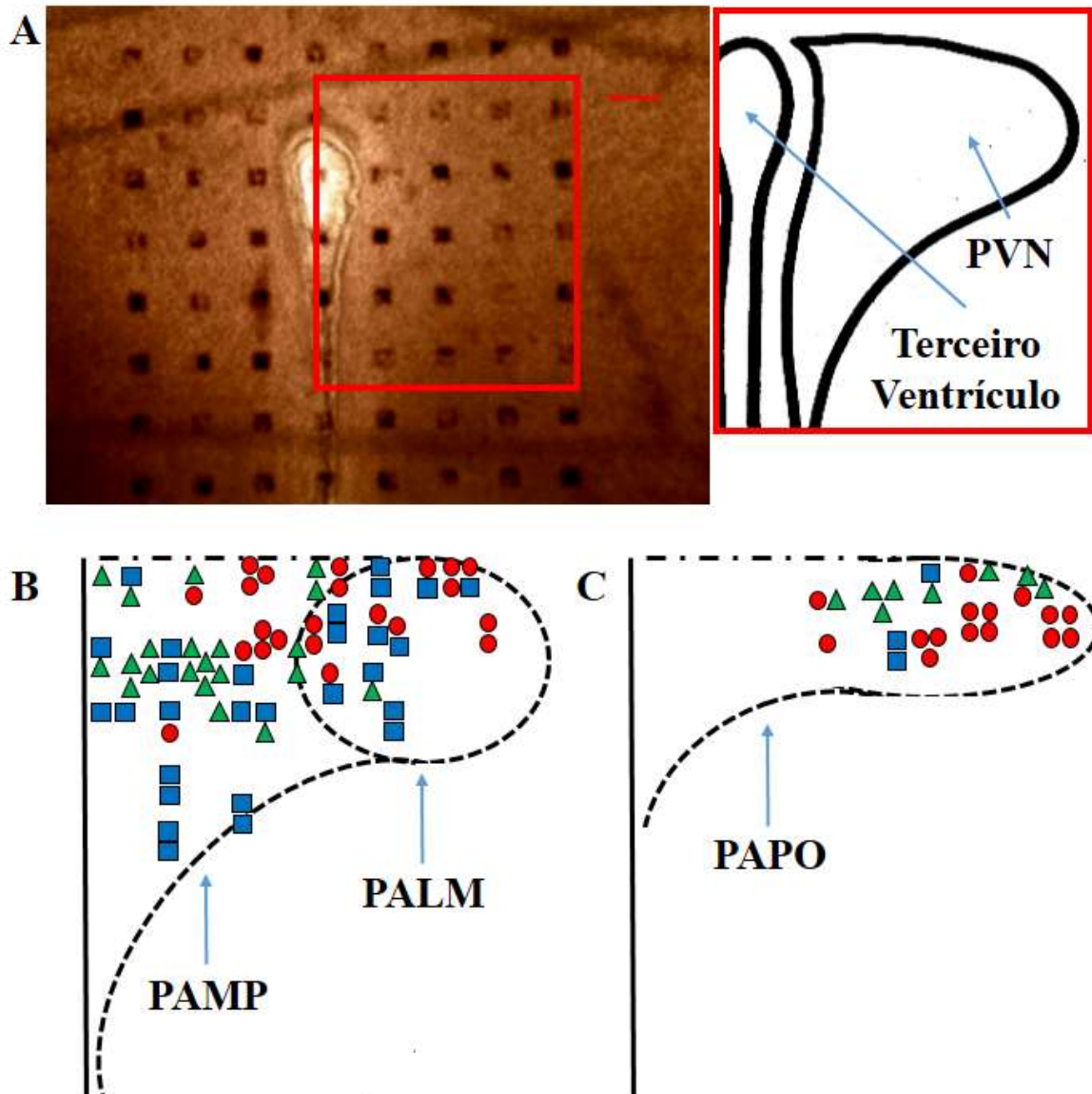


Figura 7. Micrografia representativa do posicionamento do PVN sobre a sonda. A barra representa 100 μm e ao lado se encontra um esquema representativo do núcleo (A). Todas as respostas obtidas após aplicação de grelina 10 nM ao banho são representadas em um diagrama (B, C). Porções do núcleo paraventricular PAMP = medial parvocelular; PALM = lateral magnocelular; e PAPO = posterior parvocelular. Triângulos, quadrados e círculos representam, respectivamente, aumento, não alteração e diminuição da frequência de disparo.

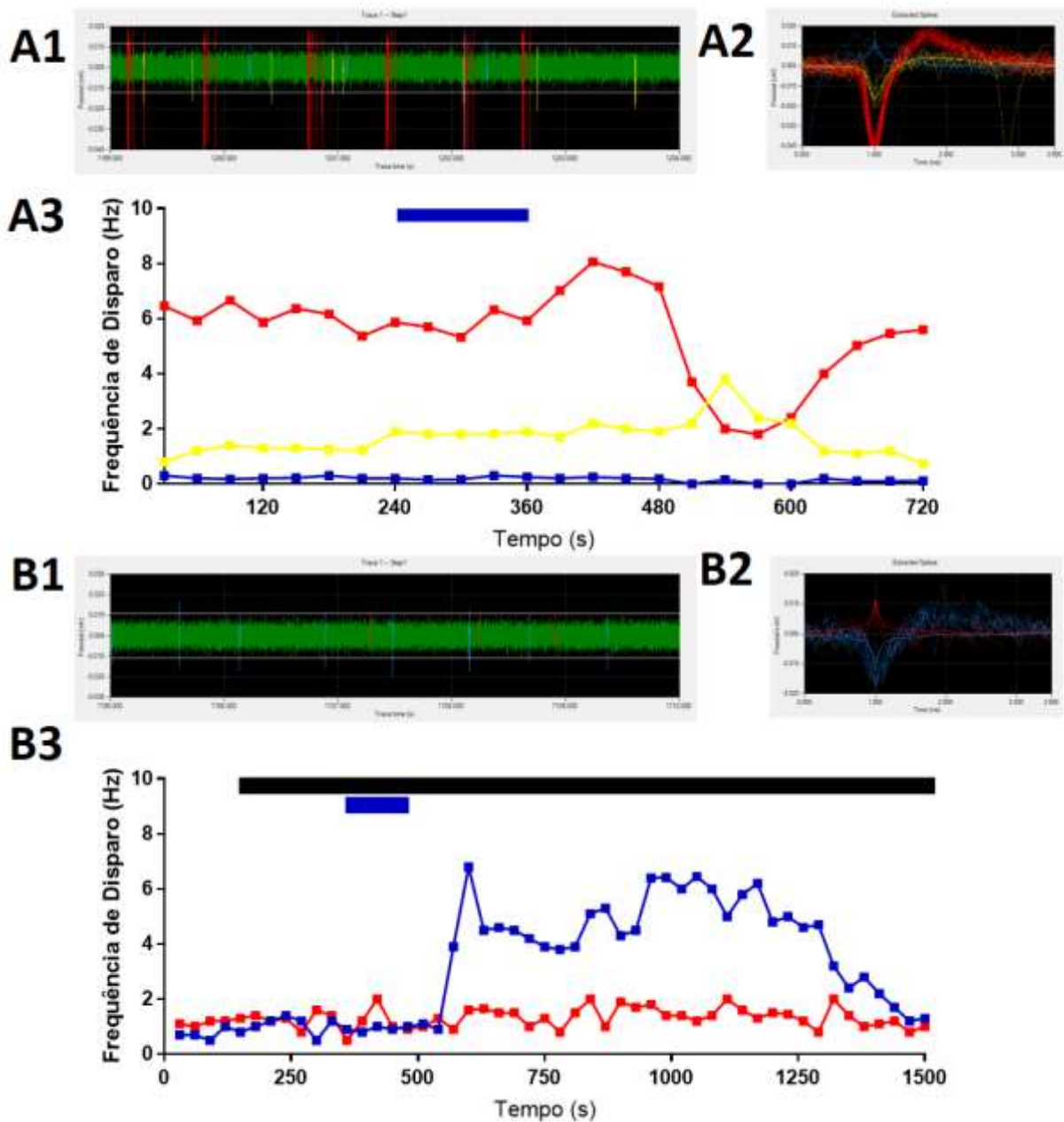


Figura 8. Registros extracelulares representativos. Canais de registro com disparos detectáveis e posicionamento correto foram selecionados para análise. 1 canal é mostrado como representativo (**A**), 3 neurônios foram identificados (**A1**, **A2**) e a aplicação de grelina 10 nM (barra azul) diminuiu (linha vermelha), aumentou (linha amarela) ou não alterou (linha azul) a frequência de disparo (**A3**). Na imagem representativa (**B**) de registros efetuados na presença de antagonistas dos receptores para GABA-A e glutamato (barra preta), dois neurônios foram identificados (**B1**, **B2**) e a aplicação de grelina ao banho aumenta (linha azul) ou não afeta (linha vermelha) a frequência de disparo dos neurônios do PVN (**B3**).

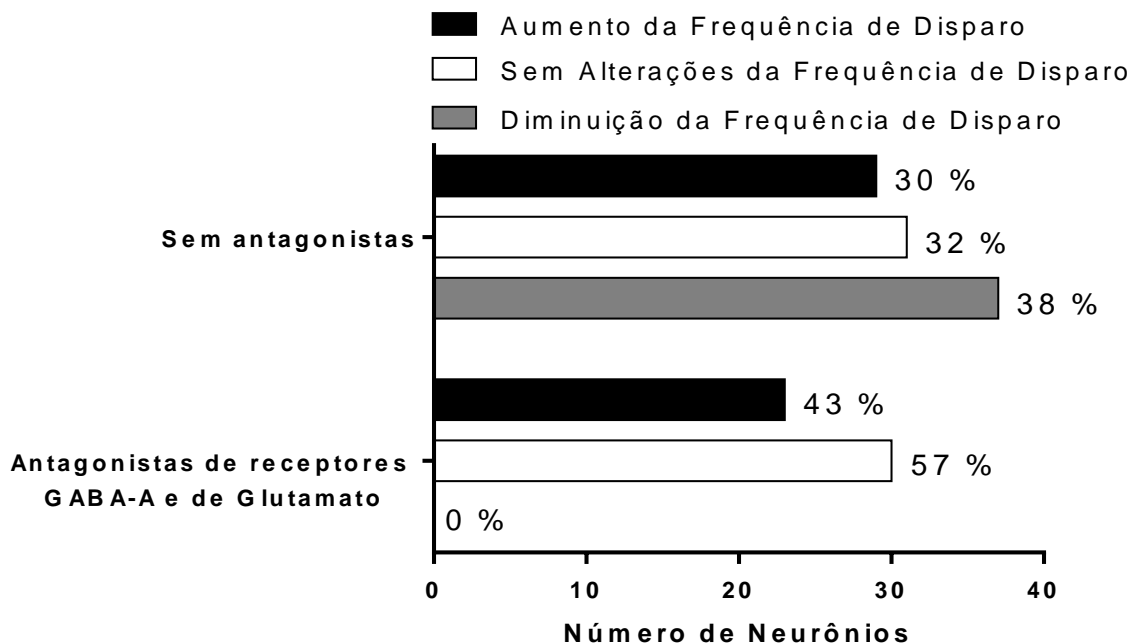


Figura 9. A grelina afeta a frequência de disparo de neurônios do PVN. O sumário dos dados provenientes dos registros extracelulares demonstra que a grelina afeta a maioria dos neurônios do PVN, aumentando ou diminuindo a frequência de disparo, e que após adição de antagonistas para glutamato e GABA-A as diminuições de frequência de disparo não são encontradas.

5.2 Registros intracelulares

Os registros extracelulares demonstram claramente que a grelina é capaz de afetar a frequência de disparo de neurônios do PVN. No entanto, os registros extracelulares não elucidam os efeitos de grelina sobre o potencial de membrana desses neurônios, nem as subpopulações de neurônios que são afetados pela grelina. Para esclarecer essas questões, nós realizamos registros intracelulares de neurônios do PVN pela técnica de *whole-cell patch clamp*. A aplicação de diferentes concentrações de grelina ao banho (1, 10 e 100 nM) também afetou os neurônios do PVN (**Figure 10**, 1 nM: 11 % despolarizaram, 22 % hiperpolarizaram, $n = 9$; 10 nM: 35 % despolarizaram, 30 % hiperpolarizaram, $n = 94$; 100 nM: 39 % despolarizaram, 28 % hiperpolarizaram, $n = 18$). A análise estatística das alterações no potencial de membrana mostrou que as despolarizações [$F_{(2,44)} = 12,89$, $p < 0,001$, ANOVA de uma via] e as hiperpolarizações [$F_{(2,39)} = 16,81$, $p < 0,001$, ANOVA de uma via] foram significativamente diferentes entre as concentrações de grelina; o pós-teste de Tukey demonstrou que todas as concentrações de grelina foram significativamente diferentes entre si

($p < 0,05$). Ou seja, apesar de as proporções de neurônios afetados pela grelina ser similar nas concentrações de 10 e de 100 nM (respectivamente, 65 % e 67 %), a magnitude desta resposta é concentração dependente. Ainda, a proporção de neurônios afetados pela grelina na concentração de 10 nM não foi diferente nos registros intracelulares e extracelulares (qui-quadrado = 1,27, $df = 2$, $p = 0,53$).

Em relação a duração dos efeitos, 1 e 10 nM apresentaram respostas similares (1 nM = 434 ± 250 s vs. 10 nM = 572 ± 312 s, $p = 0,45$, teste t não pareado). A administração de 100 nM induziu uma resposta longa que se manteve até a quebra do selo em 50 % dos neurônios afetados pela grelina (6/12). Os neurônios remanescentes variavam em relação a duração da resposta, com 2 neurônios que se mantiveram por um longo período (1916 e 4024 s) enquanto os demais eram similares às outras concentrações ($499,8 \pm 126,7$ s; $F_{(2,65)} = 1,844$, $p = 0,16$, ANOVA de uma via).

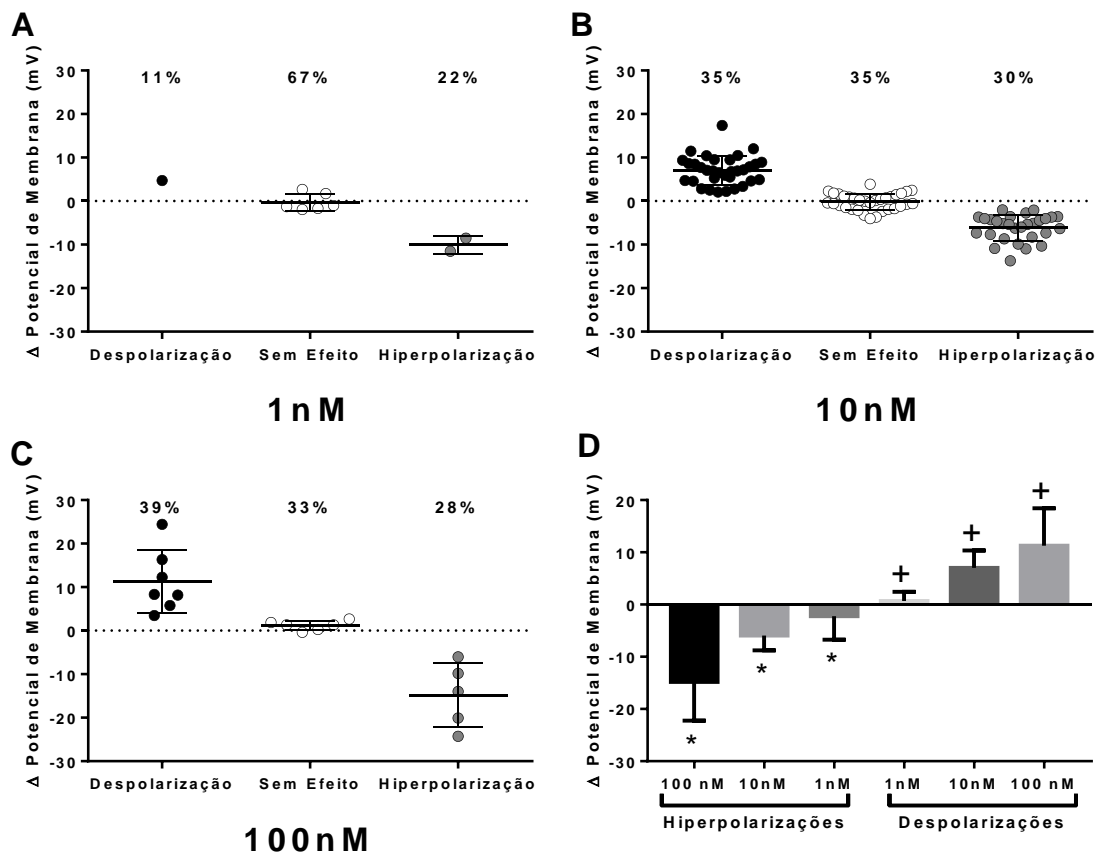


Figura 10. Proporção e magnitude das respostas de neurônios do PVN à grelina nas concentrações de 1 (A), 10 (B) e 100 (C) nM. Concentração-resposta dos efeitos da grelina (D). A grelina afeta os neurônios do PVN em todas as concentrações testadas, e os efeitos são concentração-dependentes. * $p < 0,05$ vs. hiperpolarizações; + $p < 0,05$ vs. despolarizações.

Continuando a análise dos efeitos da grelina a 10 nM, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a duração dos efeitos entre neurônios despolarizados ou hiperpolarizados em resposta a grelina (despolarizados = $572,7 \pm 357,2$ vs. hiperpolarizados = $571,8 \pm 252,8$ s, $p = 0,99$, teste t não-pareado) ou entre diferentes fenótipos (neuroendócrinos = $576,4 \pm 268,6$ s; pré-autonômicos = $601,6 \pm 438,6$ s; magnocelulares = $532,8 \pm 271,3$ s; $F_{(2,59)} = 1,225$, $p = 0,30$, ANOVA de uma via). Estes resultados indicam que dentro da mesma concentração a duração dos efeitos da grelina em neurônios do PVN é consistente, sendo independente do fenótipo ou da resposta.

Os neurônios do PVN despolarizavam, não respondiam ou hiperpolarizavam em resposta à grelina. Nós especulamos que essas diferenças poderiam ser provenientes das diferentes fenótipos neuronais do PVN. Para verificar esta hipótese, nós classificamos os neurônios em função da resposta eletrofisiológica a pulsos hiperpolarizantes, como descrito previamente na literatura (LUTHER et al., 2002; STERN, 2001; TASKER; DUDEK, 1991). Os resultados demonstraram respostas mistas de neurônios neuroendócrinos (29 % despolarizaram, 40 % hiperpolarizaram; **Figura 11**) e magnocelulares (29 % despolarizaram, 21 % hiperpolarizaram; **Figura 12**). A maioria dos neurônios pré-autonômicos despolarizou em resposta a grelina (61 % despolarizaram, 17% hiperpolarizaram; **Figure 13**), sugerindo que nesta população os efeitos da grelina são primariamente excitatórios.

Em conjunto esses dados demonstram que mesmo dentro de subgrupos definidos eletrofisiologicamente, dentro dos quais diferentes fenótipos existem (por exemplo, neurônios magnocelulares vasopressinérgicos ou ocitocinérgicos), existe heterogeneidade na resposta à grelina. Então, para tentar elucidar esta questão, nós fizemos registros adicionais nos quais correlacionamos a resposta eletrofisiológica ao RNAm expresso individualmente em cada neurônio. Coletamos o conteúdo citoplasmático de 74 células, das quais 45 (61 %) foram positivas para β -actina e, portanto, utilizadas para essa análise. Nós realizamos o RT-PCR para 4 transcritos, AVP, OT, CRH e TRH após o registro das respostas à grelina (**Figura 14**). Como ilustrado na **Figura 15A**, esta análise demonstrou que neurônios CRH (3/4) e TRH (4/5) são inibidos pela grelina. Contrariamente, neurônios positivos para AVP (20 % despolarizaram e 40 % hiperpolarizaram, $n = 35$) e para OT (11 % despolarizaram e 44 % hiperpolarizaram, $n = 9$) apresentam respostas mistas à administração de grelina, apesar de neurônios OT apresentarem majoritariamente hiperpolarizações. Interessantemente, neurônios que não apresentavam nenhum dos 4 transcritos testados ($n = 8$) apresentaram a maior porcentagem de despolarizações (50 %), enquanto os demais neurônios não responderam (25

%) ou hiperpolarizaram (25 %). Adicionalmente, nós correlacionamos a expressão de RNAm com a classificação em neurônios neuroendócrino (**Figura 15B**), pré-autônômicos (**Figura 15C**) ou magnocelulares (**Figura 15D**). Estes dados demonstram os resultados inesperados de que AVP é expresso na maioria dos neurônios do PVN (30 / 45). A maioria dos neurônios CRH co-expressam AVP (3/4) e o único neurônio OT que despolariza em resposta à grelina expressa mais AVP que OT (**Figura 14A**).

Ainda, avaliamos a influência da grelina sobre a atividade de neurônios da amígdala basolateral. Estes experimentos demonstraram que 10 nM de grelina despolarizaram (15 / 31, 49 %), não afetaram (10 / 31, 32 %) ou hiperpolarizaram (6 / 31, 19%) os neurônios nesta região (**Figura 16A**). Isto indica que a maioria dos neurônios responsivos à grelina da amígdala basolateral despolarizam, possivelmente sendo um alvo para a grelina central.

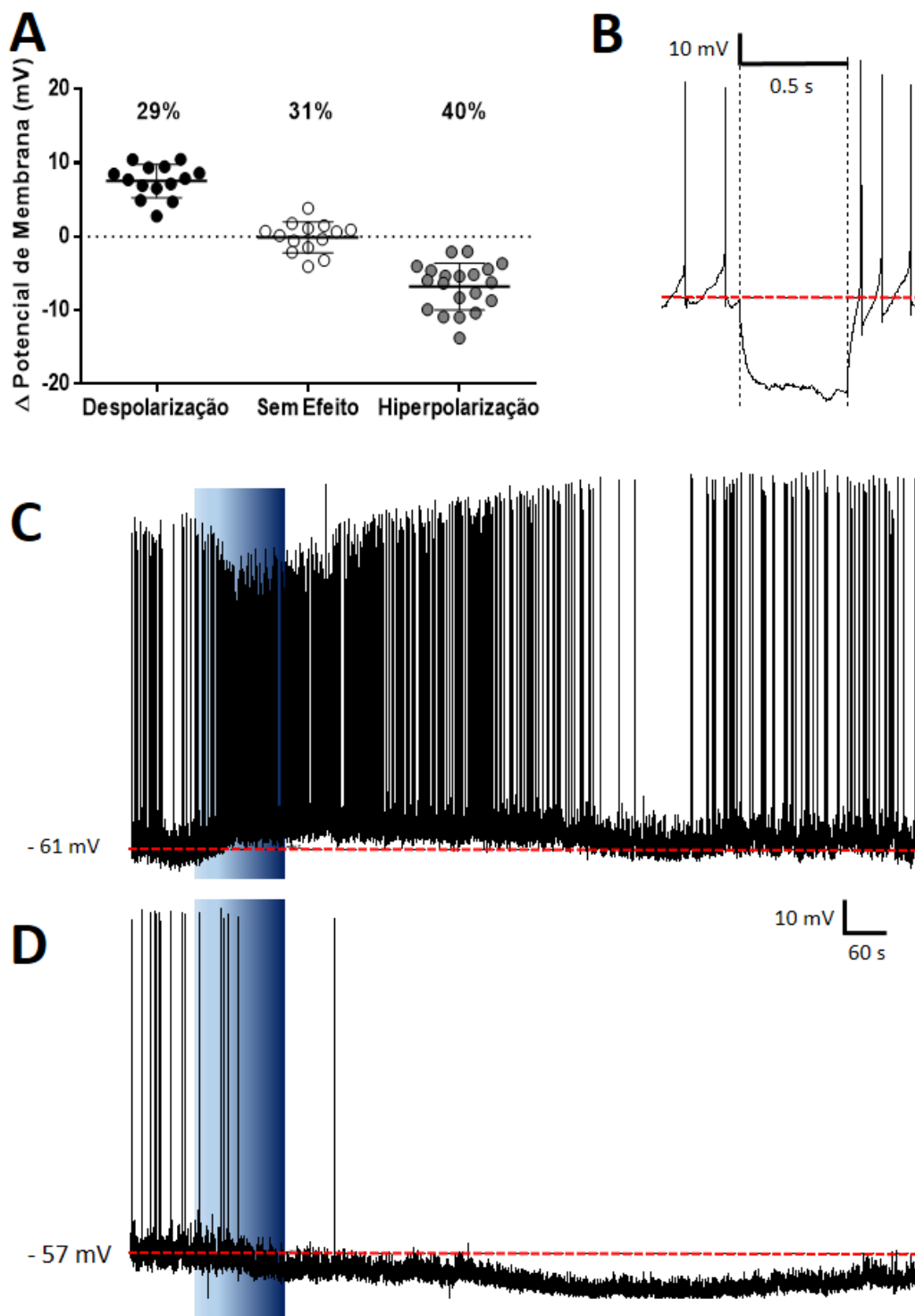


Figura 11. Efeitos da grelina sobre neurônios neuroendócrinos do PVN. A grelina altera o potencial de membrana em neurônios neuroendócrino do PVN (A), com subpopulações de neurônios aumentando ou diminuindo o potencial de membrana em resposta à grelina. Neurônios neuroendócrinos foram identificados pela falta de um padrão de resposta eletrofisiológica à pulsos hiperpolarizantes (B). Traçados representativos de uma despolarização (C) e de uma hiperpolarização (D) são mostrados na figura. O fundo azul indica a aplicação de grelina ao banho, as linhas pontilhadas representam o potencial de membrana basal.

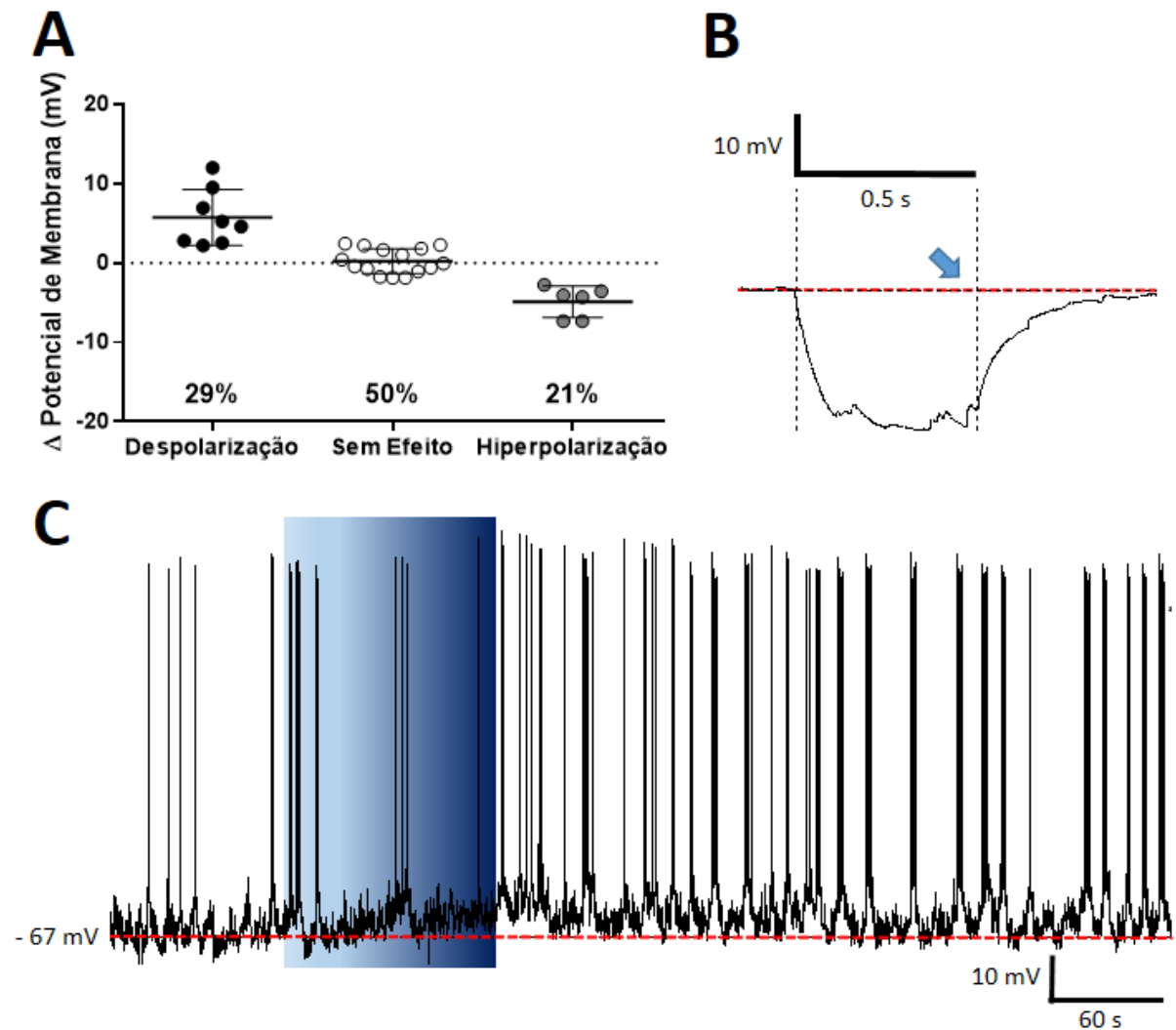


Figura 12. Efeitos da grelina sobre neurônios magnocelulares do PVN. A grelina não afeta a metade dos neurônios magnocelulares, enquanto alguns neurônios despolarizam ou hiperpolarizam em resposta à grelina (**A**). Os neurônios foram definidos como magnocelulares devido à presença da I_A , uma corrente retificadora de efluxo de potássio caracterizada pelo demora no retorno aos valores basais de potencial de membrana após um pulso hiperpolarizante (**B**). Um traçado representativo de um neurônio magnocelular que aumenta o potencial de membrana e a frequência de disparo após a aplicação de grelina está representado (**C**). O fundo azul indica a aplicação de grelina ao banho, as linhas pontilhadas representam o potencial de membrana basal.

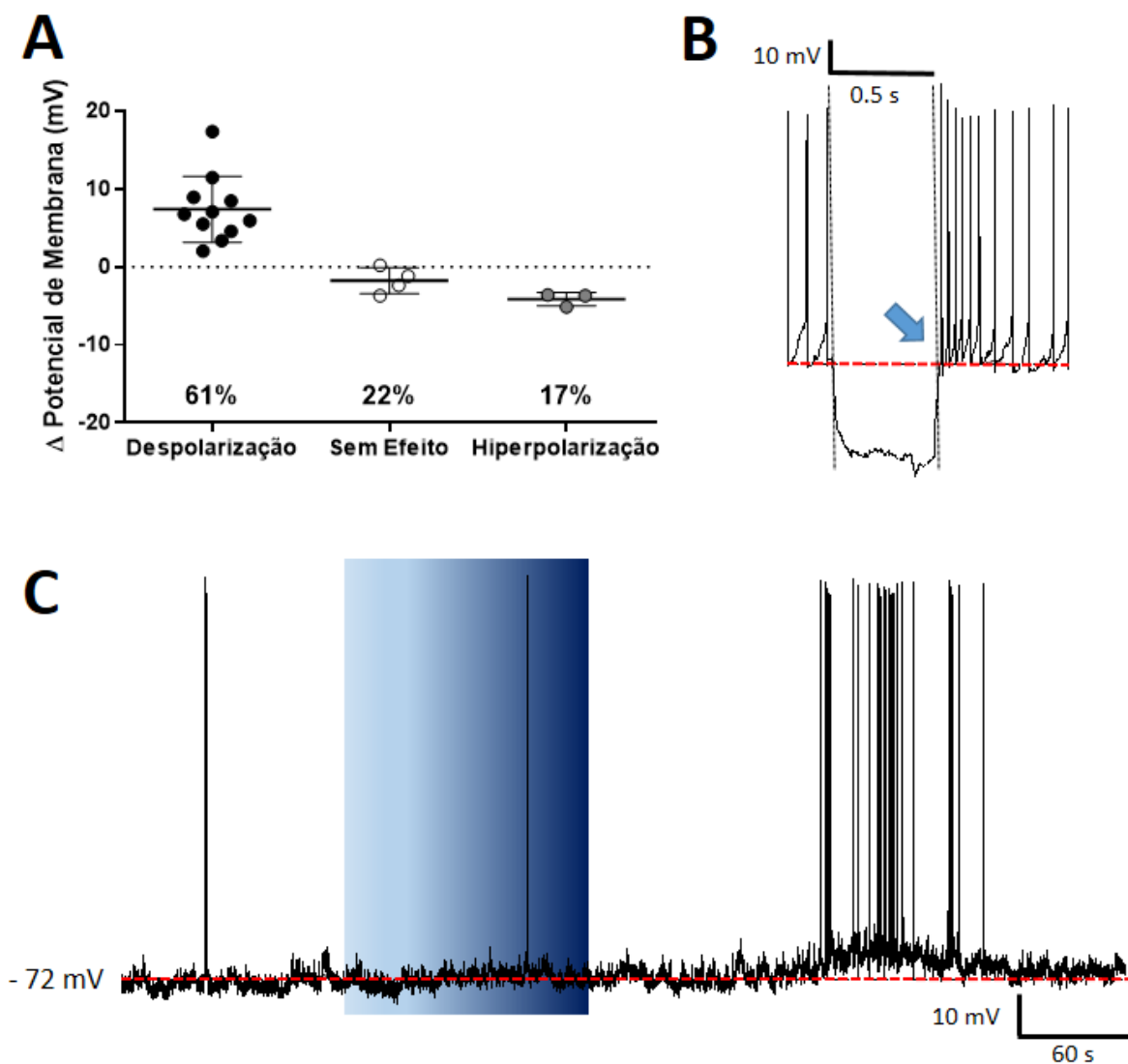


Figura 13. Efeitos da grelina sobre neurônios pré-autônômicos do PVN. A grelina despolariza a maioria dos neurônios pré-autônômicos do PVN (A). Os neurônios foram definidos como pré-autônômicos pela presença de disparos cálcio-dependentes de baixo limiar em resposta a um pulso hiperpolarizante (B), um traçado representativo de uma despolarização é mostrado na figura (C). O fundo azul indica a aplicação de grelina ao banho, as linhas pontilhadas representam o potencial de membrana basal.

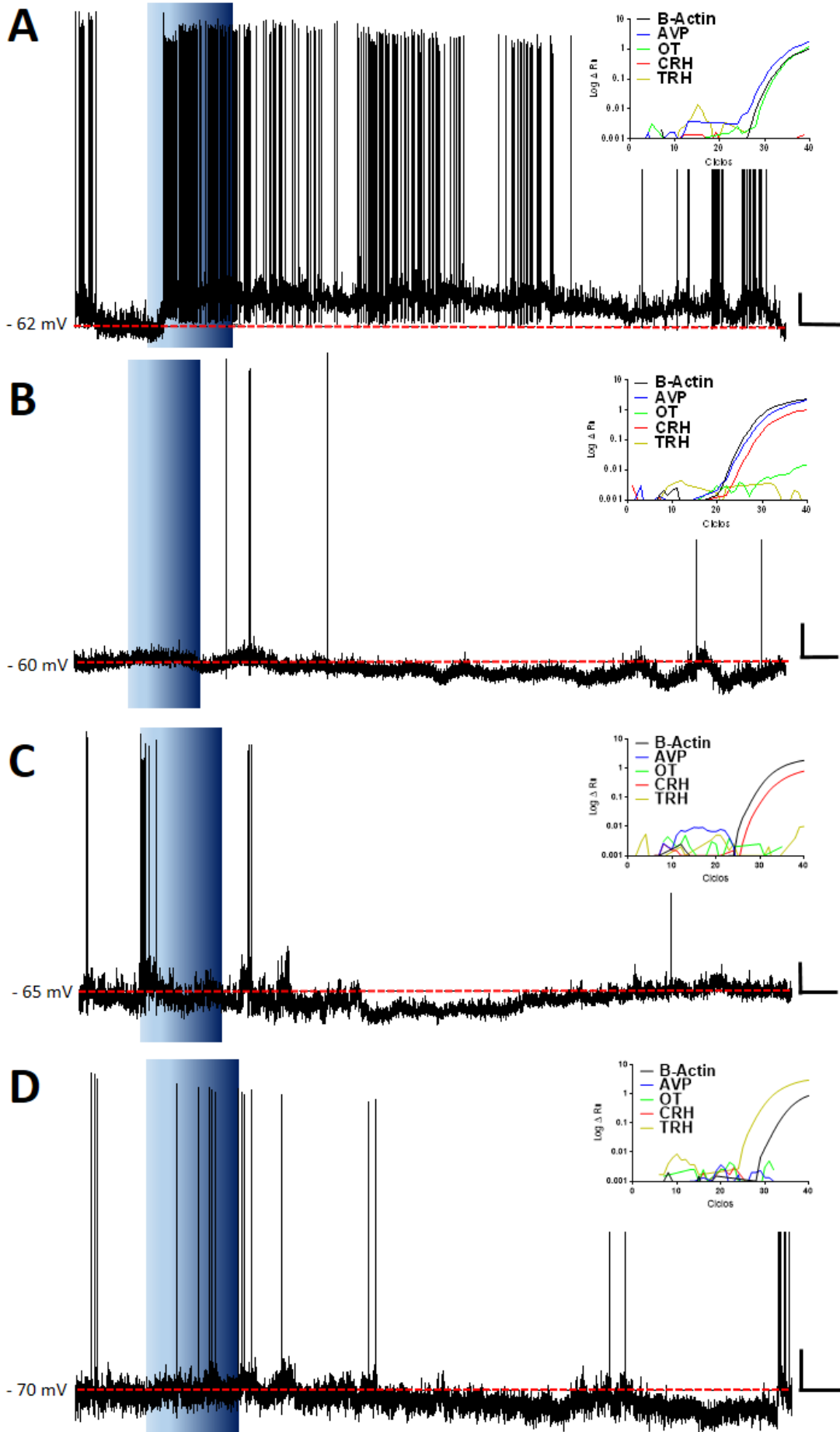


Figura 14. A figura ilustra traçados representativos de neurônios responsivos à grelina, os *insets* demonstram os respectivos gráficos de amplificação de RNAm para β -actina, AVP, OT, CRH, TRH. Estão destacados, um neurônio que despolariza em resposta à grelina e expressa RNAm para AVP e OT, com a predominância de AVP (A); hiperpolarizações em neurônios que apresentam RNAm para CRH com (B) ou sem (C) coexpressão de AVP; e uma hiperpolarização em um neurônio TRH (D). O fundo azul indica a aplicação de grelina ao banho; as linhas pontilhadas representam o potencial de membrana basal; a barra vertical representa 10 mV; a barra horizontal representa 60 s.

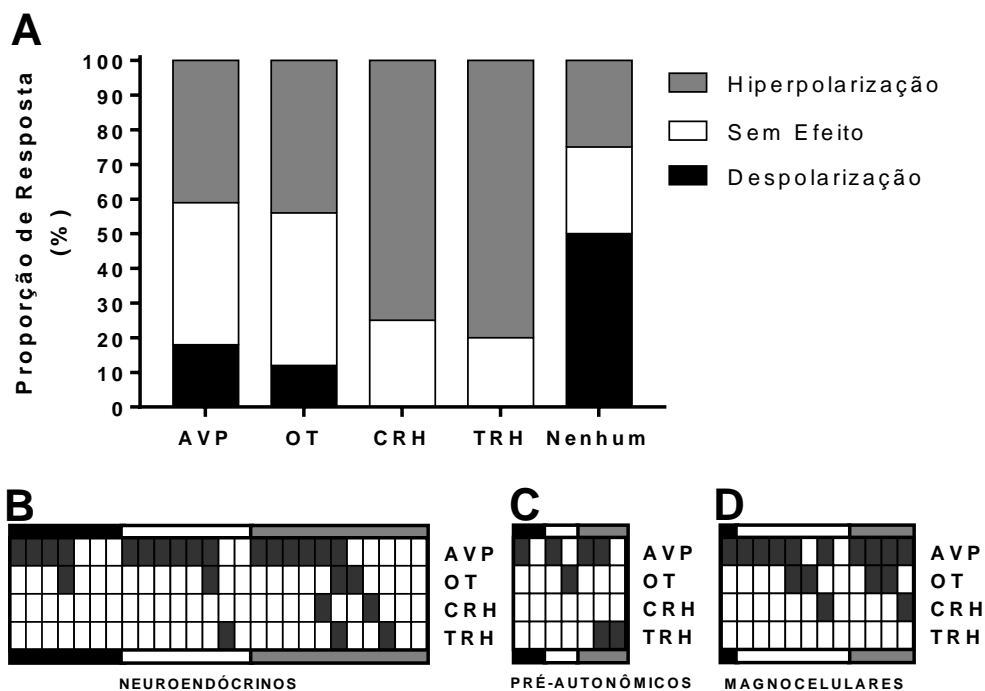


Figura 15. Identificação biomolecular dos neurônios do PVN. As proporções de resposta à grelina para cada gene (A) demonstram que neurônios TRH e CRH hiperpolarizam em resposta à grelina e que a maioria das despolarizações advém de neurônios que não possuem os transcritos testados. Os dados individuais de cada neurônio foram representados em tabelas (B, C e D), um neurônio em cada coluna e um gene em cada linha, caixas marcadas representam que o gene foi expresso; ainda, os fundos indicam se os neurônios foram despolarizados (preto), hiperpolarizados (cinza) ou não afetados (branco) pela administração de grelina. Neurônios neuroendócrinos (B), pré-autonômicos (C) e magnocelulares (D) mostram que o RNAm para AVP é expresso na maioria dos neurônios e que a maioria dos neurônios CRH coexpressam AVP.

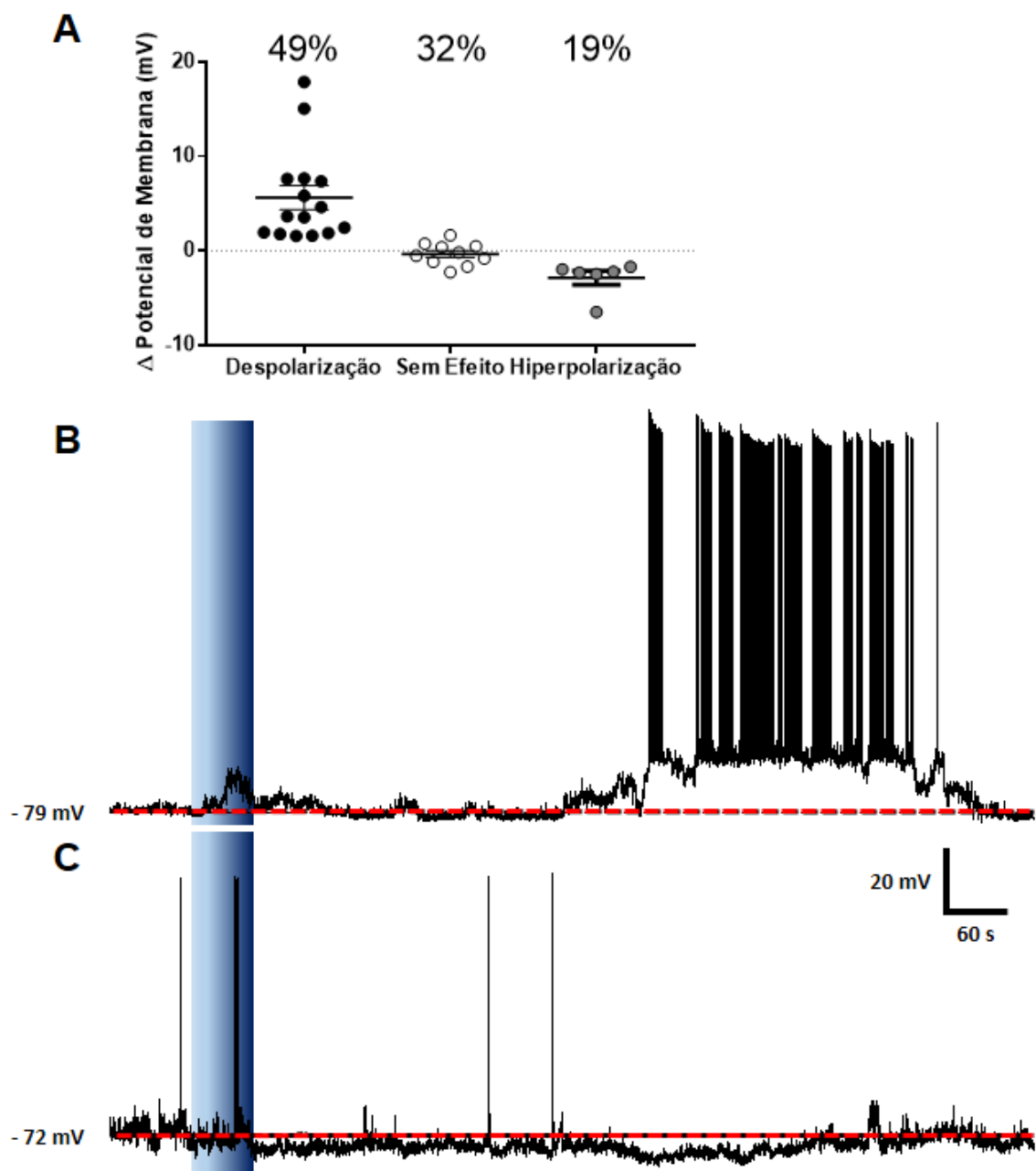


Figura 16. A grelina altera o potencial de membrana em neurônios da BLA. Dentre os neurônios sensíveis à grelina a maioria responde com uma despolarização, enquanto um número menor de neurônios responde com hiperpolarizações(A). Traçados representativos de uma despolarização (B) e de uma hiperpolarização (C) são mostrados na figura. O fundo azul indica a aplicação de grelina ao banho, as linhas pontilhadas representam o potencial de membrana basal.

5.3 Experimentos Comportamentais

Primeiramente, nós avaliamos os efeitos da privação alimentar, um estímulo fisiológico que aumenta a grelina plasmática, sobre os comportamentos exploratórios/locomotores e análogos à ansiedade em ratos. Os animais privados de alimento não apresentaram alterações em nenhum dos parâmetros avaliados no campo aberto (**Tabela I**). Estudos anteriores demonstraram que os efeitos da grelina sobre o comportamento podem ser alterados pela ausência ou presença de comida entre a administração da grelina e o teste comportamental (ALVAREZ-CRESPO et al., 2012), então, nós avaliamos se o comportamento exploratório era alterado em um campo aberto modificado na qual a comida está disponível. Neste experimento verificamos que nenhum dos parâmetros do campo aberto foram modificados exceto pela incidência de alimentação um indicador da atividade análoga à ansiedade que, como esperado, aumentou significativamente no grupo privado de alimentos (0/13 animais no grupo controle, 4/12 animais no grupo privado de alimentos, $p = 0,04$, teste exato de Fisher, **Tabela I**). Em conjunto esses resultados indicam que a atividade locomotora não é alterada pela privação de alimentos, porém o comportamento análogo à ansiedade parece estar diminuído. Para confirmar os efeitos da privação alimentar sobre a ansiedade realizamos um teste de labirinto em cruz elevado, os animais privados de alimento passam mais tempo nos braços abertos ($4,55 \pm 0,97$ vs $13,82 \pm 3,02$ %; $p = 0,01$; teste t não pareado; **Figura 17A**), sem alterações significativas das entradas em braços abertos ($20,48 \pm 3,94$ vs $29,72 \pm 4,81$; $p = 0,16$; teste t não pareado; **Figura 17B**).

Então, nós hipotetizamos que se a grelina liberada pelo estômago para o plasma fosse a responsável por estas alterações da resposta comportamental, a administração exógena de grelina iria alcançar efeitos similares à privação alimentar. No entanto, a administração de grelina não afetou o comportamento análogo à ansiedade no labirinto em cruz elevado (**Figura 18**), o que sugere que a grelina periférica não está envolvida nas alterações comportamentais causadas pela privação alimentar.

Tabela I. Comportamentos exploratórios

	Campo Aberto			Campo Aberto Modificado		
	CTRL	PA	p	CTRL	PA	p
	n = 7	n = 7		n = 12	n = 13	
Distância Percorrida no Quadrante Central (m)	1,68 ± 0,49	1.91 ± 0,69	0,43	1,32 ± 0,32	1,64 ± 0,40	0,55
Distância Percorrida no Quadrante Periférico (m)	12,39 ± 1,5	13 ± 1,42	0,74	15,18 ± 0,89	12,53 ± 1,49	0,14
Tempo no Quadrante Central (s)	12,43 ± 4	14 ± 4,9	0,81	14 ± 2,06	25,85 ± 12,8	0,37
Tempo no Quadrante Periférico (s)	272,4 ± 9,95	275,3 ± 4,97	0,80	286 ± 2,06	274,2 ± 12,8	0,37
Tempo de Grooming (s)	20,41 ± 3,49	28,31 ± 7,1	0,33	26,88 ± 4,96	18,7 ± 7,74	0,38
Episódio de Rearing	12,57 ± 2,25	12,57 ± 1,15	0,99	10,33 ± 1,32	8,16 ± 1,53	0,30
Incidência de alimentação (%)	Não se aplica	Não se aplica		0	32,5*	0,04

CTRL = controle, PA = privação alimentar, * Diferença significativa vs. CTRL

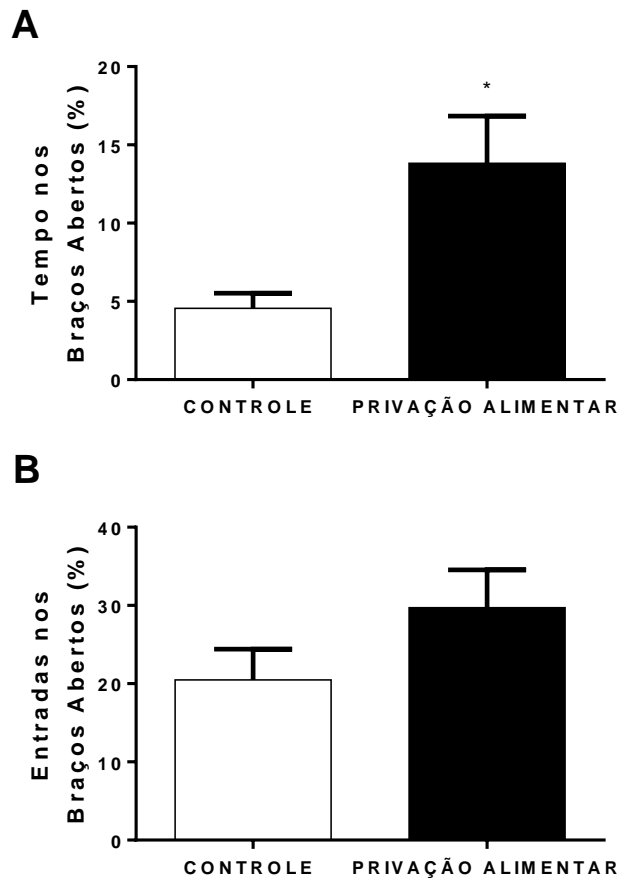


Figura 17. Efeitos da privação alimentar sobre os comportamentos análogo à ansiedade e exploratório. 48 horas de privação alimentar aumentaram significativamente o tempo gasto no braço aberto (A), sem alterações no número de entradas (B). Estes resultados indicam diminuição do comportamento análogo à ansiedade, sem alteração do comportamento exploratório. Teste t não-pareado, n = 12-13.

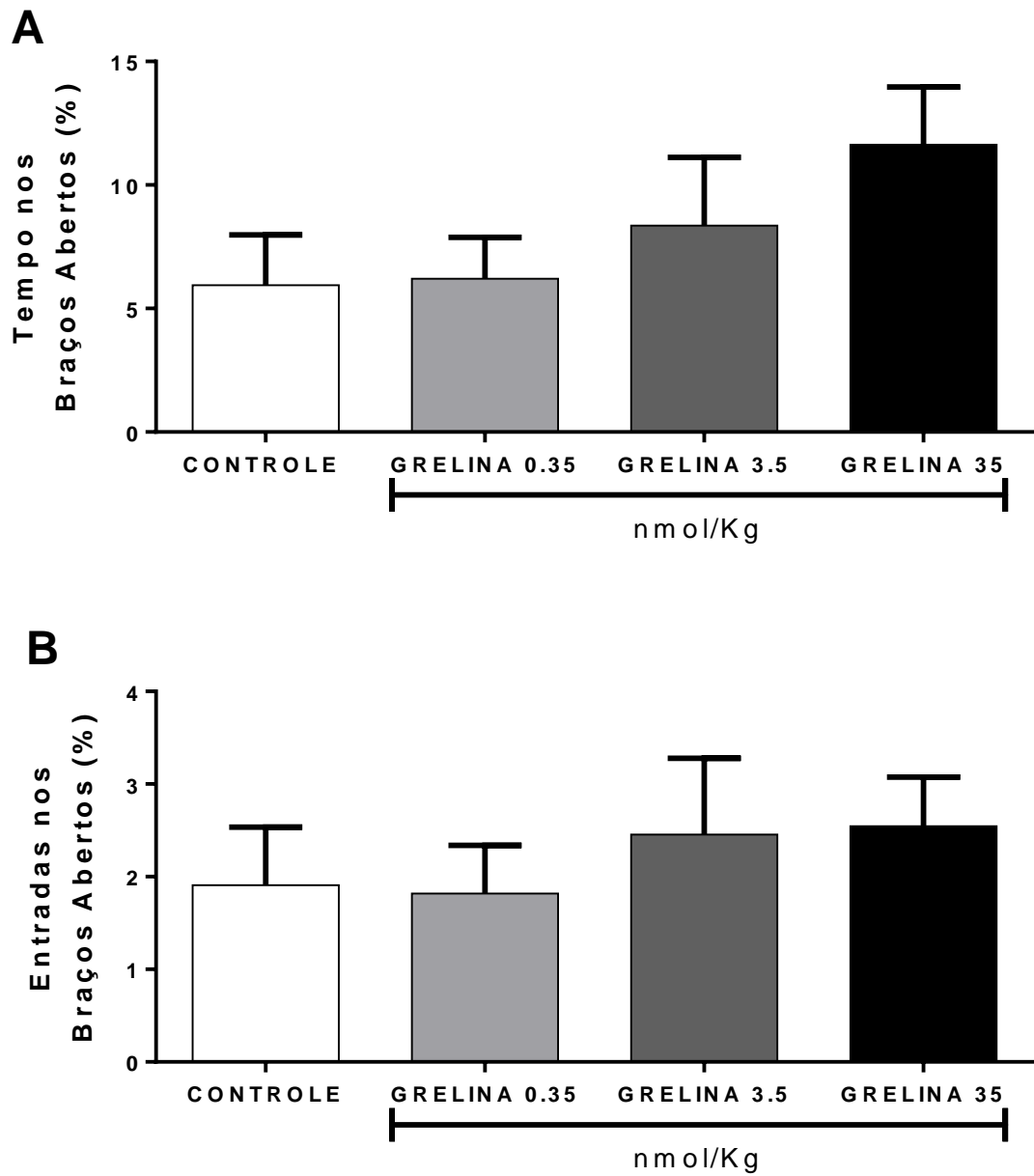


Figura 18. Efeitos da grelina sobre o comportamento análogo à ansiedade. A administração periférica de 3 doses de grelina não alterou o comportamento análogo à ansiedade (A) ou a atividade exploratória (B) no labirinto em cruz elevado em ratos alimentados *ad-libitum*. Anova de uma via, n = 11-12.

6 DISCUSSÃO

6.1 Efeitos da grelina sobre neurônios do PVN

O PVN está envolvido no controle de uma série de respostas fisiológicas, incluindo as respostas a estímulos osmóticos, distúrbios metabólicos, controle cardiovascular e autonômico, a resposta ao estresse e a secreção de hormônios hipofisários (STERN, 2015). A grelina modula todas as respostas supracitadas (MÜLLER et al., 2015), o que sugere que o PVN é um alvo para as ações da grelina. Estudos anteriores avaliaram os efeitos da grelina sobre a excitabilidade neuronal em diversos núcleos como o ARC (ANDREWS et al., 2008; COWLEY et al., 2003), hipocampo (DIANO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2014) e AP (FRY; FERGUSON, 2009). No entanto, até o momento, poucos estudos verificaram diretamente os efeitos da grelina sobre neurônios do PVN. Estes estudos verificaram efeitos tanto inibitórios (COWLEY et al., 2003; SORIA-GÓMEZ et al., 2014) quanto excitatórios (KOLA et al., 2008; SORIA-GÓMEZ et al., 2014) sobre as correntes pós-sinápticas de neurônios do PVN. Neste estudo nós demonstramos que a grelina afeta a frequência de disparo da maioria dos neurônios do PVN, aumentando ou diminuindo sua atividade. Apesar de a diminuição da frequência de disparo também ter sido demonstrada em neurônios do ARC (ANDREWS et al., 2008; COWLEY et al., 2003), a grelina age através do GHSR, um receptor acoplado à G_q (COWLEY et al., 2003; FERRINI et al., 2009), o que indica que os efeitos da grelina seriam primariamente excitatórios. Então, nós avaliamos os efeitos da grelina sobre neurônios do PVN após bloqueio da transmissão sináptica pela utilização de bicuculina e ácido kianurênico, respectivamente, antagonistas para receptores GABA-A e receptores de glutamato. Com isto demonstramos que as ações inibitórias da grelina não ocorriam quando a transmissão mediada por estes aminoácidos era bloqueada. Como o glutamato induz respostas excitatórias no PVN e o GABA está majoritariamente envolvidos em respostas inibitórias (FERGUSON; LATCHFORD; SAMSON, 2008), nós supomos que essa retirada dos efeitos inibitórios é mediada pelo bloqueio da ação de GABA. Com isto, estes resultados sugerem que os efeitos da grelina nos neurônios do PVN são excitatórios e que os efeitos inibitórios são dependentes da excitação de um circuito inibitório GABAérgico. Esses estímulos inibitórios podem ser provenientes de interneurônios do próprio PVN ou de aferentes de outros núcleos presentes na fatia, como o ARC. O ARC é ativado pela grelina e envia projeções para o PVN, no entanto, alguns efeitos da grelina persistem em camundongos com ablação do ARC, o que indica que o

PVN é capaz de responder diretamente à grelina (CABRAL et al., 2012, 2016). Interessantemente, tanto a administração intra-PVN de grelina (CURRIE et al., 2005) quanto a ativação de receptores GABA-A no PVN (PU et al., 1999; TSUJII; BRAY, 1991) aumentam a ingestão alimentar e estudos de imunofluorescência demonstraram que a grelina se liga a neurônios GABAérgicos no PVN (CABRAL et al., 2016). Logo, nós sugerimos que a grelina ativa interneurônios GABAérgicos no PVN, que, por sua vez, inibem neurônios anorexígenos do PVN, permitindo a ingestão alimentar.

Nossos resultados provenientes dos registros intracelulares demonstram ainda que a grelina majoritariamente despolariza neurônios do PVN, este efeito provavelmente explica alguns dos efeitos previamente atribuídos à grelina sobre a resposta autonômica. A administração ICV de grelina afeta respostas simpáticas, por exemplo, inibe a atividade do nervo simpático renal (MATSUMURA et al., 2002; TANIDA et al., 2007), aumenta a adiposidade e o armazenamento no tecido adiposo branco (THEANDER-CARRILLO et al., 2006) e inibe a oxidação de lipídeos no tecido adiposo marrom (THEANDER-CARRILLO et al., 2006; YASUDA et al., 2003). Similarmente, a administração intra-PVN de grelina aumenta a inibição simpática do tecido adiposo marrom (MANO-OTAGIRI et al., 2009) e aumenta FOS no NTS (OLSZEWSKI et al., 2003b). Adicionalmente, os neurônios não-secretórios do PVN podem participar dos efeitos da grelina em outras funções fisiológicas como o comportamento análogo à ansiedade (CURRIE et al., 2012; WAUSON et al., 2015) e a ingestão alimentar (MELIS et al., 2002; OLSZEWSKI et al., 2003b; SHRESTHA; WICKWIRE; GIRAUDO, 2006) ambos aumentados pela administração intra-PVN de grelina.

Neurônios magnocelulares e neuroendócrinos apresentaram respostas mistas à administração de grelina. Para tentar clarificar os efeitos da grelina sobre neurônios magnocelulares e neuroendócrinos nós caracterizamos os neurônios do PVN pela expressão de RNAm para AVP, OT, CRH e TRH, todos previamente implicados nas respostas à grelina (MÜLLER et al., 2015), e correlacionamos esta expressão às alterações de potencial de membrana causadas pela grelina. Foi demonstrado em estudos anteriores que a expressão de RNAm obtida por esse método está relacionada com a expressão proteica observada por imunofluorescência e que esta análise é uma técnica confiável para verificar o fenótipo neuronal (DA SILVA et al., 2015). Interessantemente, a administração icv de OT (OLSON et al., 1991), CRH (WANG et al., 2007) e TRH (SCHUHLER et al., 2007; STEWARD et al., 2003) diminuem a ingestão alimentar e a administração de grelina diminuiu a atividade da maioria dos neurônios que expressam esses neurotransmissores neste estudo. Estes resultados

suportam a hipótese de que a grelina inibe neurônios do PVN que expressam peptídeos anorexigênicos. Estudos anteriores demonstraram que no animal privado de alimento a via ARC-PVN é ativada, inibindo os neurônios anorexigênicos do PVN e induzindo a ingestão alimentar (VALASSI; SCACCHI; CAVAGNINI, 2008). O presente estudo acrescenta ainda que os efeitos inibitórios podem ocorrer através da influência direta da grelina sobre neurônios do PVN. Interessantemente, a grelina plasmática se liga à neurônios do PVN, apesar de em uma escala temporal mais longa do que no ARC (URIARTE et al., 2018). Em conjunto essas observações sugerem que os efeitos da grelina sobre o PVN podem representar o refinamento de uma resposta apetitiva ou um sistema de redundância no controle da ingestão alimentar.

Neurônios TRH do PVN controlam o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, consequentemente regulando a secreção de TSH, T3 e T4 e a função tireoidiana (PEKARY; SATTIN, 2012). Os efeitos da grelina sobre a liberação de TRH não foram diretamente demonstrados, porém nossos resultados sugerem que a grelina inibe neurônios TRH *in vitro*, indicando fortemente que a liberação de TRH seria inibida em condições fisiológicas. Essa hipótese é suportada por observações de efeitos inibitórios da grelina sobre TSH (KORDI; KHAZALI, 2015; MAHMOUDI et al., 2011; WREN et al., 2000) e T3/T4 (KORDI; KHAZALI, 2015; MAHMOUDI et al., 2011) e pela diminuição de TRH causada pela privação alimentar (JOSEPH-BRAVO et al., 2015). Além disso, a leptina – um hormônio que inibe a ingestão alimentar e se contrapõe às ações da grelina – aumenta a liberação de TRH (GHAMARI-LANGROUDI et al., 2010; GUO et al., 2004). Estes resultados indicam que no animal com fome o eixo do TRH é inibido, diminuindo a secreção de T3 e T4 e reduzindo o gasto energético. A grelina diminui o gasto energético (THEANDER-CARRILLO et al., 2006; TSCHÖP et al., 2000), possivelmente, essa diminuição do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide contribui para essa resposta.

A administração icv de grelina aumenta a expressão de c-FOS em neurônios OT no PVN (OLSZEWSKI et al., 2007b) e a administração periférica de grelina aumenta a OT plasmática (PEKARY; SATTIN, 2012). Adicionalmente, em culturas de células da neuroipófise, provavelmente neurônios magnocelulares, a grelina induz a liberação de OT (GÁLFI et al., 2016). Em nosso estudo os neurônios magnocelulares OT foram, em sua maioria, hiperpolarizados em resposta à administração de grelina, o que contradiz essa resposta neuroendócrina encontrada pelos demais autores. Possivelmente, os neurônios inibidos pela grelina representam neurônios não-secretórios do PVN, ou seja, estão

envolvidos com outras respostas atribuídas aos neurônios OT como a reprodução, o comportamento social e a alimentação (SPETTER; HALLSCHMID, 2017). Os resultados aqui apresentados, em conjunto com os estudos que demonstraram efeitos da administração intra-PVN de grelina sobre a ingestão alimentar, o controle neuroendócrino e a regulação autonômica indicam que o PVN é um importante alvo para as ações da grelina, contribuindo para a resposta aos distúrbios calóricos.

O RNAm para AVP foi coexpresso com todos os peptídeos avaliados neste estudo. A correlação entre a AVP e o CRH no controle do eixo HHA está bem estabelecido, a AVP atua sinergicamente com o CRH para estimular a secreção de ACTH na adenoipófise (KELLERWOOD, 2015). Em culturas de células hipotalâmicas a AVP é essencial para a secreção de CRH em resposta à grelina (NEMOTO et al., 2011), o que sugere uma relação entre estes dois peptídeos na resposta à grelina. A coexpressão de AVP e OT já foi demonstrada anteriormente em análise de célula única nos núcleos supra-óptico (PIRES DA SILVA et al., 2016) e PVN (HOYDA; SAMSON; FERGUSON, 2009). A inesperada ubíqua presença de RNAm para AVP indica que este neurotransmissor está envolvido em outras ações além das clássicas mediadas pela secreção do AVP para a circulação. De fato, a AVP integra neurônios secretórios e pré-autonômicos do PVN através de um mecanismo denominado “transmissão por volume”, no qual a liberação de um neurotransmissor pelos dendritos no meio extracelular influencia a atividade de neurônios justapostos que não estão conectados por sinapses axodendríticas (STERN, 2015). Estudos anteriores demonstraram que a liberação dendrodendrítica de AVP é importante para o controle autonômico (LOZIC et al., 2016) e que neurônios neuroendócrinos e pré-autonômicos se comunicam desta maneira (SON et al., 2013). A liberação dendrítica de AVP já foi demonstrada diretamente em neurônios AVP magnocelulares no PVN, nestes a administração de grelina induz a liberação dendrítica de AVP, o AVP então induz a liberação de ATP em astrócitos próximos, e o ATP induz a liberação de GABA por interneurônios no PVN, que influenciam o neurônio AVP (HAAM et al., 2014). Como no nosso estudo demonstramos que o AVP está amplamente expresso em neurônios do PVN, é possível que outras subpopulações de neurônios atuem através da transmissão por volume. A grelina influencia a adiposidade e a utilização de energia (THEANDER-CARRILLO et al., 2006), possivelmente, a transmissão por volume medeia estes efeitos uma vez que eles dependem de uma alteração da neurotransmissão por períodos mais longos. A influência da grelina sobre a transmissão por volume é uma interessante linha de pesquisa para estudos futuros.

A maioria das despolarizações em resposta à grelina foi observada em neurônios que não apresentavam nenhum dos genes testados, portanto, provavelmente se detinham a neurônios de outros subgrupos de neurônios do PVN, como aqueles expressando glutamato (HRABOVSKY et al., 2005) ou GABA (PARK et al., 2007). Neste sentido, estudos anteriores demonstraram que a grelina se liga a neurônios GABA no PVN (CABRAL et al., 2016) e nós observamos que a grelina inibe diversos neurônios no PVN e que essas inibições não ocorrem na presença de antagonistas de receptores GABA-A e de glutamato. Em conjunto, essas observações sugerem que a grelina aumenta a atividade de neurônios inibitórios no PVN que, por sua vez, diminuem a atividade de neurônios TRH, CRH e OT envolvidos com a inibição da ingestão alimentar. A hipótese aqui apresentada, no entanto, precisa de confirmações por estudos futuros, já que o número de neurônios TRH e CRH obtidos por esta técnica foi muito baixo.

Em conclusão, a grelina afeta todos os tipos de neurônios do PVN, possivelmente aumentando a atividade de neurônios GABAérgicos que inibem neurônios anorexigênicos OT, CRH e TRH no PVN aumentando a ingestão alimentar e diminuindo o gasto energético. Adicionalmente, a ubíqua presença de RNAm para AVP sugere uma função para este peptídeo além daquela de um neurotransmissor clássico, possivelmente o AVP está envolvido na integração entre diferentes populações neuronais no PVN. Mais estudos são necessários para elucidar a participação do PVN na resposta à grelina, com especial atenção para os diferentes núcleos para os quais este núcleo se projeta e para a integração intra-PVN destas respostas.

6.2 Efeitos da grelina sobre a atividade de neurônios da amígdala basolateral

O PVN é um núcleo de especial interesse no controle da fome homeostática, ou seja, na indução de ingestão alimentar em virtude da necessidade calórica, no entanto, o PVN tem pouca influência sobre a alimentação hedônica (BOMBERG et al., 2007; JEWETT et al., 2006). No entanto, os mecanismos através dos quais a grelina afeta o comportamento alimentar são multifacetados e envolvem circuitos envolvidos nos aspectos motivacionais da alimentação (PERELLO; DICKSON, 2015). Além da ingestão alimentar propriamente dita, seja ela devido a um estímulo homeostático ou hedônico, outras alterações comportamentais são necessárias para que o animal possa explorar o ambiente para encontrar e consumir alimentos (FERRARIO et al., 2016). Um exemplo é o comportamento análogo à ansiedade. No animal privado de alimentos o comportamento análogo à ansiedade é diminuído (Genn et

al., 2003; Inoue et al., 2004), permitindo a exploração do ambiente. Neste sentido, um núcleo de especial interesse é a amígdala. A ativação da amígdala se relaciona com o comportamento análogo à ansiedade em modelos animais (ROOZENDAAL; MCEWEN; CHATTARJI, 2009) e à ansiedade em humanos (ETKIN; WAGER, 2007; STEIN et al., 2007).

Neste estudo nós demonstramos que a grelina despolariza grande parte dos neurônios da BLA. Nossas observações contradizem estudos anteriores que demonstraram uma diminuição das correntes excitatórias pós-sinápticas em neurônios da BLA (ALVAREZ-CRESPO et al., 2012). A ativação da BLA está relacionada com aumento da ansiedade (SHARP, 2017), no entanto, manipulações optogênicas demonstraram que a BLA é composta por duas populações neuronais que apresentam efeitos opostos sobre o medo condicionado, uma subpopulação de neurônios está bidirecionalmente ligada ao córtex pré-frontal e medeia a extinção do medo, enquanto a outra recebe aferências do hipocampo e medeia a indução do medo (HERRY et al., 2008). Os diferentes tipos de neurônios da BLA podem explicar os diferentes efeitos causados pela grelina em neurônios dessa região. Ainda, os neurônios da BLA se projetam para a amígdala central (SHARP, 2017). A amígdala central é o núcleo de saída do circuito amigdalar, ela envia projeções ao PVN, aonde influencia a secreção de hormônios do estresse, e para o complexo dorso-vagal, aonde influencia a atividade autonômica, além de inervar outras regiões da própria amígdala, como a BLA (GRAY, 1993).

A administração de grelina diretamente na amígdala central aumenta o comportamento análogo à ansiedade em ratos (CARLINI et al., 2004), similarmente ao encontrado após administração em outros núcleos como o ARC e o PVN (Brockway et al., 2016; Currie et al., 2012; Wauson et al., 2015). Contrariamente, a administração na BLA diminui o comportamento análogo à ansiedade em ratos (ALVAREZ-CRESPO et al., 2012). O que sugere que os efeitos da grelina sobre o BLA apresentam diferenças importantes em relação à outros núcleos na modulação da resposta comportamental. Adicionalmente, a BLA está intrinsecamente ligada às adaptações plásticas causadas pelo estresse, influenciando na memória de eventos emocionalmente intensos e mediando a retomada de memórias aversivas para expressão de medo e ansiedade (ROOZENDAAL; MCEWEN; CHATTARJI, 2009). A super-expressão de GHSR na amígdala induz uma resposta ansiolítica (JENSEN et al., 2016), a grelina se contrapõe aos efeitos ansiogênicos e pró-depressivos do estresse crônico (HUANG et al., 2017) e camundongos deficientes em grelina apresentam uma resposta comportamental ao estresse aumentada (LUTTER et al., 2008). Possivelmente, as adaptações

plásticas da BLA podem estar envolvidas nas diferenças entre as respostas agudas e crônicas da administração de grelina sobre aspectos relacionados à resposta ao estresse.

Interessantemente, a literatura ainda não apresenta um consenso acerca da existência de neurônios capazes de produzir/liberar grelina (CABRAL et al., 2017b; EDWARDS; ABIZOID, 2017). No entanto, a grelina administrada icv não se liga a neurônios na amígdala (CABRAL; FERNANDEZ; PERELLO, 2013) e estudos recentes demonstraram que neurônios positivos para grelina se projetam do hipocampo para a amígdala BLA (RUSSO et al., 2017). De forma que a liberação de grelina por neurônios é uma explicação plausível para os efeitos da grelina sobre estes núcleos (EDWARDS; ABIZOID, 2017). Uma hipótese alternativa é que o GHSR por si só seja capaz de alterar a neurotransmissão nessa região. A alta atividade constitutiva do receptor para grelina já foi demonstrada anteriormente (HOLST et al., 2003; LÓPEZ SOTO et al., 2015) e nossos resultados indicam que o GHSR está presente e funcional nesta região do encéfalo, ou pelo menos em núcleos próximos contidos nas mesmas fatias de encéfalo.

Em conclusão a grelina afeta neurônios da amígdala, como demonstrado pelo presente estudo e por outros pesquisadores. No entanto, a amígdala é composta por diferentes subnúcleos, cada um dos quais com diferentes subpopulação de neurônios. Os nossos resultados sugerem que a grelina pode despolarizar ou hiperpolarizar diferentes populações de neurônios da BLA, o que acrescenta mais uma camada de complexidade aos efeitos da grelina sobre este núcleo. Além disso, o impacto dessas observações sobre o comportamento do animal necessitam de maiores elucidações, uma vez que efeitos opostos da grelina sobre o comportamento análogo à ansiedade já foram demonstrados.

6.3 Efeitos da grelina sobre o comportamento

A ansiedade é definida como uma resposta emocional engatilhada por um conflito entre a aproximação e aversão, resultante de uma ameaça potencial (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Para um animal se expor e procurar por comida a motivação para explorar têm que ser maior que a motivação para se manter em um ambiente seguro, ou seja, há que ocorrer uma diminuição da ansiedade (DIETZE et al., 2016). Neste sentido, diversos estudos demonstraram que déficits calóricos incorrem em diminuição de comportamentos análogos à ansiedade (GENN et al., 2003; INOUE et al., 2004; MANISCALCO et al., 2015; MARTIN-IVERSON; STEVENSON, 2005). No entanto, o mecanismo através do qual a

privação de alimento altera o comportamento análogo à ansiedade em ratos ainda não está bem descrito. Neste estudo nós observamos que 48 horas de privação alimentar diminuem o comportamento análogo à ansiedade, sem alterações na atividade locomotora/exploratória. Artigos anteriores apresentaram resultados similares em períodos mais curtos de privação alimentar (GENN et al., 2003; INOUE et al., 2004) ou após restrição alimentar, aonde os animais eram expostos a uma quantidade de alimento menor do que a sua ingesta diária voluntária (MANISCALCO et al., 2015; MARTIN-IVERSON; STEVENSON, 2005). Essas alterações da ansiedade em função da privação alimentar são provavelmente transientes, uma vez que os efeitos sobre o comportamento são revertidos um dia após realimentação (DIETZE et al., 2016). Contrariamente, após a restrição alimentar os efeitos sobre o comportamento persistem até 10 dias após a realimentação (INOUE et al., 2004), o que sugere que os efeitos causados por ambos os estímulos podem ser diferentes. De qualquer forma, ambos diminuíram o comportamento análogo à ansiedade e demonstram que o déficit calórico diminui a ansiedade.

Estudos anteriores propuseram que o labirinto em cruz elevado pode não ser apropriado para avaliação da ansiedade neste contexto, uma vez que um aumento da atividade locomotora ou exploratória poderia indicar um falso resultado positivo quanto às respostas ansiolíticas (MANISCALCO et al., 2015). Com isto em mente, utilizamos o teste de campo aberto e demonstramos que a privação alimentar não altera a atividade exploratória. Resultados similares foram encontrados sobre o reflexo de sobressalto acústico, um modelo de estudo do comportamento análogo à ansiedade independente da atividade exploratória, após restrição alimentar ou privação alimentar por 24 horas (MANISCALCO et al., 2015; MARTIN-IVERSON; STEVENSON, 2005). Em seguida, nós utilizamos um teste de campo aberto modificado (DIETZE et al., 2016) para avaliar se a presença de comida iria alterar as respostas comportamentais à privação alimentar. Este teste se baseia na oposição de um estímulo aversivo, uma luz clara sobre a arena, e um estímulo positivo, ração; o animal com fome tem maior probabilidade de se deslocar até o ambiente iluminado para adquirir comida (REX et al., 1998). Os resultados neste teste indicaram que apesar de a privação alimentar não ser suficiente para alterar a atividade exploratória *per se*, ela aumenta a motivação para buscar comida, suplantando a ansiedade causada pelo ambiente novo e pela luz. Estudos anteriores demonstraram que períodos mais curtos não são suficientes para alcançar este tipo de alteração, ou seja, após 24 horas de privação alimentar a motivação não é suficiente para que o animal atravessasse a região iluminada em busca de comida.

Diversos hormônios e neurotransmissores se alteram após um longo período de privação alimentar e podem estar envolvidos com essas alterações no comportamento análogo à ansiedade. Dentre eles, a grelina aumenta em situações de déficit calórico (MÜLLER et al., 2015; SATO et al., 2012) e influencia o comportamento análogo à ansiedade (ALVAREZ-CRESPO et al., 2012; BROCKWAY et al., 2016b; LUTTER et al., 2008; WAUSON et al., 2015). Para testar se este comportamento ansiolítico é causado pela grelina, a grelina foi administrada em três doses por via intraperitoneal. A dose média utilizada alcança níveis plasmáticos de grelina similares àqueles encontrados após 48 horas de privação alimentar (WREN et al., 2001) e induz a alimentação em ratos saciados (RÜTER et al., 2003; WREN et al., 2001). A grelina foi administrada periféricamente uma vez que o plasma é a maior fonte de grelina em situações fisiológicas (MÜLLER et al., 2015) e, até o momento, há poucas evidências da existência de produção central de grelina (CABRAL et al., 2017b). Neste contexto, a administração de grelina não alterou o comportamento análogo à ansiedade em nenhuma das doses utilizadas, mesmo na dose 10 vezes maior que a dose fisiológica, o que sugere que a grelina pode não influenciar o comportamento análogo à ansiedade em ratos.

A maioria dos núcleos que apresentam o GHSR está envolvida no controle comportamental (SPENCER et al., 2015) e a administração exógena de grelina alterou o comportamento análogo à ansiedade em diversos estudos. Um estudo relatou que a administração de grelina periféricamente em ratos aumentava a expressão do comportamento análogo à ansiedade (ASAKAWA et al., 2001), o mesmo resultado foi encontrado após administração icv (ASAKAWA et al., 2001; CARLINI et al., 2002), no ARC (BROCKWAY et al., 2016a; CURRIE et al., 2012) ou no PVN (BROCKWAY et al., 2016a; CURRIE et al., 2012; WAUSON et al., 2015). No entanto, o efeito oposto da grelina já foi demonstrado após administração na BLA (ALVAREZ-CRESPO et al., 2012). Ainda neste sentido, os efeitos da administração crônica de grelina são controversos, podendo apresentar aumento (HANSSON et al., 2011) ou diminuição (HUANG et al., 2017) dos comportamentos análogos à ansiedade em ratos. Ou seja, parece que a administração de grelina apresenta efeitos majoritariamente ansiogênicos em ratos, apesar de efeitos ansiolíticos já terem sido observados. No entanto, estas manipulações farmacológicas podem não representar a influência da grelina em contextos fisiológicos. Neste sentido, estudos anteriores demonstraram que camundongos *knockout* para GOAT (STARK et al., 2016) são mais ansiosos e que camundongos *knockout* para GHSR não apresentam menor ansiedade após privação alimentar (LUTTER et al., 2008), estes resultados indicam que a grelina endógena provavelmente apresenta efeitos ansiolíticos.

No entanto, estas diferenças de resultados podem ser atribuídas às diferenças entre espécies, uma vez que em camundongos a administração periférica de grelina é ansiolítica (JENSEN et al., 2016; LUTTER et al., 2008).

Ou seja, a privação alimentar, assim como outros estímulos que induzem a fome, diminui o comportamento análogo à ansiedade em ratos. No entanto, possivelmente a grelina por si só não seja responsável por estas alterações. Estudos posteriores são necessários para se elucidar o impacto da grelina sobre o comportamento análogo à ansiedade, com especial atenção para as possíveis diferenças entre camundongos e ratos e para os efeitos fisiológicos da grelina.

7 CONCLUSÕES

- A grelina apresenta efeitos excitatórios e inibitórios sobre os neurônios do PVN, sem uma distribuição anatômica clara entre os efeitos. Os experimentos com antagonistas sugerem que os efeitos excitatórios são diretos enquanto os efeitos inibitórios são indiretos, possivelmente mediados pela excitação de interneurônios inibitórios GABAérgicos.
- Os efeitos da grelina sobre o PVN são concentração-dependentes, porém afetam de forma similar as três populações de neurônios do PVN: magnocelulares, parvocelulares pré-autonômicos e parvocelulares neuroendócrinos.
- A identificação biomolecular dos neurônios do PVN demonstrou que neurônios CRH, TRH e a maioria dos OT são inibidos pela grelina. Adicionalmente, AVP é expresso na maioria dos neurônios do PVN, o que indica uma função adicional para o AVP na regulação do PVN.
- A grelina afeta neurônios da amígdala basolateral, com efeitos majoritariamente excitatórios, o que indica um possível alvo para atuação da grelina no comportamento análogo à ansiedade em ratos.
- A privação alimentar diminui o comportamento análogo à ansiedade, sem alterar a atividade exploratória. A administração periférica de grelina não altera o comportamento análogo à ansiedade em ratos.

7.1 Significância e perspectivas

Os resultados apresentados no presente documento demonstraram os efeitos da grelina sobre dois núcleos encefálicos envolvidos com diversas respostas fisiológicas. De forma que os artigos provenientes desta tese podem ser úteis à pesquisa em diferentes campos, sejam eles sobre o controle neuroendócrino, autonômico, comportamental, metabólico, ou outros. Os resultados dos experimentos comportamentais carecem de maiores esclarecimentos, mas apontam uma linha de pesquisa futura na qual a relação entre diferentes estímulos metabólicos e as suas respectivas alterações comportamentais podem ser analisados. Especificamente, a relação entre as respostas ao estresse, a grelina e neurônios CRH do PVN são um potencial foco para pesquisas futuras, tendo em vista a grande importância do entendimento dos mecanismos do estresse, sua relação com a obesidade e a participação da grelina nestas respostas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABTAHI, S. et al. Ghrelin enhances food intake and carbohydrate oxidation in a nitric oxide dependent manner. **General and Comparative Endocrinology**, v. 250, p. 9–14, 2017.
- ABTAHI, S. et al. Exendin-4 antagonizes the metabolic action of acylated ghrelinergic signaling in the hypothalamic paraventricular nucleus. **General and Comparative Endocrinology**, out. 2018.
- ALLSOP, S. A. et al. Optogenetic insights on the relationship between anxiety-related behaviors and social deficits. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, p. 241, 2014.
- ALVAREZ-CRESPO, M. et al. The amygdala as a neurobiological target for ghrelin in rats: neuroanatomical, electrophysiological and behavioral evidence. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e46321, 2012.
- ANDREWS, Z. B. et al. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 846–51, 14 ago. 2008.
- APONTE, Y.; ATASOY, D.; STERNSON, S. M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. **Nature neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 351–5, mar. 2011.
- ARVAT, E. et al. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 86, n. 3, p. 1169–74, mar. 2001.
- ASAKAWA, A. et al. A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. **Neuroendocrinology**, v. 74, n. 3, p. 143–7, set. 2001.
- BANKS, W. A. et al. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 302, n. 2, p. 822–7, ago. 2002.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual review of psychology**, v. 39, p. 43–68, 1988.
- BOMBERG, E. M. et al. Central ghrelin induces feeding driven by energy needs not by reward. **NeuroReport**, v. 18, n. 6, p. 591–595, 2007.
- BROCKWAY, E. T. et al. Impact of [d-Lys3]-GHRP-6 and feeding status on hypothalamic ghrelin-induced stress activation. **Peptides**, v. 79, p. 95–102, 2016a.
- BROCKWAY, E. T. et al. Impact of [d-Lys(3)]-GHRP-6 and feeding status on hypothalamic ghrelin-induced stress activation. **Peptides**, v. 79, p. 95–102, maio 2016b.
- CABRAL, A. et al. Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–10, 20 fev. 2012.
- CABRAL, A. et al. Ghrelin activates hypophysiotropic corticotropin-releasing factor neurons independently of the arcuate nucleus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 67, p. 27–39, maio 2016.
- CABRAL, A. et al. Circulating Ghrelin Acts on GABA Neurons of the Area Postrema and Mediates Gastric Emptying in Male Mice. **Endocrinology**, v. 158, n. 5, p. 1436–1449, 2017a.

- CABRAL, A. et al. Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System? **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, 15 mar. 2017b.
- CABRAL, A.; FERNANDEZ, G.; PERELLO, M. Analysis of brain nuclei accessible to ghrelin present in the cerebrospinal fluid. **Neuroscience**, v. 253, p. 406–15, 3 dez. 2013.
- CAMINOS, J. E. et al. Influence of thyroid status and growth hormone deficiency on ghrelin. **European journal of endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 159–63, jul. 2002.
- CARLINI, V. P. et al. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 299, n. 5, p. 739–43, 20 dez. 2002.
- CARLINI, V. P. et al. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 313, n. 3, p. 635–41, 16 jan. 2004.
- CARLINI, V. P. et al. Acute ghrelin administration reverses depressive-like behavior induced by bilateral olfactory bulbectomy in mice. **Peptides**, v. 35, n. 2, p. 160–5, jun. 2012.
- CHEN, X. et al. Effects of ghrelin on hypothalamic glucose responding neurons in rats. **Brain Research**, v. 1055, n. 1–2, p. 131–136, set. 2005.
- CHOUZOURIS, T. M. et al. Effects of pregnancy and short-lasting acute feed restriction on total ghrelin concentration and metabolic parameters in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 106, p. 141–148, 15 jan. 2018.
- COIRO, V. et al. Adrenocorticotropin/cortisol and arginine-vasopressin secretory patterns in response to ghrelin in normal men. **Neuroendocrinology**, v. 81, n. 2, p. 103–6, 2005.
- COIRO, V. et al. Oxytocin does not modify GH, ACTH, cortisol and prolactin responses to Ghrelin in normal men. **Neuropeptides**, v. 45, n. 2, p. 139–42, abr. 2011.
- COLLDEN, G. et al. Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. **Molecular Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 15–24, 2015.
- CÔTÉ, C. D. et al. Hormonal signaling in the gut. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11642–9, 25 abr. 2014.
- COWLEY, M. A. et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. **Neuron**, v. 37, n. 4, p. 649–661, 20 fev. 2003.
- CURRIE, P. J. et al. Ghrelin is an orexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nuclei. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 289, n. 2, p. R353–R358, ago. 2005.
- CURRIE, P. J. et al. Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine inhibits the effects of ghrelin on eating and energy substrate utilization. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 1, p. 152–155, nov. 2010.
- CURRIE, P. J. et al. Urocortin I inhibits the effects of ghrelin and neuropeptide Y on feeding and energy substrate utilization. **Brain research**, v. 1385, p. 127–134, 18 abr. 2011.
- CURRIE, P. J. et al. Ghrelin is an orexigenic peptide and elicits anxiety-like behaviors following administration into discrete regions of the hypothalamus. **Behavioural Brain**

Research, v. 226, n. 1, p. 96–105, 1 jan. 2012.

DA SILVA, M. P. et al. In vitro differentiation between oxytocin- and vasopressin-secreting magnocellular neurons requires more than one experimental criterion. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 400, p. 102–11, 15 jan. 2015.

DATE, Y. et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in Ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1120–1128, out. 2002.

DATE, Y. et al. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. **Endocrinology**, v. 146, n. 8, p. 3518–25, ago. 2005.

DE VRIESE, C. et al. Ghrelin Degradation by Serum and Tissue Homogenates: Identification of the Cleavage Sites. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4997–5005, nov. 2004.

DIANO, S. et al. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 381–8, mar. 2006.

DIETZE, S. et al. Food Deprivation, Body Weight Loss and Anxiety-Related Behavior in Rats. **Animals : an open access journal from MDPI**, v. 6, n. 1, 7 jan. 2016.

DRAZEN, D. L. et al. Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: Evidence for a learned response independent of nutrient status. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 23–30, jan. 2006.

DUERRSCHMID, C. et al. Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. **Nature medicine**, v. 23, n. 12, p. 1444–1453, dez. 2017.

EDWARDS, A.; ABIZAID, A. Clarifying the ghrelin system's ability to regulate feeding behaviours despite enigmatic spatial separation of the GHSR and its endogenous ligand. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, 2017.

ETKIN, A.; WAGER, T. D. Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. **The American journal of psychiatry**, v. 164, n. 10, p. 1476–88, out. 2007.

FERGUSON, A. V.; LATCHFORD, K. J.; SAMSON, W. K. The paraventricular nucleus of the hypothalamus – a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 12, n. 6, p. 717–727, 15 jun. 2008.

FERNANDEZ, G. et al. Des-Acyl Ghrelin Directly Targets the Arcuate Nucleus in a Ghrelin-Receptor Independent Manner and Impairs the Orexigenic Effect of Ghrelin. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 2, p. n/a-n/a, fev. 2016a.

FERNANDEZ, G. et al. Des-Acyl Ghrelin Directly Targets the Arcuate Nucleus in a Ghrelin-Receptor Independent Manner and Impairs the Orexigenic Effect of Ghrelin. **Journal of neuroendocrinology**, v. 28, n. 2, p. 12349, fev. 2016b.

FERRARIO, C. R. et al. Homeostasis Meets Motivation in the Battle to Control Food Intake. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 45, p. 11469–11481, 2016.

FERRINI, F. et al. Ghrelin in Central Neurons. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 37–49, 1 mar. 2009.

FRY, M.; FERGUSON, A. V. Ghrelin modulates electrical activity of area postrema neurons. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 296, n. 3, p. R485-92, mar. 2009.

- FRY, M.; FERGUSON, A. V. Ghrelin: central nervous system sites of action in regulation of energy balance. **International journal of peptides**, v. 2010, jan. 2010.
- GÁLFI, M. et al. Ghrelin-Induced Enhancement of Vasopressin and Oxytocin Secretion in Rat Neurohypophyseal Cell Cultures. **Journal of molecular neuroscience : MN**, v. 60, n. 4, p. 525–530, dez. 2016.
- GENN, R. F. et al. Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 27, n. 1–2, p. 155–61, 2003.
- GHAMARI-LANGROUDI, M. et al. Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 24, n. 12, p. 2366–81, dez. 2010.
- GIMÉNEZ-PALOP, O. et al. Circulating ghrelin in thyroid dysfunction is related to insulin resistance and not to hunger, food intake or anthropometric changes. **European journal of endocrinology**, v. 153, n. 1, p. 73–9, jul. 2005.
- GRAEFF, F. G. [Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis]. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 29 Suppl 1, p. S3-6, maio 2007.
- GRAY, T. S. Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 697, p. 53–60, 29 out. 1993.
- GUAN, X. M. et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. **Brain research. Molecular brain research**, v. 48, n. 1, p. 23–9, ago. 1997.
- GUO, F. et al. Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2221–7, maio 2004.
- HAAM, J. et al. GABA Is Excitatory in Adult Vasopressinergic Neuroendocrine Cells. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 2, p. 572–582, 11 jan. 2012.
- HAAM, J. et al. Nutritional State-Dependent Ghrelin Activation of Vasopressin Neurons via Retrograde Trans-Neuronal-Glial Stimulation of Excitatory GABA Circuits. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 18, p. 6201–6213, 2014.
- HAHN, T. M. et al. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. **Nature Neuroscience**, v. 1, n. 4, p. 271–272, 1 ago. 1998.
- HANSSON, C. et al. Central administration of ghrelin alters emotional responses in rats: behavioural, electrophysiological and molecular evidence. **Neuroscience**, v. 180, p. 201–211, abr. 2011.
- HARROLD, J. A. et al. Autoradiographic analysis of ghrelin receptors in the rat hypothalamus. **Brain Research**, v. 1196, p. 59–64, 27 fev. 2008.
- HASHIMOTO, H. et al. Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1638–47, abr. 2007.
- HERNÁNDEZ, V. S. et al. Extra-neurohypophyseal axonal projections from individual vasopressin-containing magnocellular neurons in rat hypothalamus. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 9, n. October, p. 130, 2015.

- HERNÁNDEZ, V. S. et al. Hypothalamic Vasopressinergic Projections Innervate Central Amygdala GABAergic Neurons: Implications for Anxiety and Stress Coping. **Frontiers in neural circuits**, v. 10, p. 92, 2016.
- HERRY, C. et al. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. **Nature**, v. 454, n. 7204, p. 600–6, 31 jul. 2008.
- HOLST, B. et al. High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 17, n. 11, p. 2201–10, nov. 2003.
- HOSODA, H. et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 279, n. 3, p. 909–13, 29 dez. 2000.
- HOYDA, T. D.; SAMSON, W. K.; FERGUSON, A. V. Adiponectin depolarizes parvocellular paraventricular nucleus neurons controlling neuroendocrine and autonomic function. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 832–40, fev. 2009.
- HRABOVŠKY, E. et al. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone neurons of the rat contain vesicular glutamate transporter-2. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 341–7, jan. 2005.
- HUANG, H.-J. et al. Ghrelin alleviates anxiety- and depression-like behaviors induced by chronic unpredictable mild stress in rodents. **Behavioural brain research**, v. 326, p. 33–43, 30 maio 2017.
- HULBERT, A. J. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 75, n. 4, p. 519–631, nov. 2000.
- INOUE, K. et al. Reduction of anxiety after restricted feeding in the rat: implication for eating disorders. **Biological psychiatry**, v. 55, n. 11, p. 1075–81, 1 jun. 2004.
- ISHIZAKI, S. et al. Role of ghrelin in the regulation of vasopressin release in conscious rats. **Endocrinology**, v. 143, n. 5, p. 1589–93, maio 2002.
- JENSEN, M. et al. Anxiolytic-Like Effects of Increased Ghrelin Receptor Signaling in the Amygdala. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 5, maio 2016.
- JEWETT, D. C. et al. Intraparaventricular neuropeptide Y and ghrelin induce learned behaviors that report food deprivation in rats. **NeuroReport**, v. 17, n. 7, p. 733–737, 2006.
- JOSEPH-BRAVO, P. et al. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. **The Journal of endocrinology**, v. 226, n. 2, p. T85–T100, ago. 2015.
- KAGEYAMA, K. et al. Ghrelin stimulates corticotropin-releasing factor and vasopressin gene expression in rat hypothalamic 4B cells. **Stress**, v. 14, n. 5, p. 520–529, set. 2011.
- KAGEYAMA, K. et al. Dexamethasone stimulates the expression of ghrelin and its receptor in rat hypothalamic 4B cells. **Regulatory Peptides**, v. 174, n. 1–3, p. 12–17, 2012.
- KAMEGAI, J. et al. Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. **Endocrinology**, v. 141, n. 12, p. 4797–800, dez. 2000.

- KAMEGAI, J. et al. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. **Diabetes**, v. 50, n. 11, p. 2438–43, nov. 2001.
- KAWAKAMI, A. et al. Leptin inhibits and ghrelin augments hypothalamic noradrenaline release after stress. **Stress**, v. 11, n. 5, p. 363–369, 2008.
- KELLER-WOOD, M. Hypothalamic-Pituitary--Adrenal Axis-Feedback Control. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 3, p. 1161–82, 1 jul. 2015.
- KLUGE, M. et al. Ghrelin affects the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in humans by increasing free thyroxine and decreasing TSH in plasma. **European journal of endocrinology**, v. 162, n. 6, p. 1059–65, jun. 2010.
- KLUGE, M. et al. Ghrelin suppresses nocturnal secretion of luteinizing hormone (LH) and thyroid stimulating hormone (TSH) in patients with major depression. **Journal of psychiatric research**, v. 47, n. 9, p. 1236–9, set. 2013.
- KOBELT, P. et al. CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 288, n. 3, p. R751-8, 2005.
- KOBELT, P. et al. Bombesin, but not amylin, blocks the orexigenic effect of peripheral ghrelin. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 291, n. 4, p. R903-13, 2006.
- KOBELT, P. et al. Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. **Brain research**, v. 1204, n. 1, p. 77–86, 14 abr. 2008.
- KOJIMA, M. et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 656–60, 9 dez. 1999.
- KOKKINOS, A. et al. Possible implications of leptin, adiponectin and ghrelin in the regulation of energy homeostasis by thyroid hormone. **Endocrine**, v. 32, n. 1, p. 30–2, ago. 2007.
- KOLA, B. et al. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. **PLoS ONE**, v. 3, n. 3, p. e1797, 12 mar. 2008.
- KORDI, F.; KHAZALI, H. The effect of ghrelin and estradiol on mean concentration of thyroid hormones. **International journal of endocrinology and metabolism**, v. 13, n. 1, p. e17988, jan. 2015.
- KRASHES, M. J. et al. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 4, p. 1424–8, abr. 2011.
- KUO, Y.-T. et al. The Temporal Sequence of Gut Peptide CNS Interactions Tracked In Vivo by Magnetic Resonance Imaging. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 45, p. 12341–12348, 7 nov. 2007.
- LATCHFORD, K. J.; FERGUSON, A. V. ANG II-induced excitation of paraventricular nucleus magnocellular neurons: a role for glutamate interneurons. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 286, n. 5, p. R894-902, maio 2004.
- LAWRENCE, C. B. et al. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and

- activate brain appetite centers. **Endocrinology**, v. 143, n. 1, p. 155–62, jan. 2002.
- LÓPEZ SOTO, E. J. et al. Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impairs CaV2.1 and CaV2.2 currents in hypothalamic neurons. **The Journal of general physiology**, v. 146, n. 3, p. 205–19, set. 2015.
- LOZIĆ, M. et al. Over-expression of V1A receptors in PVN modulates autonomic cardiovascular control. **Pharmacological research**, v. 114, p. 185–195, dez. 2016.
- LUO, S. X. et al. Regulation of feeding by somatostatin neurons in the tuberal nucleus. **Science**, v. 361, n. 6397, p. 76–81, 2018.
- LUTHER, J. A. et al. Neurosecretory and non-neurosecretory parvocellular neurones of the hypothalamic paraventricular nucleus express distinct electrophysiological properties. **Journal of neuroendocrinology**, v. 14, n. 12, p. 929–32, dez. 2002.
- LUTTER, M. et al. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. **Nature neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 752–3, jul. 2008.
- MAHMOUDI, F. et al. The effect of central injection of ghrelin and bombesin on mean plasma thyroid hormones concentration. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 10, n. 3, p. 627–32, 2011.
- MALAGÓN, M. M. et al. Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5372–80, dez. 2003.
- MANI, B. K. et al. Neuroanatomical characterization of a growth hormone secretagogue receptor-green fluorescent protein reporter mouse. **The Journal of comparative neurology**, v. 522, n. 16, p. 3644–66, 1 nov. 2014.
- MANISCALCO, J. W. et al. Negative Energy Balance Blocks Neural and Behavioral Responses to Acute Stress by “Silencing” Central Glucagon-Like Peptide 1 Signaling in Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 30, p. 10701–10714, 29 jul. 2015.
- MANO-OTAGIRI, A. et al. Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. **Journal of Endocrinology**, v. 201, n. 3, p. 341–349, jun. 2009.
- MAO, Y.; TOKUDOME, T.; KISHIMOTO, I. Ghrelin and Blood Pressure Regulation. **Current hypertension reports**, v. 18, n. 2, p. 15, fev. 2016.
- MARTIN-IVERSON, M. T.; STEVENSON, K. N. Apomorphine effects on emotional modulation of the startle reflex in rats. **Psychopharmacology**, v. 181, n. 1, p. 60–70, ago. 2005.
- MATSUMURA, K. et al. Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 40, n. 5, p. 694–9, nov. 2002.
- MCILWAIN, K. L. et al. The use of behavioral test batteries: effects of training history. **Physiology & behavior**, v. 73, n. 5, p. 705–17, ago. 2001.
- MECAWI, A. DE S. et al. Neuroendocrine Regulation of Hydromineral Homeostasis. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 3, p. 1465–516, 1 jul. 2015.
- MELIS, M. R. R. R. et al. Ghrelin injected into the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats induces feeding but not penile erection. **Neuroscience Letters**, v. 329, n. 3, p. 339–343, 6 set. 2002.

- MENYHÉRT, J. et al. Distribution of ghrelin-immunoreactive neuronal networks in the human hypothalamus. **Brain Research**, v. 1125, n. 1, p. 31–36, 2006.
- MIETLICKI, E. G.; NOWAK, E. L.; DANIELS, D. The effect of ghrelin on water intake during dipsogenic conditions. **Physiology & behavior**, v. 96, n. 1, p. 37–43, 8 jan. 2009.
- MITCHELL, V. et al. Comparative distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) in *Microcebus murinus* (Primate, lemurian) and rat forebrain and pituitary. **The Journal of comparative neurology**, v. 429, n. 3, p. 469–89, 15 jan. 2001.
- MIYATA, S. New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 390, 2015.
- MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289–295, 21 set. 2006.
- MOZID, A. M. et al. Ghrelin is released from rat hypothalamic explants and stimulates corticotrophin-releasing hormone and arginine-vasopressin. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 35, n. 8, p. 455–9, ago. 2003.
- MÜLLER, T. D. et al. Ghrelin. **Molecular Metabolism**, v. 4, n. 6, p. 437–460, jun. 2015.
- NAKAZATO, M. et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 194–8, 11 jan. 2001.
- NEMOTO, T. et al. The effects of ghrelin/GHSs on AVP mRNA expression and release in cultured hypothalamic cells in rats. **Peptides**, v. 32, n. 6, p. 1281–8, jun. 2011.
- OLSON, B. R. et al. Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. **Peptides**, v. 12, n. 1, p. 113–8, 1991.
- OLSZEWSKI, P. K. et al. Neural basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus. **Peptides**, v. 24, n. 4, p. 597–602, 2003a.
- OLSZEWSKI, P. K. et al. Hypothalamic paraventricular injections of ghrelin: Effect on feeding and c-Fos immunoreactivity. **Peptides**, v. 24, n. 6, p. 919–923, jun. 2003b.
- OLSZEWSKI, P. K. et al. α -Melanocyte stimulating hormone and ghrelin: Central interaction in feeding control. **Peptides**, v. 28, n. 10, p. 2084–2089, 2007a.
- OLSZEWSKI, P. K. et al. Intraventricular ghrelin activates oxytocin neurons: implications in feeding behavior. **Neuroreport**, v. 18, n. 5, p. 499–503, 26 mar. 2007b.
- PARK, J. B. et al. Dual GABAA receptor-mediated inhibition in rat presympathetic paraventricular nucleus neurons. **The Journal of physiology**, v. 582, n. Pt 2, p. 539–51, 15 jul. 2007.
- PATTERSON, Z. R. et al. Interruption of ghrelin signaling in the PVN increases high-fat diet intake and body weight in stressed and non-stressed C57BL/6J male mice. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, n. 7 SEP, p. 1–7, 2013a.
- PATTERSON, Z. R. et al. Central ghrelin signaling mediates the metabolic response of C57BL/6 male mice to chronic social defeat stress. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p. 1080–1091, 2013b.
- PEKARY, A. E.; SATTIN, A. Rapid modulation of TRH and TRH-like peptide release in rat

brain and peripheral tissues by ghrelin and 3-TRP-ghrelin. **Peptides**, v. 36, n. 2, p. 157–67, ago. 2012.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–67, ago. 1985.

PERELLO, M. et al. Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. **The Journal of comparative neurology**, v. 520, n. 2, p. 281–94, 1 fev. 2012.

PERELLO, M.; DICKSON, S. L. Ghrelin signalling on food reward: a salient link between the gut and the mesolimbic system. **Journal of neuroendocrinology**, v. 27, n. 6, p. 424–34, jun. 2015.

PERELLO, M.; RAINGO, J. Leptin activates oxytocin neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in both control and diet-induced obese rodents. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59625, 2013.

PIRES DA SILVA, M. et al. Nitric Oxide Modulates HCN Channels in Magnocellular Neurons of the Supraoptic Nucleus of Rats by an S-Nitrosylation-Dependent Mechanism. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 36, n. 44, p. 11320–11330, 2 nov. 2016.

PIRNIK, Z. et al. Ghrelin agonists impact on Fos protein expression in brain areas related to food intake regulation in male C57BL/6 mice. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 6, p. 889–895, 2011.

PRICE, C. J.; HOYDA, T. D.; FERGUSON, A. V. The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 14, n. 2, p. 182–94, abr. 2008.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 28 fev. 2003.

PU, S. et al. Interactions between neuropeptide Y and gamma-aminobutyric acid in stimulation of feeding: a morphological and pharmacological analysis. **Endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 933–40, fev. 1999.

PULMAN, K. J. et al. The subfornical organ: a central target for circulating feeding signals. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 7, p. 2022–30, 15 fev. 2006.

REX, A. et al. Pharmacological Evaluation of a Modified Open-Field Test Sensitive to Anxiolytic Drugs. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, n. 3, p. 677–683, mar. 1998.

RIBEIRO, L. F. et al. Ghrelin triggers the synaptic incorporation of AMPA receptors in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 1, p. E149-58, 7 jan. 2014.

RIIS, A. L. D. et al. Hyperthyroidism is associated with suppressed circulating ghrelin levels. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 88, n. 2, p. 853–7, fev. 2003.

RIOUX, V. Fatty acid acylation of proteins: specific roles for palmitic, myristic and caprylic

acids. **OCL**, v. 23, n. 3, p. D304, 10 maio 2016.

RÖJDMARK, S. et al. Hunger-satiety signals in patients with Graves' thyrotoxicosis before, during, and after long-term pharmacological treatment. **Endocrine**, v. 27, n. 1, p. 55–61, jun. 2005.

ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 423–33, jun. 2009.

RUSSO, C. et al. Hippocampal Ghrelin-positive neurons directly project to arcuate hypothalamic and medial amygdaloid nuclei. Could they modulate food-intake? **Neuroscience letters**, v. 653, p. 126–131, 13 jul. 2017.

RÜTER, J. et al. Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. **Brain Research**, v. 991, n. 1–2, p. 26–33, 21 nov. 2003.

SÁRVÁRI, M. et al. Ghrelin modulates the fMRI BOLD response of homeostatic and hedonic brain centers regulating energy balance in the rat. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

SATO, T. et al. Structure, regulation and function of ghrelin. **Journal of biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 119–28, mar. 2012.

SATOU, M. et al. Identification and characterization of acyl-protein thioesterase 1/lysophospholipase I as a ghrelin deacylation/lysophospholipid hydrolyzing enzyme in fetal bovine serum and conditioned medium. **Endocrinology**, v. 151, n. 10, p. 4765–75, out. 2010.

SCHAEFFER, M. et al. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 4, p. 1512–1517, 2013.

SCHMIDT, M. V. et al. Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, n. 11, p. 865–874, 2006.

SCHUHLER, S. et al. Thyrotrophin-releasing hormone decreases feeding and increases body temperature, activity and oxygen consumption in Siberian hamsters. **Journal of neuroendocrinology**, v. 19, n. 4, p. 239–49, abr. 2007.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661–71, 6 abr. 2000.

SCOTT, V.; MCDADE, D. M.; LUCKMAN, S. M. Rapid changes in the sensitivity of arcuate nucleus neurons to central ghrelin in relation to feeding status. **Physiology and Behavior**, v. 90, n. 1, p. 180–185, 2007.

SHARP, B. M. Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction. **Translational psychiatry**, v. 7, n. 8, p. e1194, 8 ago. 2017.

SHRESTHA, Y. B.; WICKWIRE, K.; GIRAUDO, S. Q. Action of MT-II on ghrelin-induced feeding in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **NeuroReport**, v. 15, n. 8, p. 1365–1367, 7 jun. 2004.

SHRESTHA, Y. B.; WICKWIRE, K.; GIRAUDO, S. Q. Role of AgRP on Ghrelin-induced feeding in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Regulatory Peptides**, v. 133, n. 1–3, p. 68–73, 2006.

- SHRESTHA, Y. B. Y.; WICKWIRE, K.; GIRAUDO, S. Effect of reducing hypothalamic ghrelin receptor gene expression on energy balance. **Peptides**, v. 30, n. 7, p. 1336–1341, jul. 2009.
- SIMMONS, D. M.; SWANSON, L. W. High-resolution paraventricular nucleus serial section model constructed within a traditional rat brain atlas. **Neuroscience letters**, v. 438, n. 1, p. 85–9, 13 jun. 2008.
- SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 383–95, 2006.
- SO, M. et al. Inhibition of ghrelin-induced feeding in rats by pretreatment with a novel dual orexin receptor antagonist. **Journal of Physiological Sciences**, v. 68, n. 2, p. 129–136, 2018.
- SOBRINO CRESPO, C. et al. Peptides and food intake. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, n. APR, p. 58, jan. 2014.
- SOLOMON, A.; DE FANTI, B. A.; ALFREDO MARTÍNEZ, J. Peripheral Ghrelin participates in glucostatic feeding mechanisms and in the anorexigenic signalling mediated by CART and CRF neurons. **Nutritional Neuroscience**, v. 8, n. 5–6, p. 287–295, 2 out. 2005.
- SOMINSKY, L. et al. Early life disruption to the ghrelin system with over-eating is resolved in adulthood in male rats. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 21–30, fev. 2017.
- SOMINSKY, L.; SPENCER, S. J. Eating behavior and stress: A pathway to obesity. **Frontiers in Psychology**, v. 5, n. MAY, p. 1–8, 2014.
- SON, S. J. et al. Dendritic peptide release mediates interpopulation crosstalk between neurosecretory and preautonomic networks. **Neuron**, v. 78, n. 6, p. 1036–49, 19 jun. 2013.
- SORIA-GÓMEZ, E. et al. Cannabinoid type-1 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit stimulated food intake. **Neuroscience**, v. 263, p. 46–53, 2014.
- SOSIĆ-JURJEVIĆ, B. et al. Central ghrelin affects pituitary-thyroid axis: histomorphological and hormonal study in rats. **Neuroendocrinology**, v. 89, n. 3, p. 327–36, 2009.
- SPENCER, S. J. et al. Ghrelin regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and restricts anxiety after acute stress. **Biological Psychiatry**, v. 72, n. 6, p. 457–465, 15 set. 2012.
- SPENCER, S. J. et al. Ghrelin's Role in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Stress Response: Implications for Mood Disorders. **Biological psychiatry**, v. 78, n. 1, p. 19–27, 1 jul. 2015.
- SPETTER, M. S.; HALLSCHMID, M. Current findings on the role of oxytocin in the regulation of food intake. **Physiology & behavior**, v. 176, p. 31–39, 1 jul. 2017.
- STARK, R. et al. Des-acyl ghrelin and ghrelin O-acyltransferase regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and anxiety in response to acute stress. **Endocrinology**, v. 157, n. 10, p. 3946–3957, 2016.
- STEIN, M. B. et al. Increased amygdala and insula activation during emotion processing in anxiety-prone subjects. **The American journal of psychiatry**, v. 164, n. 2, p. 318–27, 1 fev. 2007.
- STERN, J. E. Electrophysiological and morphological properties of pre-autonomic neurones in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. **The Journal of physiology**, v. 537, n. Pt 1,

p. 161–77, 15 nov. 2001.

STERN, J. E. Neuroendocrine-autonomic integration in the paraventricular nucleus: novel roles for dendritically released neuropeptides. **Journal of neuroendocrinology**, v. 27, n. 6, p. 487–97, jun. 2015.

STEWART, C. A. et al. Central administration of thyrotropin releasing hormone (TRH) and related peptides inhibits feeding behavior in the Siberian hamster. **Neuroreport**, v. 14, n. 5, p. 687–91, 15 abr. 2003.

SUTTON, A. K.; MYERS, M. G.; OLSON, D. P. The Role of PVH Circuits in Leptin Action and Energy Balance. **Annual Review of Physiology**, v. 78, n. 1, p. 207–221, 10 fev. 2016.

SZENTIRMAI, E. et al. Ghrelin microinjection into forebrain sites induces wakefulness and feeding in rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 292, n. 1, p. R575-85, jan. 2007.

TAKAYA, K. et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 85, n. 12, p. 4908–11, dez. 2000.

TANIDA, M. et al. Involvement of the histaminergic system in renal sympathetic and cardiovascular responses to leptin and ghrelin. **Neuroscience letters**, v. 413, n. 1, p. 88–92, 8 fev. 2007.

TASKER, J. G.; DUDEK, F. E. Electrophysiological properties of neurones in the region of the paraventricular nucleus in slices of rat hypothalamus. **The Journal of physiology**, v. 434, p. 271–93, mar. 1991.

TER HORST, G. J. et al. Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. **Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 785–97, 1989.

THEANDER-CARRILLO, C. et al. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 7, p. 1983–93, jul. 2006.

THOMAS, M. A.; RYU, V.; BARTNESS, T. J. Central ghrelin increases food foraging/hoarding that is blocked by GHSR antagonism and attenuates hypothalamic paraventricular nucleus neuronal activation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 310, n. 3, p. R275–R285, 1 fev. 2016.

TOLLE, V. et al. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with gh, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, p. 1353–1361, abr. 2002.

TORRES, P. J. et al. The role of intragestational ghrelin on postnatal development and reproductive programming in mice. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 156, n. 4, p. 331–341, 1 out. 2018.

TSCHÖP, M. et al. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v. 407, n. 6806, p. 908–913, 19 out. 2000.

TSUJII, S.; BRAY, G. A. GABA-related feeding control in genetically obese rats. **Brain research**, v. 540, n. 1–2, p. 48–54, 1 fev. 1991.

TUCCI, S. A. et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. **British journal of pharmacology**, v. 143, n.

5, p. 520–3, nov. 2004.

URIARTE, M. et al. Evidence Supporting a Role for the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Transporting Circulating Ghrelin into the Brain. **Molecular neurobiology**, v. 3, n. 10, p. 3323–31, 2 out. 2018.

VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 18, n. 2, p. 158–168, 2008.

VILA, G. et al. Systemic administration of oxytocin reduces basal and lipopolysaccharide-induced ghrelin levels in healthy men. **The Journal of endocrinology**, v. 203, n. 1, p. 175–9, out. 2009.

VOIGT, J.-P.; FINK, H. Serotonin controlling feeding and satiety. **Behavioural brain research**, v. 277, p. 14–31, 15 jan. 2015.

WANG, J. et al. Effects of ghrelin, corticotrophin-releasing hormone, and melanotan-II on food intake in rats with paraventricular nucleus lesions. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 115, n. 10, p. 669–673, nov. 2007.

WANG, J. et al. Neuropeptide γ loses its orexigenic effect in rats with lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrine Research**, v. 38, n. 1, p. 8–14, 17 maio 2013.

WANG, Y. et al. Extrinsic ghrelin in the paraventricular nucleus increases small intestinal motility in rats by activating central growth hormone secretagogue and enteric cholinergic receptors. **Peptides**, v. 74, p. 43–9, dez. 2015.

WAUSON, S. E. R. et al. Midbrain raphe 5-HT_{1A} receptor activation alters the effects of ghrelin on appetite and performance in the elevated plus maze. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 29, n. 7, p. 836–44, jul. 2015.

WHITLOCK, G. et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. **Lancet**, v. 373, n. 9669, p. 1083–96, 28 mar. 2009.

WREN, A. M. et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 4325–8, nov. 2000.

WREN, A. M. et al. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. **Diabetes**, v. 50, n. 11, p. 2540–7, nov. 2001.

WREN, A. M. et al. The hypothalamic mechanisms of the hypophysiotropic action of ghrelin. **Neuroendocrinology**, v. 76, n. 5, p. 316–24, nov. 2002.

XU, J. et al. P2X₄ Receptor Reporter Mice: Sparse Brain Expression and Feeding-Related Presynaptic Facilitation in the Arcuate Nucleus. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 34, p. 8902–8920, 2016.

YASUDA, T. et al. Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. **Neuroscience letters**, v. 349, n. 2, p. 75–8, 2 out. 2003.

YI, C.-X.; TSCHÖP, M. H. Brain-gut-adipose-tissue communication pathways at a glance. **Disease models & mechanisms**, v. 5, n. 5, p. 583–7, set. 2012.

YOKOTE, R. et al. Molecular cloning and gene expression of growth hormone-releasing peptide receptor in rat tissues. **Peptides**, v. 19, n. 1, p. 15–20, 1998.

YOKOYAMA, T. et al. Ghrelin Potentiates Miniature Excitatory Postsynaptic Currents in Supraoptic Magnocellular Neurons. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 11, p. 910–920, nov. 2009.

ZHANG, J. et al. Optimal locations and parameters of gastric electrical stimulation in altering ghrelin and oxytocin in the hypothalamus of rats. **Neuroscience Research**, v. 62, n. 4, p. 262–269, dez. 2008.

ZHANG, L. et al. Thirst Is Associated with Suppression of Habenula Output and Active Stress Coping: Is there a Role for a Non-canonical Vasopressin-Glutamate Pathway? **Frontiers in neural circuits**, v. 10, p. 13, 2016.

ZHANG, X.; VAN DEN POL, A. N. Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 1341–1347, 2016.

ZIGMAN, J. M. et al. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 494, n. 3, p. 528–48, 2006.

Anexo A – Artigo publicado na revista *Frontiers in Cellular Neurosciences*.



Electrophysiological Effects of Ghrelin in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Neurons

Raoni C. dos-Santos¹, Hanna M. Grover², Luís C. Reis¹, Alastair V. Ferguson^{2†} and André S. Mecawi^{1,3*†}

¹ Department of Physiological Sciences, Institute of Biological and Health Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil, ² Centre for Neuroscience Studies, Queen's University, Kingston, ON, Canada, ³ Department of Biophysics, Paulista School of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Marco Mainardi,
Scuola Normale Superiore di Pisa,
Italy

Reviewed by:

Valery Grinevich,
Helmholtz-Gemeinschaft Deutscher
Forschungszentren (HZ), Germany
De-Pei Li,
The University of Texas MD Anderson
Cancer Center, United States

*Correspondence:

André S. Mecawi
mecawi@unifesp.br

†Joint senior authors

Received: 15 May 2018

Accepted: 07 August 2018

Published: 24 August 2018

Citation:

dos-Santos RC, Grover HM,
Reis LC, Ferguson AV and
Mecawi AS (2018)
Electrophysiological Effects of Ghrelin
in the Hypothalamic Paraventricular
Nucleus Neurons.

Front. Cell. Neurosci. 12:275.
doi: 10.3389/fncel.2018.00275

The paraventricular nucleus (PVN) is involved in the control of sympathetic tone and the secretion of hormones, both functions known to be influenced by ghrelin, suggesting direct effect of ghrelin in this nucleus. However, the effects of ghrelin on the excitability of different PVN neuronal populations have not been demonstrated. This study assessed the effects of ghrelin on the activity of PVN neurons, correlating the responses to subpopulations of PVN neurons. We used a 64 multielectrode array to examine the effects of ghrelin administration on extracellular spike frequency in PVN neurons recorded in brain slices obtained from male Sprague-Dawley rats. Bath administration of 10 nM ghrelin increased (29/97, 30%) or decreased (37/97, 38%) spike frequency in PVN neurons. The GABAA and glutamate receptors antagonists abolish the decrease in spike frequency, without changes in the proportion of increases in spike frequency (23/53, 43%) induced by ghrelin. The results indicate a direct effect of ghrelin increasing PVN neurons activity and a synaptic dependent effect decreasing PVN neurons activity. The patch clamp recordings showed similar proportions of PVN neurons influenced by 10 nM ghrelin (33/95, 35% depolarized; 29/95, 30% hyperpolarized). Using electrophysiological fingerprints to identify specific subpopulations of PVN neurons we observed that the majority of pre-autonomic neurons (11/18 -61%) were depolarized by ghrelin, while both neuroendocrine (29% depolarizations, 40% hyperpolarizations), and magnocellular neurons (29% depolarizations, 21% hyperpolarizations) showed mixed responses. Finally, to correlate the electrophysiological response and the neurochemical phenotype of PVN neurons, cell cytoplasm was collected after recordings and RT-PCR performed to assess the presence of mRNA for vasopressin, oxytocin, thyrotropin (TRH) and corticotropin (CRH) releasing hormones. The single-cell RT-PCR showed that most TRH-expressing (4/5) and CRH-expressing (3/4) neurons are hyperpolarized in response to ghrelin. In conclusion, ghrelin either directly increases or indirectly decreases the activity of PVN neurons, this suggests that ghrelin acts on inhibitory PVN neurons that, in turn, decrease the activity of TRH-expressing and CRH-expressing neurons in the PVN.

Keywords: corticotropin-releasing hormone, thyrotropin releasing hormone, vasopressin, oxytocin, appetite regulation, neuroendocrinology

INTRODUCTION

The brain constantly monitors energy balance, changing behavior and energy expenditure as necessary to maintain metabolic status. Hunger is a sensation that arises from caloric deficit and induces food intake in order to re-establish homeostasis (Yi and Tschöp, 2012). One of the modulators of hunger is ghrelin, an orexigenic hormone secreted by the stomach during situations of caloric deficit (Müller et al., 2015). While ghrelin-induced food intake has been demonstrated in rodents and humans (Sato et al., 2012) this peptide also affects functions not directly related to food intake, and has been shown to decrease sympathetic activity (Matsumura et al., 2002; Tanida et al., 2007). In addition, intra-cerebro ventricular (ICV) ghrelin increases plasma vasopressin (AVP) (Ishizaki et al., 2002), and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (Wren et al., 2000, 2002), and decreases thyroid-stimulating hormone (TSH) (Wren et al., 2000). These neuroendocrine effects suggest effects on corticotropin releasing hormone (CRH) and thyrotropin releasing hormone (TRH) neurons in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus. *In vitro*, ghrelin induces AVP and CRH release in hypothalamic explants (Wren et al., 2002; Mozid et al., 2003), and oxytocin (OT) and AVP release in neurohypophyseal cell culture (Gálfí et al., 2016). Food deprivation, which increases ghrelin, reduces TRH (Mori et al., 1988; Blake et al., 1991), and TRH-mRNA levels in the brain decrease after peripheral ghrelin injection, suggesting that TRH neurons are affected by ghrelin (Pekary and Sattin, 2012).

The effects of ghrelin on blood hormone levels and autonomic regulation indicate the PVN as a target nucleus where central ghrelin may act to elicit these effects. The PVN is composed of magnocellular and parvocellular neurons. Magnocellular neurons project to the neurohypophysis where, on depolarization, they release AVP and OT into the systemic circulation. Parvocellular neuroendocrine neurons secrete CRH and TRH into the hypophyseal portal circulation at the median eminence which act in the adenohypophysis to cause release of ACTH and thyrotropin into the general circulation (Stern, 2015). Pre-autonomic parvocellular neurons projecting to the brainstem and spinal cord play critical roles in the regulation of autonomic systems (Stern, 2001) while those that project to other brain regions mediate diverse physiological processes (Knobloch et al., 2012). Thus, the PVN controls sympathetic tone and the secretion of hormones, both functions known to be influenced by ghrelin, suggesting direct effect of ghrelin in this nucleus. In accordance with this hypothesis the growth hormone secretagogue receptor (GHSR), the only described ghrelin receptor (Kojima et al., 1999), is present in the PVN (Cowley et al., 2003; Harrold et al., 2008). In addition, ICV ghrelin binds in the PVN (Cabral et al., 2013) and both ICV (Lawrence et al., 2002; Olszewski et al., 2007; Cabral et al., 2012; Stevanovic et al., 2014) and peripheral (Rüter et al., 2003; Kobelt et al., 2008; Cabral et al., 2012) injections of ghrelin increase the activity of PVN neurons while intra-PVN injection of ghrelin induces feeding (Wren et al., 2001; Melis et al., 2002; Olszewski et al., 2003; Shrestha et al., 2004). Electrophysiological studies have shown that ghrelin reduces inhibitory (Cowley et al., 2003)

and excitatory (Kola et al., 2008) post-synaptic currents in the PVN. It has also been suggested that ghrelin inhibits γ -aminobutyric acid (GABA) releasing PVN neurons, in turn increasing the activity of CRH PVN neurons, an effect that is independent of the arcuate nucleus (ARC) (Cabral et al., 2016).

Taken together, these observations suggest that the PVN mediates, at least some of the central effects of ghrelin, however, the effects of ghrelin on the excitability of different PVN neuronal populations have not been demonstrated. We hypothesized that ghrelin would influence the activity of PVN neurons, and may exert different effects on different subpopulations of neurons within this hypothalamic nucleus.

MATERIALS AND METHODS

Ethical Approval

All animal protocols were approved by the Queen's University Animal Care Committee, conformed to the standards of the Canadian Council on Animal Care and were in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition, NIH, 2011."

Animals

We used 25–30 days old Male Sprague-Dawley rats (Charles River, Quebec, Canada) (50–100 g) for all experiments. Since healthy viable neurons are harder to obtain from brain slices taken from adult animals, our lab (Loewen and Ferguson, 2017) and others (Luther and Tasker, 2000; Ma and Liu, 2012) have previously used juvenile rats to measure the effects of peptides on PVN neurons. However, brain functions may differ between juvenile and adult rats, thus, the age of the animals is a methodological limitation of the study. Animals were housed in a room maintained at 22°C under a 12:12 h light-dark cycle with food and water *ad libitum*. A total of 53 rats were used in these experiments from which hypothalamic brain slices were obtained either for extracellular recordings (9 slices, obtained from 4 rats), or patch clamp (49 rats – 122 neurons, 45 of which were used for RT-PCR analysis). Anesthesia influences PVN neuronal activity (Tanaka et al., 1989) and AVP release (Reed et al., 2009), therefore decapitation was carried out in non-anesthetized animal.

Electrophysiology

Rats were decapitated and the brains were removed and immersed in ice-cold slicing solution (87 NaCl, 2.5 KCl, 25 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 25 glucose and 75 sucrose, in mM) and continuously aerated with 95% O₂/5% CO₂. The brain was blocked and 300 μ m coronal slices containing the PVN were cut using a vibratome (VT1000 S; Leica, Nussloch, Germany). Slices were then incubated at 32°C for at least 1 h in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (124 NaCl, 2.5 KCl, 20 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 1.24 KH₂PO₄ and 10 glucose, in mM), after which they were used for extracellular or intracellular recordings.

Extracellular Recordings

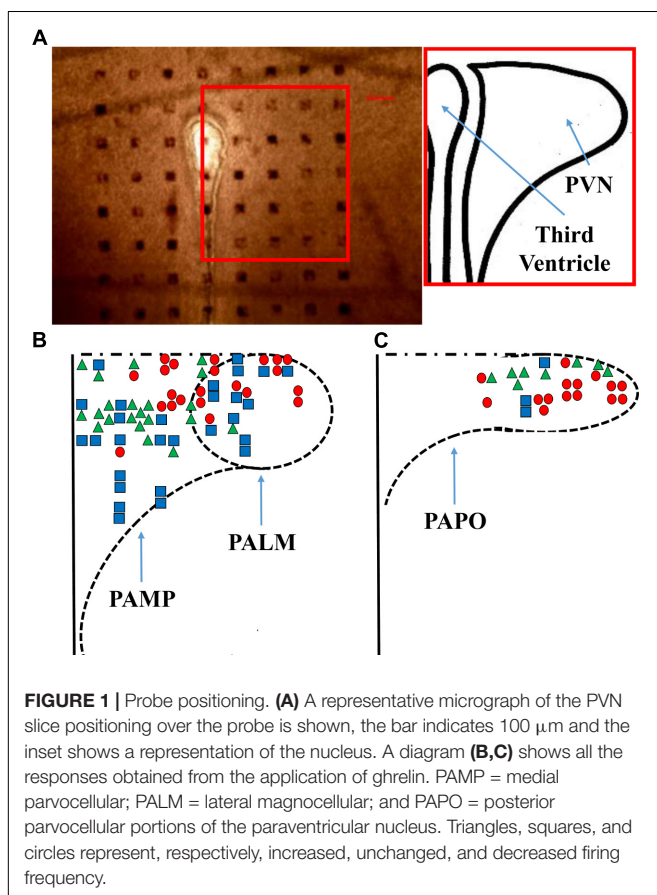
Extracellular recordings were performed on planar-multielectrode array (MED-64 system; Alpha MED Sciences, Osaka, Japan). An 1 mm 8×8 electrode arrangement, with $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ electrodes and a $150 \mu\text{m}$ distance between electrodes was used. Signals were recorded at a sampling rate of 20 kHz and 16-bit resolution. Slices were placed on the probe, submerged in carbogenated aCSF and held in place by a small weight with a net. The correct placement of the slice was assessed on a microscope, a representation of the PVN placement over the probe is shown (**Figure 1**). Then the probe was connected to the MED64 system, in which a flow of 1–2 ml/min of carbogenated aCSF, heated to 35°C was maintained. After a stabilization period of 10 min, baseline activity was recorded for at least 5 min. Then, 10 nM ghrelin, diluted in aCSF, was applied for 2 min and recording proceeded for an additional 30 min. Channels positioned over the PVN that showed activity during the experiment were analyzed. Mobius software (Alpha MED Sciences, Osaka, Japan) was used to automatically sort spike shapes and identify neurons within each channel, the threshold of detection was set above noise levels for each channel (ranging from $|10|$ to $|13| \mu\text{V}$) and spikes with a similarity greater than 60% that appeared a minimum of 100 times were considered. Spike frequency for individual neurons was plotted in bins of 30 s. 4 min immediately before ghrelin hits the bath and 4 min

of peak effect were compared and neurons were classified as affected by ghrelin when application changed firing rate by more than $\pm 20\%$ of mean baseline (Yousheng et al., 2008).

In order to assess whether ghrelin effects were direct or dependent on prior activation of glutamatergic or GABAergic neurons, the effects of ghrelin were assessed in the presence of $10 \mu\text{M}$ bicuculline methiodide and kynurenic acid, respectively, GABAA and glutamate receptor antagonists (Latchford and Ferguson, 2004). After 10 min of stabilization, baseline was recorded for 5 min after which aCSF was changed to aCSF with antagonists. After 5 min, ghrelin 10 nM diluted in aCSF with antagonists, was applied for 2 min and the responses were analyzed as previously described.

Intracellular Recordings

Patch electrodes were manufactured with borosilicate glass (World Precision Instruments, Sarasota, FL, United States) pulled by a micropipette puller (P-97; Sutter Instrument, Novato, CA, United States) and filled with intracellular solution (125 potassium gluconate, 10 KCl, 2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 5.5 EGTA, 10 HEPES, 2 NaATP, and adjusted to pH 7.2 with KOH, in mM). Micropipettes with resistances between 3 and 5 M Ω were used. Slices containing the PVN were transferred to a recording chamber continuously perfused with carbogenated aCSF, heated to 35°C at flow between 1.5 and 2 ml/min and used for whole-cell current clamp recording. Neurons were visualized using a $40\times$ water immersion objective mounted on an upright microscope with differential interference contrast optics (Scientifica, East Sussex, United Kingdom). A seal of at least 1 G Ω resistance was achieved, then brief suction was applied to rupture the membrane and obtain whole cell access. Whole cell recordings were obtained using a MultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, United States), with a sampling rate of 10 kHz, filtered at 2.4 kHz, using a Micro1401 mk II interface and Spike2 software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, United Kingdom) for offline analysis. Neurons were classified in accordance with membrane potential responses to hyperpolarizing pulse protocols. Neurons with a large A-current were classified as magnocellular (Tasker and Dudek, 1991), neurons with low-threshold calcium spikes were classified as pre-autonomic (Stern, 2001) and neurons with neither of these characteristics were classified as neuroendocrine (Luther et al., 2002). Following a minimum 5 min stable baseline recording of membrane potential ghrelin diluted in aCSF was applied to the slices for 2 min and the responses were recorded until a return to baseline or loss of G Ω seal. Effects of ghrelin were assessed by comparison of the mean membrane potential during the 100 s immediately prior to ghrelin application with the 100 s of peak effect within 10 the minutes following peptide application. The effects of ghrelin on membrane potential were considered significant if the change was greater than 2 mV and two times baseline SD. A liquid junction potential of 15 mV was subtracted from all reported membrane potentials.



Single Cell RT-PCR

Single cell RT-PCR was carried out as previously described (Pires da Silva et al., 2016). In short, immediately after

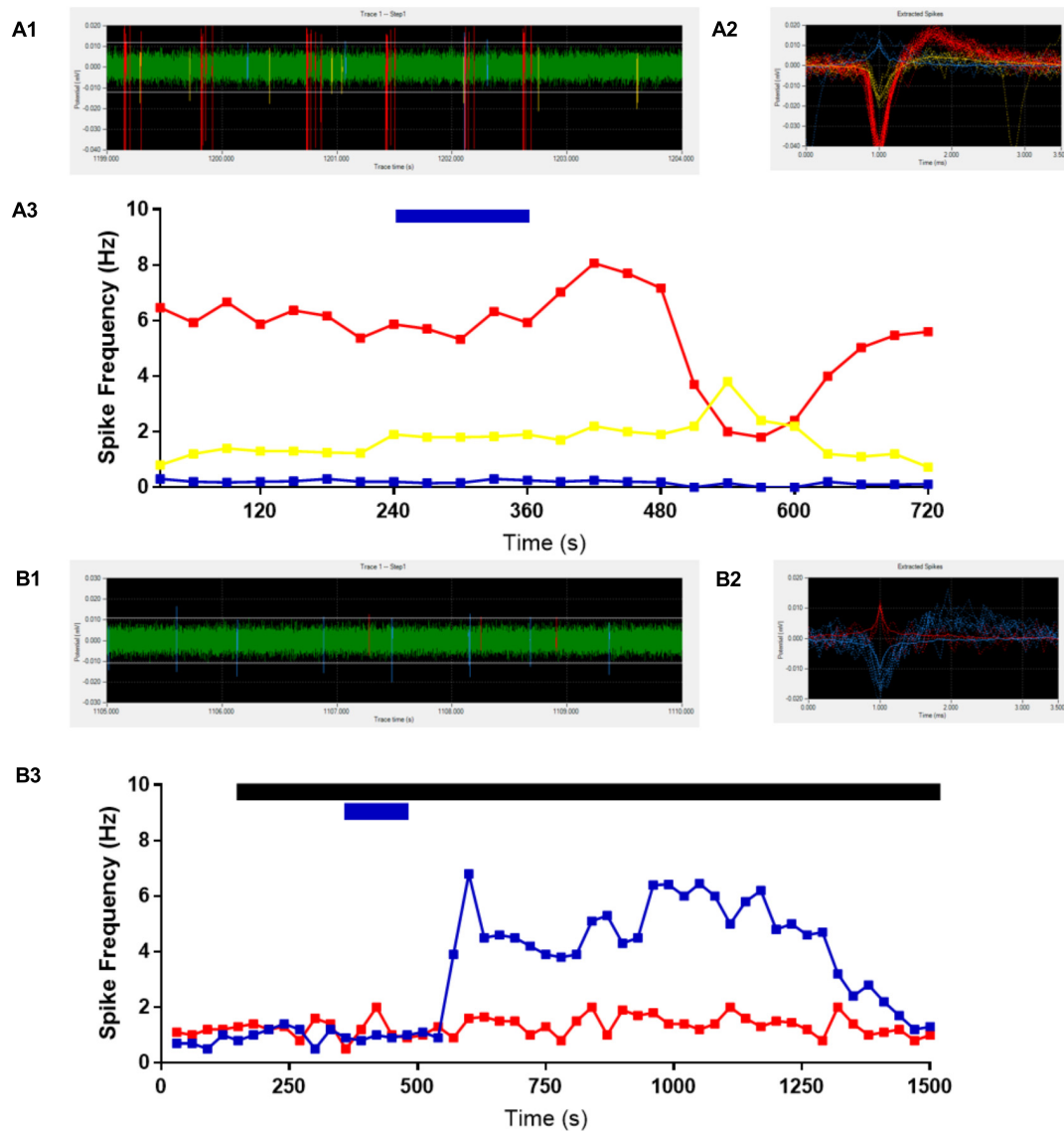


FIGURE 2 | Representative extracellular recordings. Channels with detectable spikes and correct positioning were selected for analysis. One channel is shown as representative (**A**), 3 neurons were identified (**A1,A2**) and ghrelin application decreased (red line), increased (yellow line) or did not change (blue line) firing frequency (1/3 each) (**A3**). The addition of GABAA and Glutamate receptor antagonists to the bath (black bar) abolishes the decreases in activity due to 10 nM ghrelin application (blue bar). Another representative recording is shown (**B**), in which two neurons were identified in the trace (**B1,B2**). Ghrelin increased firing frequency in one (blue line) and did not affect the other (red line) (**B3**).

electrophysiological recording the content of the micropipette was collected and used for cDNA generation with High Capacity cDNA Reverse transcription kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States), followed by a pre-amplification step with TaqMan Pre-Amp Master Mix Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States), and the probes for vasopressin (Rn00566449_m1), oxytocin (Rn00564446_g1), CRH (Rn01462137_m1), TRH (Rn00564880_m1), and β -Actin (Rn00667869_m1). Then, RT-PCR was performed in simplex and triplicates, using the aforementioned probes and TaqMan Universal PCR Master Mix kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States). All reactions were carried out according to manufacturers recommendations and

β -Actin was used as an endogenous control. Samples in which β -Actin was not present were removed from the analysis and the remainder were classified by the presence of mRNA for the target genes. The mRNA was considered as present when the amplification threshold occurred before cycle 36.

Chemicals and Drugs

All solutions were prepared on the day of the experiment. Ghrelin was purchased from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, United States); all RT-PCR reagents were purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA, United States); bicuculline methiodide, kynurenic acid and all salts used for the

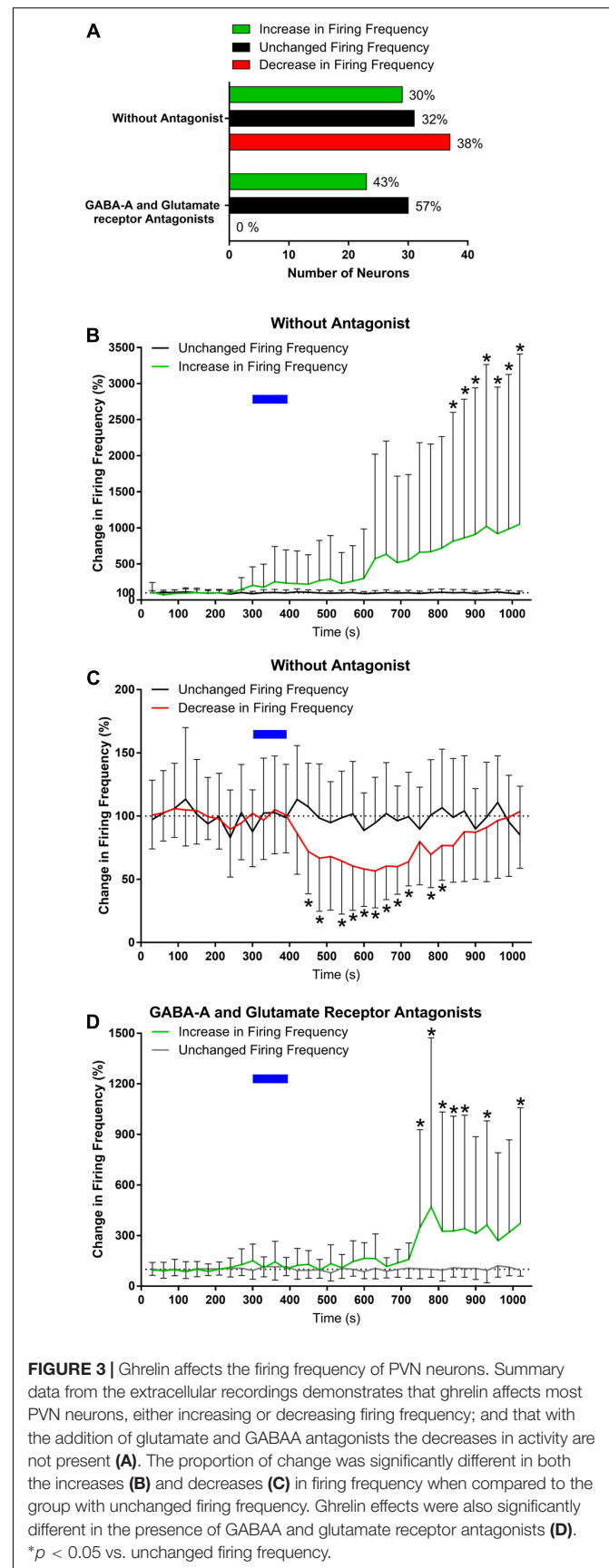
preparation of aCSF, slicing solution and intracellular solution were purchased from Sigma Pharmaceuticals (Oakville, ON, Canada).

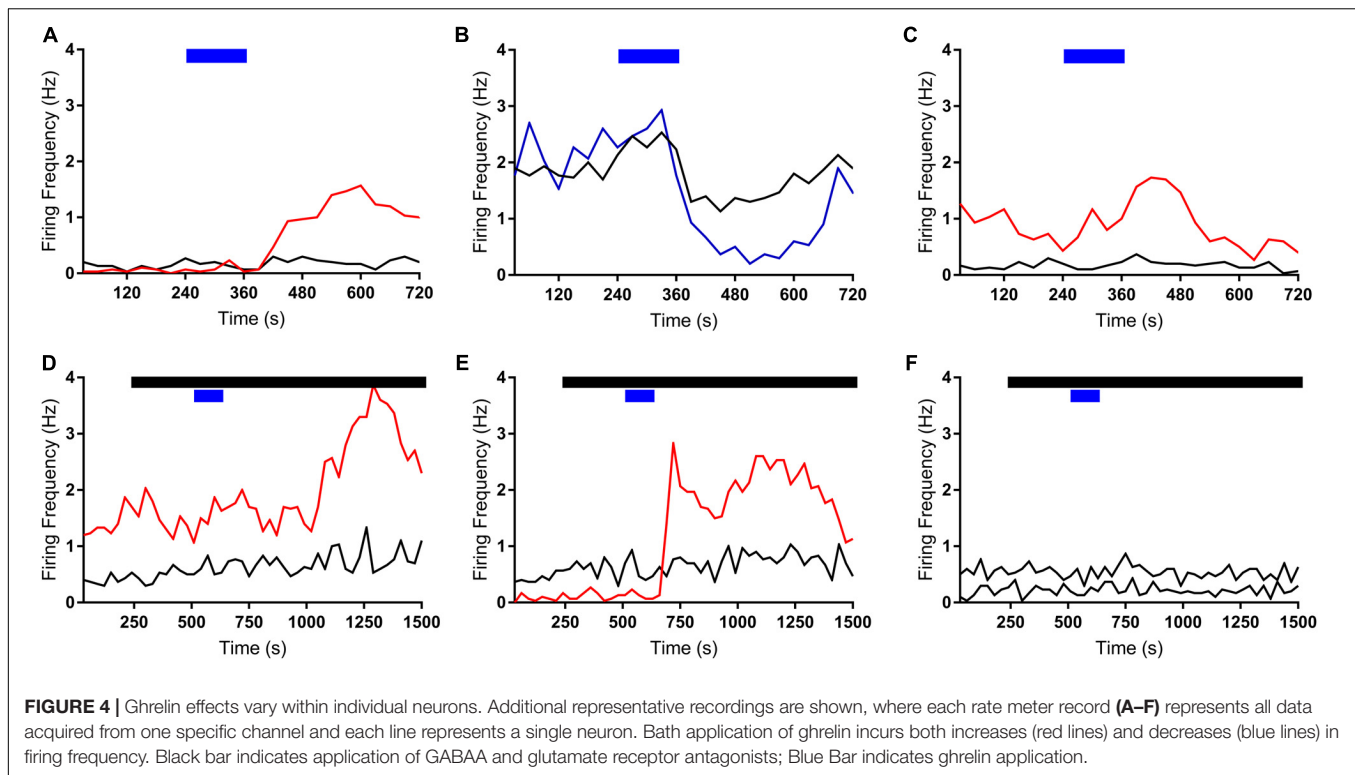
Statistical Analysis

GraphPad Prism v. 7.0 was used for all statistical analyses. Proportions were compared with Chi-Square test. Magnitudes were compared with one-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test. The duration of effects was compared with unpaired *t*-test or one-way analysis of variance where appropriate. The proportional changes in firing frequency were compared with two-way analysis of variance followed by Sidak *post hoc* test. Statistical significance was set at $p < 0.05$ and all data is described as mean \pm standard deviation.

RESULTS

We first assessed the effects of ghrelin on extracellular spike frequency in PVN neurons in extracellular recordings obtained from 10 different hypothalamic slices. Only channels in which spikes were detectable and the PVN was correctly placed above the probes were analyzed. Channels outside of the PVN seldom showed spikes. A representative analysis (**Figure 2**) shows examples of 1 channel in one specific recording where extracellular spikes were detectable (**Figure 2A**); the detection threshold was set above noise values individually for each channel (**Figure 2A1**). The software then detects individual neurons based on the shape of the spikes (**Figure 2A2**). The firing frequency for each neuron was plotted in 30 s bins and the response to 10 nM ghrelin was observed (**Figure 2A3**). In the representative channel (**Figure 2A**), 3 neurons were recorded of which 1 neuron increased, 1 decreased, and 1 showed no change in spike frequency. In total (**Figure 3A**), 48 channels detected spikes in 7 slices, in which 1–3 neurons/channel were identified. A total of 97 neurons were recorded, of which 29 (30%) increased firing frequency and 37 (38%) decreased firing frequency in response to bath administration of 10 nM ghrelin. In a second series of recordings we assessed whether the responses to ghrelin were dependent on the modulation of glutamatergic or GABAergic neurotransmission by examining the effects of ghrelin in the presence of 10 μ M bicuculline methiodide and kynurenic acid. In these recordings 27 channels detected spikes in 2 slices, in which 1–2 neurons/channel were identified, as illustrated in **Figure 2B**, single channels recorded neurons which were either depolarized or unaffected, but no cells in which spike frequency was inhibited (**Figure 2B3**). A total of 53 neurons were recorded (**Figure 3A**), of which 23 (43%) increased firing frequency and 30 (57%) were not affected by bath administration of ghrelin. These proportions of neurons responding to ghrelin were significantly different in the presence of glutamate and GABAA antagonists (Chi-square = 27.14, $df = 2$, $p < 0.001$). This indicates that GABAA and/or glutamate receptors activation is necessary for ghrelin to decrease the activity of PVN neurons. Additional representative channels showing the response to ghrelin in the absence (**Figures 4A–C**) or presence (**Figures 4D–F**) of GABAA and glutamate receptor antagonists demonstrate that



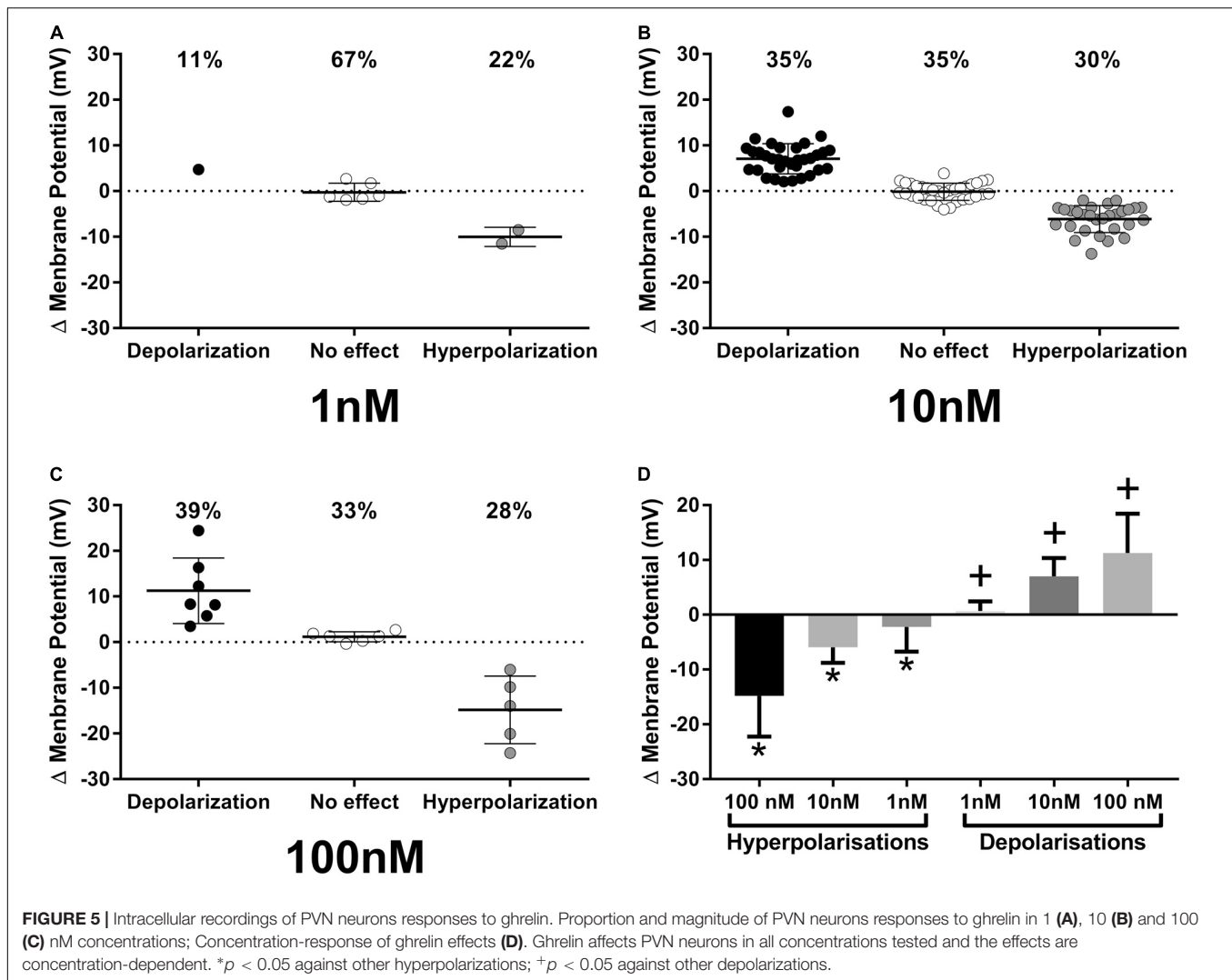


individual neurons respond differently to ghrelin application. We hypothesize that these differences in response are due to the different subpopulations of neurons in this nucleus. In the neurons measured without the antagonists, the proportion of changes in firing frequency demonstrated a significant difference between neurons that increased firing frequency and neurons in which firing frequency was unchanged [$F_{(33,1881)} = 4.27$, $p < 0.001$, **Figure 3B**], and between neurons in which the firing frequency decreased and neurons that were unaffected [$F_{(33,2178)} = 4.44$, $p < 0.001$, **Figure 3C**]. Similarly, in neurons evaluated in the presence of antagonists, neurons that increased in firing frequency were significantly different from unaffected neurons [$F_{(33,1683)} = 3.45$, $p < 0.001$, **Figure 3D**].

While our extracellular recordings clearly demonstrate effects of ghrelin on spike frequency in PVN neurons, these data provide no direct insight as to either, the cellular mechanisms of action on single PVN neurons, or the specific subpopulations of PVN neurons affected. We therefore utilized whole-cell patch clamp recording techniques to examine specific effects of ghrelin on single PVN neurons. Bath administration of varying concentrations of ghrelin (1, 10, and 100 nM) also affected PVN neurons (**Figure 5**, 1 nM: 11% depolarized, 22% hyperpolarized, $n = 9$; 10 nM: 35% depolarized, 30% hyperpolarized, $n = 94$; 100 nM: 39% depolarized, 28% hyperpolarized, $n = 18$). Statistical analysis of the changes in membrane potential showed that both depolarizations [$F_{(2,44)} = 12.89$, $p < 0.001$, ONE-WAY ANOVA] and hyperpolarizations [$F_{(2,39)} = 16.81$, $p < 0.001$, ONE-WAY ANOVA] were significantly different between ghrelin concentrations; Tukey's *post hoc* analysis showed that all concentrations effects on membrane potential were significantly

different between each other ($p < 0.05$). Therefore, although the proportion of ghrelin responsive neurons were similar in 10 and 100 nM (respectively, 65 and 67%), the magnitude of response is concentration-dependent. Notably, the proportion of responses to 10 nM ghrelin were not significantly different between intracellular and extracellular recordings (Chi-square = 1,27, $df = 2$, $p = 0.53$).

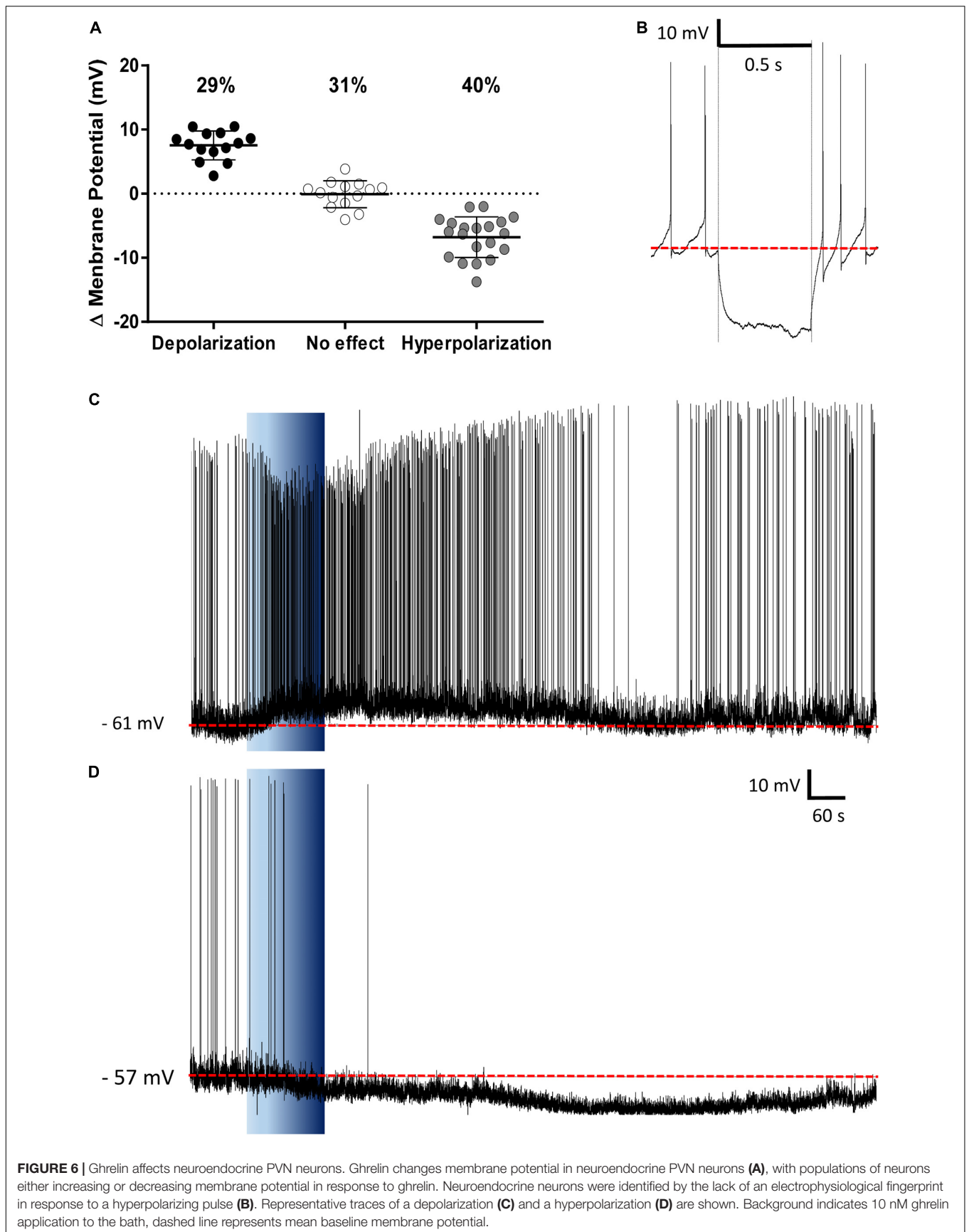
In regards to the duration of effects, 1 and 10 nM ghrelin induced similar responses (1 nM = 434 ± 250 s vs. 10 nM = 572 ± 312 s, $p = 0.45$, unpaired *t*-test). Administration of 100 nM ghrelin induced a long-lasting response that persisted until the seal was broken in 50% of ghrelin-responsive neurons (6/12). The remaining neurons showed a large variability in the duration of response, with two neurons in which effects lasted for a longer period (respectively, 1916 and 4024 s) and four that showed effects similar to the other concentrations [499.8 ± 126.7 s; $F_{(2,65)} = 1.844$, $p = 0.16$, ONE-WAY ANOVA]. Thus, the 100 nM concentration extends the effects of ghrelin on most PVN neurons, whilst 10 and 1 nM cause effects of similar duration. Further analyzing 10 nM ghrelin, no significant differences were found between hyperpolarizing and depolarizing ghrelin-responsive neurons (Depolarizing = 572.7 ± 357.2 vs. hyperpolarizing = 571.8 ± 252.8 , $p = 0.99$, unpaired *t*-test) or between different neuronal phenotypes [Neuroendocrine = 576.4 ± 268.6 s; pre-autonomic = 601.6 ± 438.6 s; magnocellular = 532.8 ± 271.3 s; $F_{(2,59)} = 1.225$, $p = 0.30$, ONE-WAY ANOVA]. These results suggest that, within the same concentration, the duration of ghrelin effects are consistent in PVN neurons.

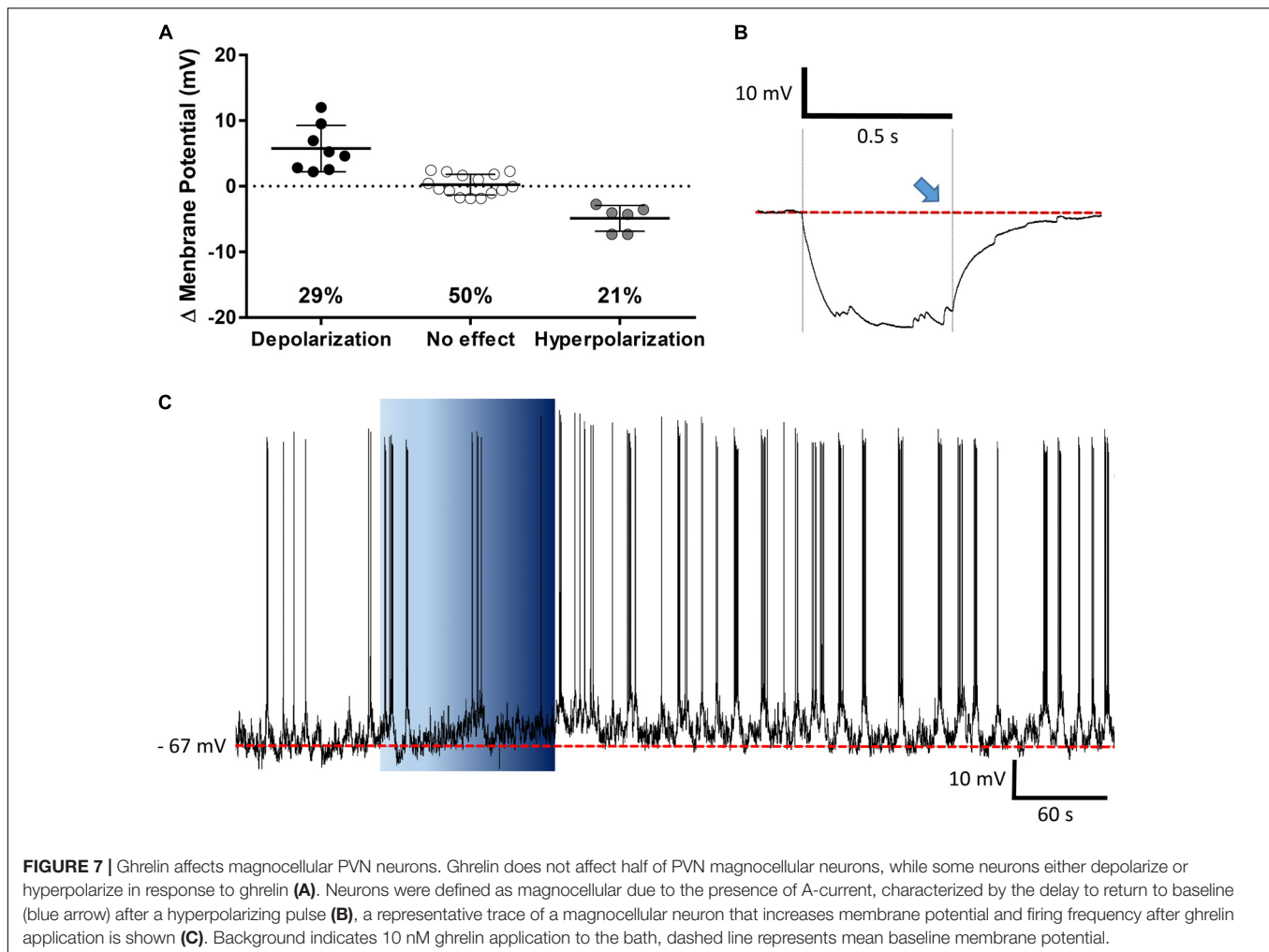


The PVN showed populations of neurons that depolarized, hyperpolarized or were unaffected by ghrelin and we speculated that these effects might be distributed to different functional subpopulations of PVN neurons. In order to assess if these differences in response were dependent on the neuronal phenotype, cells were sorted in accordance to the electrophysiological response to a hyperpolarizing pulse, as previously described (Tasker and Dudek, 1991; Stern, 2001; Luther et al., 2002). While significant proportions of neuroendocrine (29% depolarizations, 40% hyperpolarizations; **Figure 6**), and magnocellular neurons (29% depolarizations, 21% hyperpolarizations; **Figure 7**) responded to ghrelin, mixed effects were still observed in both groups of cells. In contrast, the majority of pre-autonomic neurons tested depolarized to ghrelin (61% depolarizations, 17% hyperpolarizations; **Figure 8**) suggesting primarily excitatory effects on these cells.

These data demonstrate, that even within these electrophysiologically defined subgroups within which different chemical phenotypes exist (e.g., magnocellular OT and AVP

neurons), there is a heterogeneity in responsiveness to ghrelin. We therefore carried out additional recordings in which we correlated the electrophysiological responses to the mRNA expressed in individual neurons. We collected the mRNA content from 74 cells, of which 45 (61%) were positive for β -actin mRNA, and were used for this analysis. RT-PCR for AVP, OT, CRH, and TRH was performed on cytoplasm extracted from each neuron following assessment of ghrelin effects using whole cell recording (**Figure 9**). As illustrated in **Figure 10A**, this analysis demonstrated that both ghrelin responsive CRH (3/4 neurons) and TRH (4/5 neurons) expressing neurons demonstrated only hyperpolarizing responses. In contrast, both AVP- (20% depolarized, 40% hyperpolarized, $n = 35$), and OT- (11% depolarized, 44% hyperpolarized, $n = 9$) expressing neurons showed mixed responses to ghrelin, while OT showed a majority of hyperpolarizations. Interestingly, neurons that did not express any of the four tested genes ($n = 8$) showed a higher percentage of depolarizations (50%), with the remainder being either hyperpolarizations or unaffected (25% each).



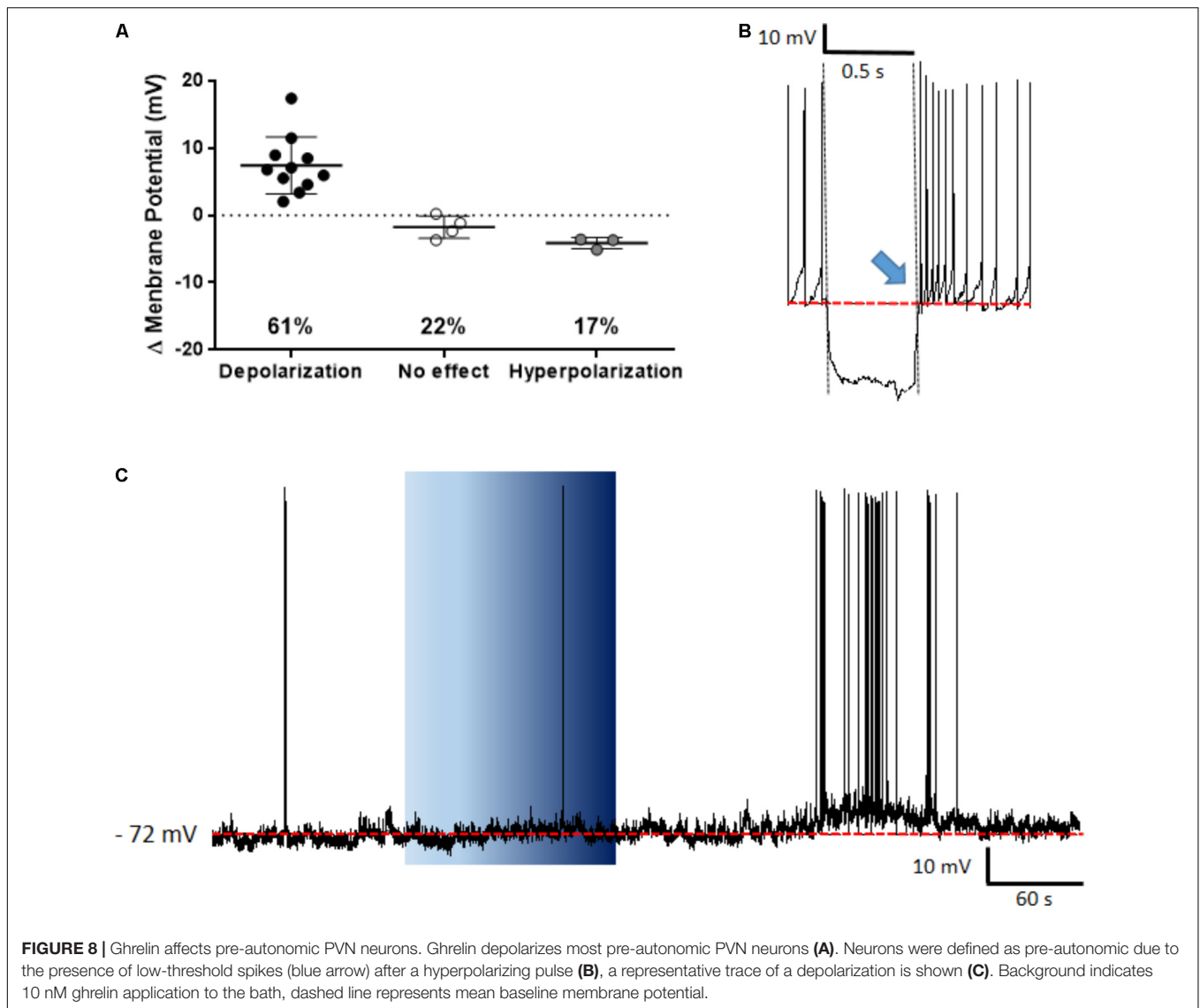


We also have correlated mRNA expression with our electrophysiological classification of neuroendocrine (Figure 10B), pre-autonomic (Figure 10C) or magnocellular (Figure 10D) phenotypes. These data highlight the unexpected observation that AVP was expressed in the majority of PVN neurons (30/45). Most CRH-expressing neurons co-expressed AVP mRNA (3/4), while the only OT-expressing neuron that depolarized in response to ghrelin presented more AVP than OT mRNA.

DISCUSSION

The PVN is involved in the control of a series of physiological responses, including the response to osmotic stimuli, metabolic disturbances, cardiovascular and autonomic control, the stress response and secretion of pituitary hormones, and thus, unsurprisingly, this nucleus consists of distinct subpopulations of neurons (Stern, 2015). Ghrelin modulates all the aforementioned physiological responses (Müller et al., 2015), which suggests the PVN as a target for ghrelin actions. Previous studies have assessed the effects of ghrelin on neuronal excitability in the

ARC (Cowley et al., 2003; Andrews et al., 2008), hippocampus (Diano et al., 2006; Ribeiro et al., 2014) and area *postrema* (Fry and Ferguson, 2009). However, to date studies examining the effects of ghrelin on the activity of PVN neurons have only reported effects on inhibitory (Cowley et al., 2003) and excitatory (Kola et al., 2008) post-synaptic currents. In this study we show that ghrelin affects the spike frequency of the majority of PVN neurons, either decreasing or increasing their activity. While inhibitory actions of ghrelin were also demonstrated in ARC neurons (Cowley et al., 2003; Yousheng et al., 2008), the fact that ghrelin acts through GHSR, a G_q coupled receptor that increases intracellular calcium (Cowley et al., 2003), supports the idea that direct actions of ghrelin would be primarily excitatory. Although the majority ghrelin effects are mediated by GHSR, some of ghrelin effects are maintained in GHSR knockout mice (Uchida et al., 2013), which suggests that another receptor may be involved in the responses to ghrelin. In order to evaluate whether the effects were dependent on direct effects on PVN neurons or mediated by previous activation of neurons within the slices, we assessed the effects of ghrelin in the presence of GABAA and glutamate antagonists, and demonstrated that the inhibitory actions of ghrelin were absent when the transmission



mediated by these rapid amino acids was blocked. Glutamate induces excitatory responses within the PVN, while GABA is mostly involved in inhibitory responses (Ferguson et al., 2008), suggesting that the different effects in the presence of the antagonists are due to the blockade of GABA actions. These results provide evidence that the direct effects of ghrelin on PVN neurons are excitatory, and that the inhibitory effects are dependent on the excitation of a GABAergic inhibitory circuit. These inhibitory afferents to the PVN may arise from inhibitory interneurons within the PVN or projections from other nuclei present in the slice, such as the ARC. The ARC is activated by ghrelin and sends projections to the PVN, however, some of the effects of ghrelin administration persist in ARC ablated mice, which indicates that the PVN is capable of responding directly to ghrelin (Cabral et al., 2016). Interestingly, both intra-PVN administration of ghrelin (Currie et al., 2005) and the activation of GABA_A receptors in the PVN (Tsujii and Bray, 1991; Pu et al., 1999) increase food intake, and immunofluorescence studies

demonstrated that ghrelin binds to GABA-expressing neurons in the PVN (Cabral et al., 2016). Therefore, we suggest that ghrelin directly activates GABAergic neurons in the PVN, that, in turn, inhibit other PVN neurons.

Our patch clamp recordings also show that ghrelin primarily depolarizes pre-autonomic PVN neurons, effects that presumably underlie some of the previously demonstrated effects of central ghrelin on autonomic output. ICV ghrelin affects sympathetic responses including, inhibition of renal sympathetic nerve activity (Matsumura et al., 2002; Tanida et al., 2007), increased fat mass and storage in white adipose tissue (Theander-Carrillo et al., 2006), and inhibition of fat oxidation in brown adipose tissue (Yasuda et al., 2003; Theander-Carrillo et al., 2006). Indeed, intra-PVN administration of ghrelin showed similar sympathetic-dependent inhibition of the brown-adipose tissue (Mano-Otagiri et al., 2009), and increases FOS in the nucleus of the solitary tract (Olszewski et al., 2003). Additionally, non-secretory PVN neurons may participate in ghrelin effects on other

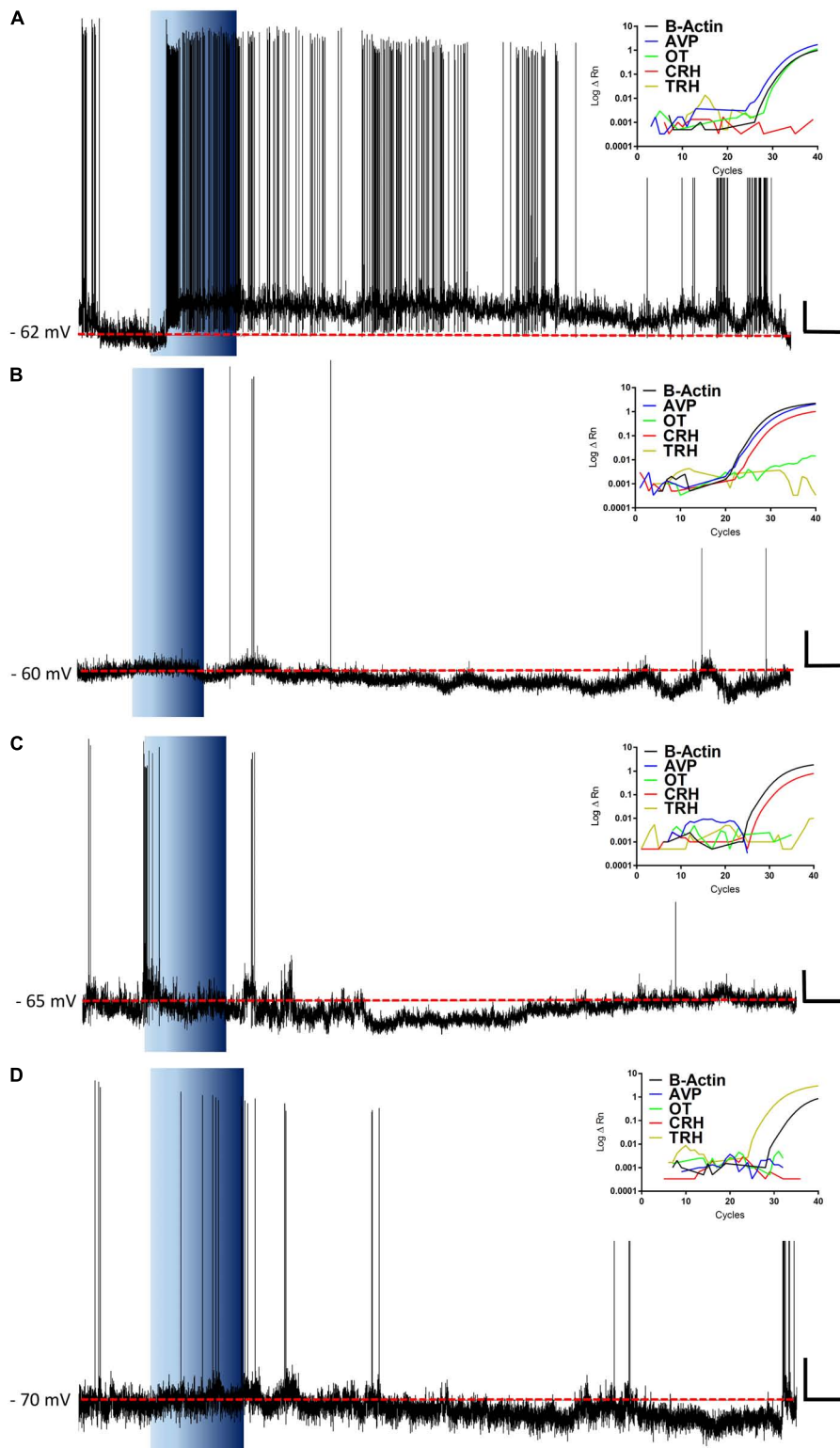
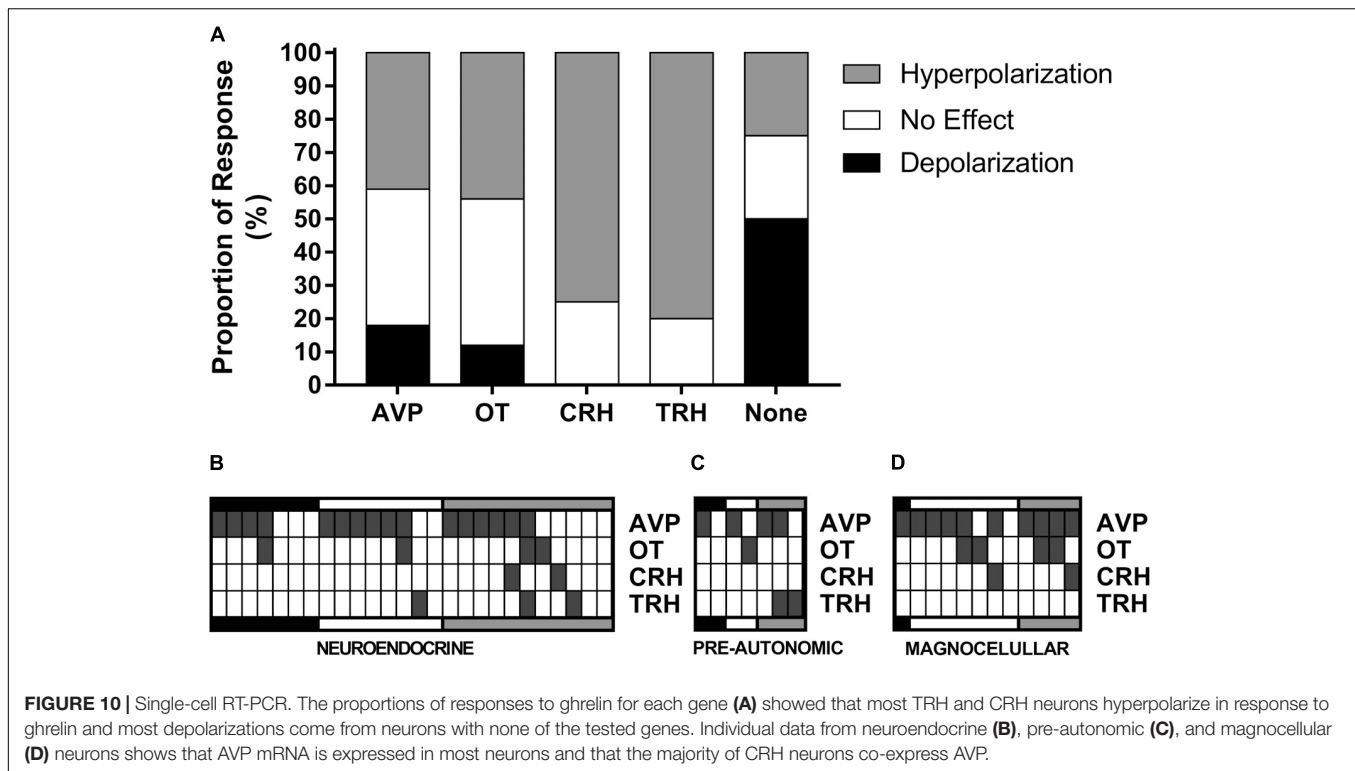


FIGURE 9 | Representative recordings and RT-PCRs. The figure shows representative traces for ghrelin responsive neurons and the insets show their respective amplification plots for β -Actin, AVP, OT, CRH, and TRH mRNA. Note, a neuron that depolarizes in response to ghrelin and expresses both AVP and OT mRNA, with the predominance of AVP (**A**); hyperpolarizations in CRH expressing neurons, either with AVP-CRH coexpression (**B**) or with CRH only (**C**); and a hyperpolarization in a TRH neuron (**D**). Blue background indicates 10 nM ghrelin application; red dashed line represents mean membrane potential; vertical scale bar represents 10 mV; and horizontal scale bar represents 60 s.



physiological functions such as anxiety-like behavior (Currie et al., 2012; Wauson et al., 2015) and feeding (Wren et al., 2001; Melis et al., 2002; Olszewski et al., 2003; Shrestha et al., 2004) which are increased by intra-PVN administration of ghrelin.

Magnocellular and neuroendocrine neurons showed mixed responses to ghrelin, thus we attempted to further clarify the effects of ghrelin on magnocellular and neuroendocrine neurons using techniques to describe mRNA expression of AVP, OT, CRH, and TRH; all of which have been previously implicated in the responses to ghrelin (Müller et al., 2015), and correlate this with the effects of ghrelin on individual neurons. We have previously shown that the single cell mRNA expression closely relates to the protein expressed by immunofluorescence, and that the single cell mRNA analysis is a reliable technique to assess the neuronal phenotype (da Silva et al., 2015). Most notably, ICV administration of OT (Olson et al., 1991), CRH (Wang et al., 2007), and TRH (Steward et al., 2003; Schuhler et al., 2007) decreases food intake, and the majority of PVN neurons expressing these neurotransmitters were hyperpolarized in response to ghrelin, supporting the conclusion that this peptide inhibits PVN neurons that express anorexigenic neurotransmitters. Previous studies stated that in the hungry animal the ARC-PVN neurons that inhibit anorexigenic CRH, TRH, and OT neurons are activated, thus inducing food intake (Valassi et al., 2008).

Paraventricular nucleus TRH neurons control TSH and T3/T4 release, thus controlling thyroid function (Pekary and Sattin, 2012). Although the effects of ghrelin on the release of TRH have not been directly demonstrated, negative caloric balance decreases the release of TRH in the median eminence

(Joseph-Bravo et al., 2015). Conversely, leptin – an anorexigenic hormone that opposes ghrelin actions – increases TRH release (Guo et al., 2004; Ghamari-Langroudi et al., 2010). This indicates that in the hungry animal the TRH axis is inhibited, thus decreasing T3 and T4 release and reducing energy expenditure. PVN CRH neurons also induce thermogenesis (Richard et al., 2002). Ghrelin is known to reduce energy expenditure (Tschop et al., 2000; Theander-Carrillo et al., 2006), possibly the inhibition of TRH and CRH neurons in the PVN contributes to this response.

Intra-cerebro ventricular ghrelin increases FOS expression on OT neurons in the PVN (Olszewski et al., 2007), and ghrelin induces OT release in hypothalamic cell culture (Gálfi et al., 2016). The release of OT in response to ghrelin, however, has not been demonstrated *in vivo*. Magnocellular OT neurons were mostly hyperpolarized by ghrelin, which suggests that ghrelin would not increase plasma levels of OT. Additionally, OT is involved in the modulation of other responses such as reproduction, social behavior and feeding (Spetter and Hallschmid, 2017). OT is present in pre-autonomic neurons (Sawchenko and Swanson, 1982), which indicates this peptide is involved in the control of these responses. The present results, together with the observations of effects caused by intra-PVN administration of ghrelin on food intake (Wren et al., 2001; Melis et al., 2002; Olszewski et al., 2003; Shrestha et al., 2004); and effects of ghrelin on neuroendocrine (Wren et al., 2002; Gálfi et al., 2016) and autonomic control (Matsumura et al., 2002; Yasuda et al., 2003; Theander-Carrillo et al., 2006; Tanida et al., 2007) indicate the PVN as a major site of action for ghrelin, therefore contributing to the response to caloric imbalance.

AVP mRNA, was co-expressed with all peptides assessed in this study. The cross-talk between AVP and CRH in the control of the hypothalamic-hypophysial-adrenocortical axis is well established (Keller-Wood, 2015), and AVP is essential for the increased CRH release in response to ghrelin in hypothalamic cell culture (Nemoto et al., 2011), which suggests an interplay between these peptides in ghrelin responses. The co-expression of AVP and OT, was previously shown in single-cell analysis of magnocellular neurons on the supraoptic nucleus (Pires da Silva et al., 2016) and PVN (Hoyda et al., 2009). The unexpected ubiquitous presence of AVP mRNA, indicates that this neurotransmitter is involved in more than AVP secretion to the circulation. AVP integrates neurosecretory and pre-autonomic populations of PVN neurons, through a mechanism deemed “volume transmission,” in which the release of a neuromodulator by dendrites into the extracellular medium influences the activity of juxtaposed neurons that are not anatomically connected by axon-dendrite synapses (Stern, 2015). The dendro-dendritic AVP release by the PVN has been shown to be important for autonomic control (Lozić et al., 2016) and neurosecretory and pre-autonomic PVN neurons have been shown to interact in this manner (Son et al., 2013). Ghrelin influences adiposity and energy utilization (Theander-Carrillo et al., 2006), volume transmission could potentially mediate these effects, since they depend on long-term alteration in neurotransmission/neuromodulation. The influence of ghrelin on volume transmission poses an interesting question to be assessed in future studies. The majority of depolarizations in response to ghrelin were found in neurons that did not express any of the tested genes, effects which are therefore likely to be on other PVN neuronal subgroups such as those expressing other transmitters such as glutamate (Hrabovszky et al., 2005) and GABA (Park et al., 2007), indeed, previous studies demonstrated that icv ghrelin binds to GABA-expressing neurons in the PVN (Cabral et al., 2016). The observations that ghrelin inhibits several neuronal subgroups in the PVN, and that these inhibitions disappear in the presence of GABA and glutamate antagonists suggest that ghrelin increases the activity of inhibitory neurons within the PVN, in turn decreasing the activity of TRH, CRH, and OT neurons. However, this hypothesis needs further testing, since the number of TRH

and CRH expressing neurons obtained through this technique was low.

CONCLUSION

Ghrelin affects all types of PVN neurons, possibly increasing the activity of GABAergic neurons that inhibit anorexigenic OT-, CRH-, and TRH-expressing neurons, increasing food intake and reducing energy expenditure. Additionally, the ubiquitous presence of AVP mRNA, suggests a function of this peptide that surpasses that of a classical neurotransmitter, possibly being involved in the integration of the different neuronal populations within the PVN. Further studies are necessary to determine the neural circuitry involved in the PVN participation on the responses to ghrelin, with special attention to the different nuclei to which these neurons send efferent projections; and to the intra-PVN integration of these responses.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Rd-S, AF, and AM designed the study. All authors participated in data analyses or acquisition, drafted/revised the manuscript, approved the final version, and agreed to be accountable for all the aspects of the work.

FUNDING

This work was supported by a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES, 88881.068349/2014-01), a grant from FAPERJ (CNE E26/202.981/2015) to LR, and the Canadian Institutes for Health Research MOP-12192 to AF. Rd-S received a fellowship from CAPES (88887.122764/2016-00).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Pauline Smith and Kathleen Ferguson for their excellent technical support and assistance.

REFERENCES

- Andrews, Z. B., Liu, Z.-W., Wallingford, N., Erion, D. M., Borok, E., Friedman, J. M., et al. (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454, 846–851. doi: 10.1038/nature07181
- Blake, N. G., Eckland, D. J., Foster, O. J., and Lightman, S. L. (1991). Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 129, 2714–2718. doi: 10.1210/endo-129-5-2714
- Cabral, A., Fernandez, G., and Perello, M. (2013). Analysis of brain nuclei accessible to ghrelin present in the cerebrospinal fluid. *Neuroscience* 253, 406–415. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.09.008
- Cabral, A., Portiansky, E., Sánchez-Jaramillo, E., Zigman, J. M., and Perello, M. (2016). Ghrelin activates hypophysiotropic corticotropin-releasing factor neurons independently of the arcuate nucleus. *Psychoneuroendocrinology* 67, 27–39. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.01.027
- Cabral, A., Suescun, O., Zigman, J. M., and Perello, M. (2012). Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PLoS One* 7:e31462. doi: 10.1371/journal.pone.0031462
- Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., et al. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649–661. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00063-1
- Currie, P. J., Khelemsky, R., Rigsbee, E. M., Dono, L. M., Coiro, C. D., Chapman, C. D., et al. (2012). Ghrelin is an orexigenic peptide and elicits anxiety-like behaviors following administration into discrete regions of the hypothalamus. *Behav. Brain Res.* 226, 96–105. doi: 10.1016/j.bbr.2011.08.037
- Currie, P. J., Mirza, A., Fuld, R., Park, D., and Vasselli, J. R. (2005). Ghrelin is an orexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nuclei. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R353–R358. doi: 10.1152/ajpregu.00756.2004
- da Silva, M. P., Merino, R. M., Mecawi, A. S., Moraes, D. J., and Varanda, W. A. (2015). In vitro differentiation between oxytocin- and vasopressin-secreting

- magnocellular neurons requires more than one experimental criterion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 400, 102–111. doi: 10.1016/j.mce.2014.11.004
- Diano, S., Farr, S. A., Benoit, S. C., McNay, E. C., da Silva, I., Horvath, B., et al. (2006). Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat. Neurosci.* 9, 381–388. doi: 10.1038/nn1656
- Ferguson, A. V., Latchford, K. J., and Samson, W. K. (2008). The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 717–727. doi: 10.1517/14728222.12.6.717
- Fry, M., and Ferguson, A. V. (2009). Ghrelin modulates electrical activity of area postrema neurons. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R485–R492. doi: 10.1152/ajpregu.90555.2008
- Gálfi, M., Radács, M., Molnár, Z., Budai, I., Tóth, G., Pósa, A., et al. (2016). Ghrelin-induced enhancement of vasopressin and oxytocin secretion in rat neurohypophyseal cell cultures. *J. Mol. Neurosci.* 60, 525–530. doi: 10.1007/s12031-016-0850-4
- Ghamari-Langroudi, M., Vella, K. R., Srisai, D., Sugrue, M. L., Hollenberg, A. N., and Cone, R. D. (2010). Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Mol. Endocrinol.* 24, 2366–2381. doi: 10.1210/me.2010-0203
- Guo, F., Bakal, K., Minokoshi, Y., and Hollenberg, A. N. (2004). Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology* 145, 2221–2227. doi: 10.1210/en.2003-1312
- Harrold, J. A., Dovey, T., Cai, X.-J., Halford, J. C. G., and Pinkney, J. (2008). Autoradiographic analysis of ghrelin receptors in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 1196, 59–64. doi: 10.1016/j.brainres.2007.12.055
- Hoyda, T. D., Samson, W. K., and Ferguson, A. V. (2009). Adiponectin depolarizes parvocellular paraventricular nucleus neurons controlling neuroendocrine and autonomic function. *Endocrinology* 150, 832–840. doi: 10.1210/en.2008-1179
- Hrabovszky, E., Wittmann, G., Turi, G. F., Liposits, Z., and Fekete, C. (2005). Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone neurons of the rat contain vesicular glutamate transporter-2. *Endocrinology* 146, 341–347. doi: 10.1210/en.2004-0856
- Ishizaki, S., Murase, T., Sugimura, Y., Kakiya, S., Yokoi, H., Tachikawa, K., et al. (2002). Role of ghrelin in the regulation of vasopressin release in conscious rats. *Endocrinology* 143, 1589–1593. doi: 10.1210/endo.143.5.8804
- Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., Uribe, R.-M., and Charli, J.-L. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. *J. Endocrinol.* 226, T85–T100. doi: 10.1530/JOE-15-0124
- Keller-Wood, M. (2015). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis-feedback control. *Compr. Physiol.* 5, 1161–1182. doi: 10.1002/cphy.c140065
- Knobloch, H. S., Charlet, A., Hoffmann, L. C., Eliava, M., Khrulev, S., Cetin, A. H., et al. (2012). Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron* 73, 553–566. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.030
- Kobelt, P., Wissner, A.-S., Stengel, A., Goebel, M., Inhoff, T., Noetzel, S., et al. (2008). Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. *Brain Res.* 1204, 77–86. doi: 10.1016/j.brainres.2008.01.054
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656–660. doi: 10.1038/45230
- Kola, B., Farkas, I., Christ-Crain, M., Wittmann, G., Lolli, F., Amin, F., et al. (2008). The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One* 3:e1797. doi: 10.1371/journal.pone.0001797
- Latchford, K. J., and Ferguson, A. V. (2004). ANG II-induced excitation of paraventricular nucleus magnocellular neurons: a role for glutamate interneurons. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R894–R902. doi: 10.1152/ajpregu.00603.2003
- Lawrence, C. B., Snape, A. C., Baudoin, F. M. H., and Luckman, S. M. (2002). Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 143, 155–162. doi: 10.1210/endo.143.1.8561
- Loewen, S. P., and Ferguson, A. V. (2017). Adropin acts in the rat paraventricular nucleus to influence neuronal excitability. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 312, R511–R519. doi: 10.1152/ajpregu.00517.2016
- Lozić, M., Tasić, T., Martin, A., Greenwood, M., Šarenac, O., Hindmarch, C., et al. (2016). Over-expression of V1A receptors in PVN modulates autonomic cardiovascular control. *Pharmacol. Res.* 114, 185–195. doi: 10.1016/j.phrs.2016.10.024
- Luther, J. A., Daftary, S. S., Boudaba, C., Gould, G. C., Halmos, K. C., and Tasker, J. G. (2002). Neurosecretory and non-neurosecretory parvocellular neurones of the hypothalamic paraventricular nucleus express distinct electrophysiological properties. *J. Neuroendocrinol.* 14, 929–932. doi: 10.1046/j.1365-2826.2002.00867.x
- Luther, J. A., and Tasker, J. G. (2000). Voltage-gated currents distinguish parvocellular from magnocellular neurones in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Physiol.* 523, 193–209. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00193.x
- Ma, Z., and Liu, T. (2012). Myricetin facilitates potassium currents and inhibits neuronal activity of PVN neurons. *Neurochem. Res.* 37, 1450–1456. doi: 10.1007/s11064-012-0732-2
- Mano-Otagiri, A., Ohata, H., Iwasaki-Sekino, A., Nemoto, T., and Shibasaki, T. (2009). Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. *J. Endocrinol.* 201, 341–349. doi: 10.1677/JOE-08-0374
- Matsumura, K., Tsuchihashi, T., Fujii, K., Abe, I., and Iida, M. (2002). Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits. *Hypertension* 40, 694–699. doi: 10.1161/01.HYP.0000035395.51441.10
- Melis, M. R., Mascia, M. S., Succu, S., Torsello, A., Muller, E. E., Deghenghi, R., et al. (2002). Ghrelin injected into the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats induces feeding but not penile erection. *Neurosci. Lett.* 329, 339–343. doi: 10.1016/S0304-3940(02)00673-0
- Mori, M., Michimata, T., Yamada, M., Yamaguchi, M., Iriuchijima, T., and Kobayashi, S. (1988). Food deprivation decreases the blood TRH concentration in the rat. *Exp. Clin. Endocrinol.* 91, 97–104. doi: 10.1055/s-0029-1210728
- Mozid, A. M., Tringali, G., Forsling, M. L., Hendricks, M. S., Ajodha, S., Edwards, R., et al. (2003). Ghrelin is released from rat hypothalamic explants and stimulates corticotrophin-releasing hormone and arginine-vasopressin. *Horm. Metab. Res.* 35, 455–459. doi: 10.1055/s-2003-41801
- Müller, T. D., Nogueiras, R., Andermann, M. L., Andrews, Z. B., Anker, S. D., Argente, J., et al. (2015). Ghrelin. *Mol. Metab.* 4, 437–460. doi: 10.1016/j.molmet.2015.03.005
- Nemoto, T., Sugihara, H., Mano, A., Kano, T., and Shibasaki, T. (2011). The effects of ghrelin/GHSs on AVP mRNA expression and release in cultured hypothalamic cells in rats. *Peptides* 32, 1281–1288. doi: 10.1016/j.peptides.2011.04.007
- Olson, B. R., Drutarosky, M. D., Chow, M. S., Hruby, V. J., Stricker, E. M., and Verbalis, J. G. (1991). Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides* 12, 113–118. doi: 10.1016/0196-9781(91)90176-P
- Olaszewski, P. K., Bomberg, E. M., Martell, A., Grace, M. K., and Levine, A. S. (2007). Intraventricular ghrelin activates oxytocin neurons: implications in feeding behavior. *Neuroreport* 18, 499–503. doi: 10.1097/WNR.0b013e328058684e
- Olaszewski, P. K., Grace, M. K., Billington, C. J., and Levine, A. S. (2003). Hypothalamic paraventricular injections of ghrelin: effect on feeding and c-Fos immunoreactivity. *Peptides* 24, 919–923. doi: 10.1016/S0196-9781(03)00159-1
- Park, J. B., Skalska, S., Son, S., and Stern, J. E. (2007). Dual GABAA receptor-mediated inhibition in rat presympathetic paraventricular nucleus neurons. *J. Physiol.* 582(Pt 2), 539–551. doi: 10.1113/jphysiol.2007.133223
- Pekary, A. E., and Sattin, A. (2012). Rapid modulation of TRH and TRH-like peptide release in rat brain and peripheral tissues by ghrelin and 3-TRP-ghrelin. *Peptides* 36, 157–167. doi: 10.1016/j.peptides.2012.04.021
- Pires da Silva, M., de Almeida Moraes, D. J., Mecawi, A. S., Rodrigues, J. A., and Varanda, W. A. (2016). Nitric oxide modulates HCN channels in magnocellular neurons of the supraoptic nucleus of rats by an s-nitrosylation-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 36, 11320–11330. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1588-16.2016
- Pu, S., Jain, M. R., Horvath, T. L., Diano, S., Kalra, P. S., and Kalra, S. P. (1999). Interactions between neuropeptide Y and gamma-aminobutyric acid in stimulation of feeding: a morphological and pharmacological analysis. *Endocrinology* 140, 933–940. doi: 10.1210/endo.140.2.6495
- Reed, B., Varon, J., Chait, B. T., and Kreek, M. J. (2009). Carbon dioxide-induced anesthesia results in a rapid increase in plasma levels of vasopressin. *Endocrinology* 150, 2934–2939. doi: 10.1210/en.2008-1408

- Ribeiro, L. F., Catarino, T., Santos, S. D., Benoist, M., van Leeuwen, J. F., Esteban, J. A., et al. (2014). Ghrelin triggers the synaptic incorporation of AMPA receptors in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E149–E158. doi: 10.1073/pnas.1313798111
- Richard, D., Lin, Q., and Timofeeva, E. (2002). The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. *Eur. J. Pharmacol.* 440, 189–197. doi: 10.1016/s0014-2999(02)01428-0
- Rüter, J., Kobelt, P., Tebbe, J. J., Avsar, Y., Veh, R., Wang, L., et al. (2003). Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Brain Res.* 991, 26–33. doi: 10.1016/j.brainres.2003.07.005
- Sato, T., Nakamura, Y., Shiimura, Y., Ohgusu, H., Kangawa, K., and Kojima, M. (2012). Structure, regulation and function of ghrelin. *J. Biochem.* 151, 119–128. doi: 10.1093/jb/mvr134
- Sawchenko, P. E., and Swanson, L. W. (1982). Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.* 205, 260–272. doi: 10.1002/cne.902050306
- Schuhler, S., Warner, A., Finney, N., Bennett, G. W., Ebling, F. J. P., and Brameld, J. M. (2007). Thyrotrophin-releasing hormone decreases feeding and increases body temperature, activity and oxygen consumption in Siberian hamsters. *J. Neuroendocrinol.* 19, 239–249. doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01524.x
- Shrestha, Y. B., Wickwire, K., and Giraud, S. Q. (2004). Action of MT-II on ghrelin-induced feeding in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroreport* 15, 1365–1367. doi: 10.1097/01.wnr.0000127141.62476.d5
- Son, S. J., Filosa, J. A., Potapenko, E. S., Biancardi, V. C., Zheng, H., Patel, K. P., et al. (2013). Dendritic peptide release mediates interpopulation crosstalk between neurosecretory and preautonomic networks. *Neuron* 78, 1036–1049. doi: 10.1016/j.neuron.2013.04.025
- Spetter, M. S., and Hallschmid, M. (2017). Current findings on the role of oxytocin in the regulation of food intake. *Physiol. Behav.* 176, 31–39. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.007
- Stern, J. E. (2001). Electrophysiological and morphological properties of preautonomic neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Physiol.* 537(Pt 1), 161–177. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0161k.x
- Stern, J. E. (2015). Neuroendocrine-autonomic integration in the paraventricular nucleus: novel roles for dendritically released neuropeptides. *J. Neuroendocrinol.* 27, 487–497. doi: 10.1111/jne.12252
- Stevanovic, D. M., Grefhorst, A., Themmen, A. P. N., Popovic, V., Holstege, J., Haasdijk, E., et al. (2014). Unacylated ghrelin suppresses ghrelin-induced neuronal activity in the hypothalamus and brainstem of male rats [corrected]. *PLoS One* 9:e98180. doi: 10.1371/journal.pone.0098180
- Steward, C. A., Horan, T. L., Schuhler, S., Bennett, G. W., and Ebling, F. J. P. (2003). Central administration of thyrotrophin releasing hormone (TRH) and related peptides inhibits feeding behavior in the Siberian hamster. *Neuroreport* 14, 687–691. doi: 10.1097/01.wnr.0000064982.96259.00
- Tanaka, J., Saito, H., and Yagyū, K. (1989). Impaired responsiveness of paraventricular neurosecretory neurons to osmotic stimulation in rats after local anesthesia of the subfornical organ. *Neurosci. Lett.* 98, 51–56. doi: 10.1016/0304-3940(89)90372-8
- Tanida, M., Kaneko, H., Shen, J., and Nagai, K. (2007). Involvement of the histaminergic system in renal sympathetic and cardiovascular responses to leptin and ghrelin. *Neurosci. Lett.* 413, 88–92. doi: 10.1016/j.neulet.2006.11.035
- Tasker, J. G., and Dudek, F. E. (1991). Electrophysiological properties of neurones in the region of the paraventricular nucleus in slices of rat hypothalamus. *J. Physiol.* 434, 271–293. doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018469
- Theander-Carrillo, C., Wiedmer, P., Cettour-Rose, P., Nogueiras, R., Perez-Tilve, D., Pfluger, P., et al. (2006). Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J. Clin. Invest.* 116, 1983–1993. doi: 10.1172/JCI25811
- Tschöp, M., Smiley, D. L., and Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908–913. doi: 10.1038/35038090
- Tsujii, S., and Bray, G. A. (1991). GABA-related feeding control in genetically obese rats. *Brain Res.* 540, 48–54. doi: 10.1016/0006-8993(91)90491-D
- Uchida, A., Zigman, J. M., and Perello, M. (2013). Ghrelin and eating behavior: evidence and insights from genetically-modified mouse models. *Front. Neurosci.* 7:121. doi: 10.3389/fnins.2013.00121
- Valassi, E., Scacchi, M., and Cavagnini, F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 18, 158–168. doi: 10.1016/j.numecd.2007.06.004
- Wang, J., Ling, S., Usami, T., Murata, T., Narita, K., and Higuchi, T. (2007). Effects of ghrelin, corticotrophin-releasing hormone, and melanotan-II on food intake in rats with paraventricular nucleus lesions. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 115, 669–673. doi: 10.1055/s-2007-984438
- Wauson, S. E. R., Sarkodie, K., Schuette, L. M., and Currie, P. J. (2015). Midbrain raphe 5-HT1A receptor activation alters the effects of ghrelin on appetite and performance in the elevated plus maze. *J. Psychopharmacol.* 29, 836–844. doi: 10.1177/0269881115581981
- Wren, A. M., Small, C. J., Abbott, C. R., Dhillo, W. S., Seal, L. J., Cohen, M. A., et al. (2001). Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50, 2540–2547. doi: 10.2337/diabetes.50.11.2540
- Wren, A. M., Small, C. J., Fribbens, C. V., Neary, N. M., Ward, H. L., Seal, L. J., et al. (2002). The hypothalamic mechanisms of the hypophysiotropic action of ghrelin. *Neuroendocrinology* 76, 316–324. doi: 10.1159/000066629
- Wren, A. M., Small, C. J., Ward, H. L., Murphy, K. G., Dakin, C. L., Taheri, S., et al. (2000). The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141, 4325–4328. doi: 10.1210/endo.141.11.7873
- Yasuda, T., Masaki, T., Kakuma, T., and Yoshimatsu, H. (2003). Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. *Neurosci. Lett.* 349, 75–78. doi: 10.1016/S0304-3940(03)00789-4
- Yi, C.-X., and Tschöp, M. H. (2012). Brain-gut-adipose-tissue communication pathways at a glance. *Dis. Models Mech.* 5, 583–587. doi: 10.1242/dmm.009902
- Yousheng, J., Nguyen, T., Desai, M., and Ross, M. G. (2008). Programmed alterations in hypothalamic neuronal orexigenic responses to ghrelin following gestational nutrient restriction. *Reprod. Sci.* 15, 702–709. doi: 10.1177/1933719108316982

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 dos-Santos, Grover, Reis, Ferguson and Mecawi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Anexo B – Artigo submetido à revista Annals of the New York Academy of Sciences.

ANNALS *of* THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES

The actions of ghrelin in the paraventricular nucleus: energy balance and neuroendocrine implications

Journal:	<i>Ann NY Acad Sci</i>
Manuscript ID	annals-1759-000
Manuscript Type:	Review
Date Submitted by the Author:	21-Dec-2018
Complete List of Authors:	Dos-Santos, Raoni ; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Fisiológicas Reis, Luís; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Fisiológicas Perello, Mario; Instituto Multidisciplinario de Biologia Celular, Laboratory of Neurophysiology Ferguson, Alastair ; Queen's University, Centre for Neurosciences Studies Mecawi, Andre; Universidade Federal de Sao Paulo Escola Paulista de Medicina, Departamento de Biofísica
Keywords:	Hypothalamus, Ghrelin, Food intake, Neuroendocrinology

SCHOLARONE™
Manuscripts

REVIEW PAPER

Title: The actions of ghrelin in the paraventricular nucleus: energy balance and neuroendocrine implications

Short title: Actions of ghrelin on PVN neurons

Authors: Raoni C Dos-Santos¹, Luís C Reis¹, Mario Perello², Alastair V Ferguson³, André S Mecawi^{4*}.

1 - Department of Physiological Sciences - Federal Rural University of Rio de Janeiro - Seropédica, BR

2 - Laboratory of Neurophysiology - Multidisciplinary Institute of Cell Biology – La Plata, AR

3 - Centre for Neuroscience Studies - Queens University - Kingston, CA

3 – Laboratory of Neuroendocrinology, Department of Biophysics – Paulista Medical School – Federal University of São Paulo São Paulo, São Paulo, BR

* **Corresponding Author:** Dr. André Souza Mecawi

Laboratório de Neuroendocrinologia, Departamento de Biofísica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Rua Botucatu, 862, Edifício de Ciências Biomédicas, 7º andar, Vila Clementino, São Paulo, SP, Brazil. CEP: 04023-062

Electronic address: mecawi@unifesp.br.

Abstract

Ghrelin is a peptide produced and secreted by the stomach. Since its discovery, the impact of ghrelin on the regulation of food intake has been the most studied function of this hormone; however, ghrelin affects a wide range of physiological systems, most of which are controlled by the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN). Several pathways may be involved in the effects of ghrelin on PVN neurons, such as direct effects mediated by ghrelin, and indirect effects mediated by circumventricular organs and/or the arcuate nucleus. Indeed, the ghrelin receptor is expressed in the PVN neurons, and peripheral and intracerebroventricular administrations of ghrelin affect PVN neuronal activity. Ghrelin application to the PVN increases food intake and decreases fat oxidation, which chronically contribute to increase adiposity. Additionally, ghrelin modulates the neuroendocrine axes controlled by the PVN, increasing vasopressin and oxytocin release by magnocellular neurons, and corticotropin-releasing hormone by neuroendocrine parvocellular neurons, whilst possibly inhibiting the release of thyrotropin-releasing hormone. Thus, the PVN is an important target for the actions of ghrelin. In this review, we discuss the mechanisms for ghrelin actions in the PVN, and its possible implications for energy balance, neuroendocrine, and integrative physiological control.

Keywords: Ghrelin; Hypothalamus; Food intake; Neuroendocrinology.

INTRODUCTION

The brain constantly monitors the availability of energy in the body and adjusts ingestive behaviors, circulating hormone concentrations, and energy expenditure as necessary to maintain the metabolic status¹. The gastrointestinal tract releases several hormones, including cholecystokinin, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, glucagon-like peptide-1 and 2, oxyntomodulin, peptide YY, and ghrelin, that in addition to their peripheral actions also communicate the availability of nutrients to the brain, effectively forming the gut-brain axis². The brain, in turn, integrates the information conveyed by these hormones with visual, olfactory and gustatory cues to control food intake and energy expenditure³. Interestingly, most gastrointestinal hormones inhibit food intake, the only exception described thus far is ghrelin.

GHRELIN

Ghrelin is a stomach-derived acylated 28 amino acid peptide that was discovered to be the endogenous agonist of the growth-hormone secretagogue receptor (GHSR)⁴. The first described ghrelin action was the release of growth hormone from the adenohypophysis⁴, while later studies showed that ghrelin levels vary depending on feeding status, increasing during food deprivation⁵⁻⁹ and before scheduled meals⁹ and decreasing after feeding^{5,10}. This relationship between ghrelin and metabolic status led to many studies designed to evaluate the impact of ghrelin on food intake and metabolism. Ghrelin increases food intake in the first hours after administration^{8,11,12} with no changes in cumulative food intake over 24 hours⁵. Thus, ghrelin rapidly signals metabolic status, and the increased food intake in the first hours is compensated by decreased food intake in the later periods¹³. These initial observations confirmed ghrelin as the first described hunger hormone. Nonetheless, chronic ghrelin administration induces adiposity, possibly due to its effects on metabolism, favoring the use of carbohydrates and sparing fat⁵. In addition to its effects on food intake and growth hormone release, ghrelin affects a vast range of brain functions, such as neuroendocrine control, learning, memory, sleep/wake rhythm, and anxiety-like behaviors¹⁴.

The proghrelin gene produces proghrelin, a pro-hormone that includes ghrelin and obestatin, the former is then O-n-octanoylated by the enzyme ghrelin O-acyl-transferase (GOAT); proghrelin is finally cleaved in order to generate different peptides, which are secreted to the circulation¹⁵. The octanoylation of ghrelin is

1
2
3 necessary for its action on GHSR, since des-acyl ghrelin does not interact with this
4 receptor¹⁶. In the blood, the octanoyl moiety is quickly removed by esterases^{17,18} and, as
5 a result, most of the plasma ghrelin is in the des-acyl form, which has some biological
6 functions, quite interestingly in view of the theoretical lack of a prescribed receptor¹⁹⁻²¹.
7
8 GHSR is a Gα11/Gq11-coupled receptor that acts through the IP3-PKC²² and cAMP-
9 PKA^{23,24} pathways. Additionally, GHSR displays a high constitutive activity^{25,26}, which
10 indicates a ligand-independent action of this receptor may mediate some of the effects
11 of the ghrelin system. GHSR is expressed predominantly in the brain and
12 adenohipophysis²⁷, whilst smaller expression of GHSR was found in other tissues such
13 as the pancreas, adrenal, thyroid, and myocardium¹⁴.
14
15
16
17
18
19
20

21 In situ hybridization studies showed extensive mRNA expression of GHSR in
22 several regions of the brain, among which the hippocampus, the midbrain, the brainstem
23 and the hypothalamus of the mouse and rat^{27,28}. Additionally, transgenic mice that
24 express eGFP under the GHSR promoter showed expression of eGFP in most of the
25 aforementioned regions²⁹. The brain area that shows the highest expression of GHSR is
26 the hypothalamic arcuate nucleus (ARC), which is located in close apposition to the
27 median eminence and seems to be able to sense circulating ghrelin. The ARC is widely
28 regarded as the primary brain nucleus in which ghrelin exerts its effects regulating food
29 intake¹⁴. ARC neurons project to the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN),
30 which is the output for the hypothalamic suppression of feeding³⁰ and expresses
31 GHSR^{27,28,31-34}. Interestingly, both peripheral³⁵ and icv^{36,37} administered ghrelin bind to
32 cells in the PVN, which supports the hypothesis that ghrelin directly affects this
33 nucleus. Thus, regardless of being delivered peripherally or icv, ghrelin is able to act on
34 GHSR present in the PVN, indicating that this nucleus may mediate the effects of
35 ghrelin.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 THE PVN

49
50 PVN neurons are classified into three functional and morphological categories:
51 magnocellular, parvocellular neuroendocrine and parvocellular pre-autonomic³⁸.
52 Magnocellular PVN neurons mainly produce vasopressin (AVP) and oxytocin (OT),
53 and directly secrete them into the peripheral circulation through the neurohypophysis³⁹.
54 The primary populations of parvocellular neuroendocrine PVN neurons produce
55 thyrotropin releasing hormone (TRH), corticotropin releasing hormone (CRH) and
56 AVP, which are released in the median eminence and reach the adenohipophysis to
57
58
59
60

1
2
3 modulate the secretion of thyroid stimulating hormone (TSH) and adrenocorticotrophic
4 hormone (ACTH), respectively^{40,41}. The remaining PVN neurons are described as pre-
5 autonomic PVN neurons, and include neurons that control the autonomic nervous
6 system, and other physiological functions through descending projections to the medulla
7 and spinal cord^{42,43}. Pre-autonomic PVN neurons may also express OT, TRH, and
8 CRH⁴⁴, all of which decrease food intake⁴⁵⁻⁴⁸, thus, these are hypothetically the
9 populations of PVN neurons that suppress food intake.

16 Bilateral lesions of the PVN increase food intake and induce obesity, indicating
17 that this nucleus tonically inhibits appetite^{46,49}. In this regard, it is well known that
18 projections from the ARC affect PVN neurons³⁰. Other nuclei also project to the PVN in
19 order to influence food intake. The nucleus tuberalis lateralis, a scarcely studied nucleus
20 located lateral to the ARC in the mouse, was recently shown to possess neurons that co-
21 express somatostatin and GABA, these neurons project to the PVN inhibiting PVN
22 neurons and increasing food intake⁵⁰. Similarly, serotonergic neurons from
23 mesencephalic nuclei, such as the dorsal raphe and median raphe nuclei, project to the
24 PVN and decrease food intake⁵¹. The PVN is bi-directionally connected to nucleus of
25 the solitary tract (NTS)⁵² and parabrachial nucleus (PBN)³⁰, these connections to the
26 hindbrain are postulated as the downstream target for PVN anorexigenic neurons^{3,30,53}.
27 Thus, the PVN tonically inhibits food intake and integrates afferent signals from several
28 regions, these afferents modulate the activity of anorexigenic PVN neurons according to
29 the caloric needs, either increasing or decreasing food intake through its projections to
30 the PBN and NTS (**Figure 1**).

31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60

PATHWAYS FOR GHRELIN'S EFFECTS IN THE PVN

Although some studies suggest that the PVN receives afferent signals from
ghrelin-positive neurons in rats⁵⁴ and humans⁵⁵, a recent review states that there is no
conclusive evidence that ghrelin is synthesized at physiologically relevant levels in the
central nervous system⁵⁶. Thus, the accessibility of plasma ghrelin to the brain seems
essential for this hormone to exert effects on the PVN. In the brain, a wall of endothelial
and mural cells connected by tight junctions surrounds most capillaries, forming the
blood-brain barrier (BBB) and modulating the access of peptide hormones⁵⁷. Ghrelin
does not cross the BBB barrier in the blood to brain direction⁵⁸, thus the direct access of
ghrelin to brain nuclei protected by the BBB through this route is unlikely. However, in
the hypothalamus plasma peptides may enter the brain through the blood-cerebrospinal

1
2
3 fluid (CSF) barrier, which consists of hypothalamic tanycytes and the choroid plexus⁵⁹.
4 The β -tanycytes that compose the blood-CSF barrier separate the blood from the
5 hypophyseal portal system and the CSF, controlling the transport of plasma hormones to
6 the CSF in the third ventricle^{60,61}. In mice, previous studies demonstrated that
7 peripherally administered fluorescent ghrelin reaches the ventromedial ARC^{35,62}, and is
8 internalized by tanycytes of the median eminence^{35,63}, from where ghrelin may reach the
9 CSF, and then periventricular nuclei such as the PVN. Indeed, peripherally administered
10 fluorescent ghrelin quickly reaches regions close to the median eminence and, at a later
11 time point, reach regions in the periventricular parenchyma such as the PVN³⁵.
12
13
14
15
16
17
18

19 Alternatively, ghrelin may influence the PVN indirectly, due to its effects on the
20 ARC^{54,64}, circumventricular organs (CVO)⁶⁵ or vagal afferents⁶⁶. The ARC is a point of
21 integration between the periphery and the brain in the context of metabolic regulation,
22 since it possesses distinct populations of neurons that modulate food intake. Both
23 tyrosine hydroxylase (TH)/Dopamine⁶⁴ and Neuropeptide Y (NPY)/Agouti Related
24 Peptide (AGRP)⁶⁷ neurons from the ARC inhibit PVN neurons inducing food intake.
25 While pro-opio melanocortin (POMC) neurons in the ARC project to the PVN releasing
26 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) that activates melanocortin receptors 3/4
27 (MC3/4), increasing the activity of PVN neurons and inhibiting food intake⁵³. The
28 interplay between these three populations of neurons results in hunger or satiety in
29 response to changes in caloric balance. Ghrelin excites NPY/AGRP⁵⁴ and
30 TH/dopamine⁶⁴ neurons and inhibits POMC neurons⁵⁴, resulting in an increased food
31 intake. Importantly, the effects of the ARC on the control of food intake are mediated
32 through their projections to the PVN^{3,30,64}.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 CVOs are brain nuclei that lack a BBB, therefore being able to communicate
45 with the peripheral circulation⁶⁸. Sensory CVOs, such as the area postrema (AP) and
46 subfornical organ (SFO), are affected by peptides in the plasma and convey this
47 information to several brain nuclei⁶⁵. The SFO is part of the lamina terminalis and sends
48 efferent projections to the PVN that influence its activity⁶⁹, while the AP is located in
49 close proximity to the NTS, to which it send projections⁷⁰. The GHSR is present in both
50 the SFO⁶⁹ and AP^{28,29}, and ghrelin affects neurons in these nuclei^{69,71,72}. The NTS also
51 receives input from vagal afferent neurons, that are also influenced by peripheral
52 ghrelin⁶⁶. Thus, changes in plasma ghrelin are sensed by the AP and vagal afferents,
53 which communicate these signals to the NTS that, in turn, may affect the activity of the
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 PVN; additionally, an increase in plasma ghrelin also affects the SFO, which directly
4 projects to the PVN, providing pathways through which ghrelin's effects may bypass
5 the BBB to influence PVN neurons.
6
7
8
9

10 11 **THE EFFECTS OF GHRELIN IN THE PVN** 12

13
14 Despite the different pathways through which ghrelin may reach the PVN in
15 physiological contexts, several studies have measured the effects of exogenous
16 administration of ghrelin on PVN neurons. Peripheral administration of ghrelin
17 increases the activity of PVN neurons, measured by the expression of c-FOS (a marker
18 for transcriptional activity, indicative of neuronal activation)⁷³⁻⁷⁷ or *in vivo* magnetic
19 resonance^{78,79}. Notably, systemically injected ghrelin also increases c-FOS in the PVN
20 of ARC-ablated mice⁸⁰. In hamsters, peripheral administration of ghrelin increases c-
21 FOS in the ARC and PVN, and prior icv administration of a GHSR antagonist reverses
22 the effects of peripheral ghrelin on c-FOS expression in the PVN and not in the ARC⁸¹,
23 also suggesting that the icv GHSR antagonism affects the brain activity of PVN neurons
24 independent of the ARC. In rats icv ghrelin increases c-FOS expression in the
25 PVN^{12,82,83}. This effect is maintained in the absence of food, indicating that the increase
26 in c-FOS is a direct effect of ghrelin, rather than a result of the increased food intake⁸⁴.
27 The effect of ghrelin on PVN activity seems to depend on the metabolic status since
28 food deprivation potentiates the effects of icv ghrelin on c-FOS expression in the
29 PVN⁸³. Additionally, the administration of ghrelin directly to the PVN increases the
30 expression of c-FOS in this nucleus⁸⁵, while knockdown of GHSR gene expression in
31 the PVN decreases body weight gain⁸⁶. Collectively, these data support the direct action
32 of blood-borne ghrelin in the PVN neurons mediated by the GHSR receptors.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 An *in vivo* electrophysiological study in rats demonstrated that ghrelin inhibits
48 most glucosensitive PVN neurons and does not affect most of non-glucosensitive
49 parvocellular PVN neurons⁸⁷. Ghrelin also decreases the inhibitory post-synaptic
50 currents in PVN neurons in mouse brain slices, an effect similar to the application of
51 NPY and coherent with the activation of an ARC-PVN pathway. Notably, the ghrelin-
52 induced des-inhibition occurs in CRH neurons, without changes in TRH neurons⁵⁴.
53 Fluorescent ghrelin binds to GABA terminals in the mouse PVN, and ghrelin decreases
54 GABA release from PVN explants⁸⁸. In addition, ghrelin-induced increase of c-FOS in
55
56
57
58
59
60

1
2
3 the CRH PVN is impaired in mice intra-PVN injected with the GABA-A receptor
4 agonist muscimol⁸⁰. These observations led to the suggestion that ghrelin acts pre-
5 synaptically on NPY/GABA neurons from the ARC nucleus that synapse on CRH
6 neurons in the PVN, decreasing their activity and, consequently, disinhibiting CRH
7 neurons. An independent study showed that ghrelin inhibits unidentified parvocellular
8 PVN neurons in mice by decreasing the excitatory post-synaptic currents via a
9 mechanism dependent on CB1 receptor activation⁸⁹. These conflicting results may be
10 explained by later studies that showed that ghrelin is able to decrease both inhibitory
11 and excitatory post-synaptic currents in parvocellular PVN neurons, and both effects are
12 reversed by application of CB1 receptor antagonists⁹⁰. These results implicate the
13 endocannabinoid system on intra-PVN regulation of ghrelin's effects and highlight that
14 ghrelin may either increase or decrease the activity of PVN neurons. Additionally, when
15 the brain slices are incubated with ghrelin for 3-4 hours, CB1 receptor antagonists only
16 decrease the excitatory currents, i.e. the inhibitory input to the PVN neurons prevails⁹⁰.
17 This study indicates that the modulation of ghrelin's effects on PVN neurons by the
18 endocannabinoid system is plastic; however, the available data does not provide further
19 insights into the mechanism or relevance of these observations. Thus, further studies are
20 necessary to elucidate this issue.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 Interestingly, peripheral administration of a ghrelin antibody in rats also
36 increases c-FOS expression in PVN neurons⁹¹, suggesting that ghrelin might exert
37 excitatory or inhibitory effects on different subpopulations of PVN neurons. In
38 agreement with this hypothesis, it was recently shown that ghrelin may either depolarize
39 or hyperpolarize parvocellular and magnocellular PVN neurons in rats, and the
40 excitatory effects are apparently direct as they are maintained in the presence of GABA-
41 A and glutamate receptor antagonists, while such treatment abolished inhibitory
42 effects⁴⁴. Next, in order to identify the phenotype of the neurons affected by ghrelin
43 joint electrophysiology and single-cell RT-PCR were performed, and showed that most
44 TRH, CRH and OT neurons were hyperpolarized by ghrelin while the majority of
45 depolarizations were in neurons with none of the examined transcripts⁴⁴. Those results
46 indicated that ghrelin increases the activity of inhibitory neurons within the rat PVN
47 that, in turn, inhibit anorexigenic CRH, TRH and OT projections (Figure 2).
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 Thus, ghrelin may act through a plethora of mechanisms to influence the activity
59 of PVN neurons (Figure 3). Ghrelin directly affects PVN neurons⁴⁴ and acts pre-
60

1
2
3 synaptically on afferent neurons either decreasing the inhibition⁵⁴, the excitation⁸⁹ or
4 both⁹⁰. The pre-synaptic effects may be reversed by CB1 antagonists⁹⁰ and ATP^{67,92}.
5 The ATP is possibly released by astrocytes after retrograde signaling mediated by
6 dendritic release of AVP⁹², although this retrograde signaling was demonstrated in
7 magnocellular AVP neurons, it is plausible to assume that other neurons may
8 communicate with glial cells in a similar fashion, especially since most PVN cells co-
9 express AVP mRNA with TRH, CRH and OT⁴⁴.
10
11
12
13
14
15
16
17

18 **THE PVN AS A MEDIATOR OF THE ACTION OF GHRELIN ON ENERGY** 19 **BALANCE** 20

21
22 Several studies showed that the administration of ghrelin into the PVN increases
23 food intake in rats^{8,85,93-100}. Furthermore, it was shown that the bilateral lesion of the
24 PVN potentiates the orexigenic effects of ghrelin in rats⁴⁹, suggesting that the role of the
25 PVN as a mediator of this action of ghrelin is complex. Strikingly, intra-PVN
26 administration of ghrelin does not increase food intake in mice⁸⁸, this indicates that
27 some disparities between rats and mice may be found in the effects of ghrelin on the
28 PVN. The effects of ghrelin on food intake may be altered by several different
29 manipulations, for instance, these effects may be reversed by prior PVN administration
30 of melanotan-II, an MC3/4 agonist^{95,101}, suggesting that MC3/4 receptors in the PVN
31 antagonize ghrelin's effects. However, later studies showed that PVN administration of
32 α -MSH, the endogenous MC3/4 agonist, is ineffective in blunting the ghrelin-induced
33 food intake, suggesting that the PVN is not the primary target for the integration of
34 endogenous α -MSH and ghrelin¹⁰¹.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 The food intake in response to intra-PVN administration of ghrelin may be
46 blunted by subcutaneous administration of L-NAME, a nitric oxide (NO) synthase
47 inhibitor, thus indicating that the endogenous production of NO is necessary for the
48 action of ghrelin¹⁰². Similarly, serotonergic neurons from the mesencephalic raphe
49 nuclei project to the PVN and decrease ghrelin-induced food intake¹⁰³, suggesting that
50 these neurons increase the activity of anorexigenic neurons in the PVN. Food intake in
51 response to intra-PVN administration of ghrelin is also reversed by previous
52 microinjection of urocortin-I¹⁰⁰ or NPY Y5 receptor antagonist⁹⁴. Similarly, a study
53 demonstrated that administration of CB1 receptor antagonists into the PVN blunts
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 ghrelin-induced food intake⁹³. A later study, however, showed that administration of
4 AM251, a CB1 antagonist, into the PVN decreases food intake in free-fed rats and
5 potentiates fast-induced hyperphagia; 1 hour after ghrelin application AM251 did not
6 affect food intake, but, 4 hours after ghrelin application AM251 increased food-intake⁹⁰.
7 Thus, the participation of CB1 receptor in the PVN in ghrelin-induced food intake
8 seems controversial, since local blockade of CB1 signaling may decrease⁹³, increase or
9 not change⁹⁰, ghrelin-induced food intake.

10
11
12 Both AGRP and ghrelin increase food intake when injected into the PVN,
13 although their effects are not additive when co-administered, these observations
14 suggest the effect of ghrelin are dependent on AGRP neurons that project to the PVN¹⁰⁴.
15 Indeed, intra-PVN pre-treatment with ghrelin potentiates the orexigenic effects of
16 NPY^{96,100}. The administration of ghrelin into the PVN induces both food intake and
17 wakefulness in rats, the effects on wakefulness, however, are more pronounced after
18 administration in other areas such as the lateral hypothalamic area (LHA) and median
19 pre-optic nucleus⁹⁷. Since orexin-expressing neurons are mostly present in the LHA,
20 these results suggest that the LHA to PVN orexinergic circuit possibly mediates
21 ghrelin's effects. In support of this hypothesis, GHSR is present in the LHA³¹, the
22 administration of ghrelin in the LHA increases FOS in the PVN¹⁰⁷ and the
23 administration of orexin receptor antagonists reverses the effects of icv ghrelin on c-
24 FOS expression in the PVN¹⁰⁸. Interestingly, des-acyl-ghrelin also increases c-FOS
25 expression on the PVN neurons after both peripheral¹⁰⁹ or icv¹¹⁰ administration, this
26 increase however, is lesser than the one achieved by ghrelin administration.

27
28
29 Peripheral administration of ghrelin antibody decreases food intake in response
30 to insulin or 2-deoxyglucose (2DG), suggesting that ghrelin is necessary for the control
31 of plasma glucose. In addition, the authors implicated the PVN in the modulation of this
32 response since insulin and 2DG increase c-FOS in this nucleus, and ghrelin antibody
33 increases c-FOS in CRH neurons in the PVN⁹¹. This study indicates that ghrelin inhibits
34 CRH neurons in the rat hypothalamus, as previously demonstrated⁴⁴, thus decreasing the
35 inhibition of food intake mediated by these neurons.

36
37
38 Aside from the homeostatic increase in food intake, that is a response to caloric
39 deficits and regulated mainly by the hypothalamus, many studies have in contrast
40 focused on hedonic feeding, which is directly related to the reward system. The
41 mechanisms by which ghrelin regulates food intake are multifaceted and include not

1
2
3 only stimulating appetite but also modulating extra-homeostatic aspects of eating¹¹¹.
4 Indeed, Jewett et al.¹¹² highlighted that there is a difference between the sensation of
5 hunger and the increase in food intake *per se*, i.e. food intake may be promoted in fed
6 animals. To study if ghrelin affected hunger sensation, they trained rats to press a lever
7 when hungry, and showed that PVN ghrelin exerted similar effects to 22 hours of food
8 deprivation¹¹². When animals are allowed to choose between different foods, those in
9 which the GHSR is pharmacologically blocked in PVN eat more of a high-fat diet than
10 a normal diet¹¹³. However, when the animal could choose between a low-calorie highly-
11 palatable sucrose solution or a high calorie but bland chow, icv and PVN ghrelin
12 administration only increased the consumption of high calorie chow⁹⁸. These results
13 suggests that ghrelin-driven food intake in the PVN is mainly related to caloric needs
14 and not the reward system.
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 Ghrelin also changed other parameters associated with the autonomic nervous
25 system. The effect on energy expenditure is possibly mediated by the autonomic
26 nervous system since icv administration of ghrelin inhibits the sympathetic activity of
27 the brown adipose tissue projecting nerves¹¹⁴. Administration of ghrelin directly into the
28 PVN also inhibits sympathetic projections to the brown adipose tissue¹¹⁵. PVN
29 administration of ghrelin also increases the respiratory exchange ratio, indicating that
30 the metabolic pathways are changed in favor of the use of carbohydrates rather than
31 fat^{96,99,105,106}, these responses possibly contribute to the increased adiposity found after
32 ghrelin administration. The effects of ghrelin on metabolism may also be prevented by
33 previous peripheral or PVN administration of exendin-4, a GLP-1 analogue¹⁰⁶,
34 suggesting that GLP-1 may influence similar circuits involved in the control of the
35 metabolism. The effects of ghrelin on respiratory exchange ratio are also reversed by
36 pre-treatment with urocortin-I¹⁰⁰ and serotonin or 5-HT_{2A/2C} receptor agonists⁹⁹,
37 which suggests that these neurotransmitters modulate this response. Indeed, acute
38 administration of a 5-HT_{1a} receptor agonist into the median raphe nucleus increases the
39 orexigenic effect of PVN ghrelin¹⁰³, strongly indicating that serotonergic neurons
40 block the effects of ghrelin on PVN neurons. PVN ghrelin administration increases
41 gastrointestinal motility, an effect that could be blocked by co-administration of GHSR
42 antagonist, these effects are mediated by cholinergic receptors in the gastro-intestinal
43 tract, which indicates an increased parasympathetic activity¹¹⁶. PVN ghrelin
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 administration does not change penile erection in rats, suggesting that PVN ghrelin is
4 not involved with this response⁹⁴.
5
6
7
8

9 **THE PVN AS A MEDIATOR OF THE NEUROENDOCRINE ACTIONS OF** 10 **GHRELIN** 11

12 Additional to its central role in the control of food intake, the PVN also
13 participates in the control of neuroendocrine axes. The PVN controls the release of
14 stress hormones through neuroendocrine parvocellular neurons that release CRH and
15 AVP in the median eminence, which in turn stimulate the release of ACTH from
16 corticotropes in the adenohypophysis. ACTH acts on the adrenal cortex to increase
17 plasma levels of glucocorticoids, corticosterone in rodents or cortisol in humans⁴¹.
18 Glucocorticoids release glucose and mobilize glycogen stores, providing energy to
19 ensure appropriate response to a stressor¹¹⁷. In humans, ghrelin administration increases
20 plasma ACTH¹¹⁸⁻¹²⁰ and cortisol^{119,120}. Ghrelin also activates the HPA axis in rodents,
21 peripheral¹²¹ and icv^{11,122} administration of ghrelin increase plasma ACTH, and
22 peripheral administration of ghrelin also increases corticosterone¹²³. The stimulatory
23 effect of ghrelin on the HPA seems to occur at a central level since ghrelin
24 administration increases CRH and AVP release in rats hypothalamic explants^{122,124}.
25 Similarly, in the 4B hypothalamic cell line, which is a cell culture model of rat PVN
26 neurons, ghrelin increases the release of CRH and AVP and the mRNA for these
27 hormones through AMP_c-PKA and IP₃-PKC pathways²⁴. Additionally, in the same cell
28 line dexamethasone administration increases the preproghrelin and GHSR mRNA and
29 protein expression of ghrelin and GHSR, and this effect may be blocked by
30 glucocorticoids receptor antagonists¹²⁵, thus indicating that increased glucocorticoids
31 are able to regulate ghrelin and GHSR expression. In mice, both icv and peripheral
32 administration of ghrelin increase c-FOS expression in CRH PVN neurons and
33 corticosterone plasma levels, independently of food intake⁸⁸. Notably, CRH PVN
34 neurons in mice do not express GHSR and ghrelin seems to activate them via the
35 inhibition of local GABAergic tone, in an ARC-independent manner⁸⁰. Therefore,
36 although the effects of ghrelin on the control of food intake may differ between rats and
37 mice⁸⁸, ghrelin seems to consistently increase the activity of the CRH axis in both
38 species. Additionally, previous studies demonstrated that ghrelin may also inhibit CRH
39 PVN neurons^{44,91}, these differences in result may be attributed to the heterogeneous
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 population of CRH neurons within the PVN, i.e. CRH neurons that inhibit food intake⁴⁶
4 or CRH neurons that control the neuroendocrine axis⁴¹ may behave differently in
5 response to ghrelin (Figure 4).
6
7

8
9 Maternal separation, a stress model in neonates, decreases glycaemia, increases
10 plasma ghrelin, decreases CRH mRNA in the PVN, and activates the hypothalamic-
11 hypophysial-adrenal axis. Peripheral administration of a GHSR antagonist partially
12 reverses the effects of maternal separation on these variables¹²⁶, suggesting that the
13 increase in plasma ghrelin is partially responsible for the increase in stress in this
14 challenge. In ghrelin knockout mice, the increase in ACTH in response to stress is
15 blunted¹²⁷, indicating that endogenous ghrelin is necessary for this response. Chronic
16 social defeat stress increases food intake, body weight and plasma ghrelin in mice^{113,128}.
17 These changes are reversed by central administration of a GHSR antagonist or in GHSR
18 knockout mice¹²⁸, although chronic administration of GHSR antagonist directly into the
19 PVN does not affect body weight or food intake, despite increased plasma
20 corticosterone¹¹³. These observations suggest that GHSR activation in the PVN
21 decreases corticosterone release during chronic stress. Conversely, ghrelin potentiates
22 the increase in ACTH after acute stress, by increasing the release of noradrenaline in the
23 PVN¹²⁹, indeed, other authors have demonstrated that the effects of ghrelin on CRH
24 neurons are probably mediated by afferent input to the PVN^{44,88}. The effects of ghrelin
25 on the inflammatory response are independent of the CRH axis¹³⁰. Thus, ghrelin
26 administration activates the stress axis^{11,88,121} and plasma ghrelin is increased by
27 stress^{113,126-128,131}, however, the effects of ghrelin on stress depend on the model used.
28 Ghrelin potentiates the release of glucocorticoids in response to acute restraint
29 stress^{127,129} and maternal separation¹²⁶, while decreases the endocrine response to
30 chronic social defeat stress¹¹³. Thus, these studies indicate that acute stress increases
31 plasma ghrelin that, in turn, further increases the endocrine response to stress, however,
32 during chronic stress the effects of ghrelin change, blunting the stress response. Indeed,
33 acute stress decreases food intake, diverting energy from the need to consume food to
34 the more pressing need to fight or flight, conversely, after acute stress food intake is
35 increased, replenishing energy stores in the body; during chronic psychological stress
36 food intake is increased, especially the consumption of highly palatable food¹³². This
37 shift in the effects of ghrelin on CRH release is possibly involved with the dual effect of
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 stress on food intake. Further studies are required to elucidate the participation of
4 ghrelin in the complex integration between food intake and stress.
5
6

7 The neuroendocrine parvocellular PVN neurons also secrete TRH in the median
8 eminence, which acts in the adenohypophysis to release TSH, which in turn exerts
9 hormonal actions in the thyroid to release T3 and T4⁴⁰. Thyroid hormones increase
10 metabolic activity, producing heat and increasing energy expenditure, beside effects on
11 a wide set of physiological parameters such as reproduction, immune system, growth
12 and development¹³³. The relationship between ghrelin and the hypothalamic-
13 hypophysial-thyroid axis is supported by the observations that hypothyroidism increases
14 and hyperthyroidism decreases plasma ghrelin in rats¹³⁴ and humans¹³⁵. In humans,
15 treatment of thyroid dysfunctions reverses the changes in plasma ghrelin¹³⁵⁻¹³⁷. The
16 increase in plasma ghrelin has been proposed as a physiological mechanism to
17 compensate for the anorectic effect of hypothyroidism¹³⁸. Early studies relating the
18 thyroid axis and ghrelin in humans showed that the administration of ghrelin does not
19 affect the levels of TSH in humans¹³⁹, however, later studies showed that ghrelin
20 decreases TSH^{140,141}. In rats, acute icv ghrelin administration decreases TSH^{11,142,143}, T3
21 and T4^{142,143}. Chronic icv ghrelin administration decreases TSH and T4, and changes
22 the morphology of thyrotrophs¹⁴⁴. These results suggest that ghrelin inhibits the thyroid
23 axis. The effects of icv ghrelin to decrease TSH suggest a decrease in TRH release and,
24 in support of this hypothesis, it was shown that ghrelin inhibits TRH PVN neurons⁴⁴.
25 Notably, ghrelin could also inhibit the TRH neurons via an indirect pathway involving
26 the ARC nucleus, since ghrelin potently activates NPY release that, in turn, inhibits
27 TRH PVN neurons¹⁴⁵. However, one study showed that peripheral ghrelin
28 administration increased TRH release in several brain regions, but not in the
29 hypothalamus¹²³. Thus, the thyroid status influences the ghrelin system, possibly
30 integrating the endocrine control of metabolism by thyroidal hormones with the control
31 of food intake. The influence of ghrelin on TRH release was not directly demonstrated,
32 however, in the hungry animal TRH release is decreased⁴⁰ and leptin – a satiety-
33 inducing hormone – increases TRH release¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, which further suggests that ghrelin
34 inhibits the thyroid axis.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55
56 AVP-expressing magnocellular PVN neurons are mainly involved in the
57 regulation of the response to challenges to hydromineral homeostasis such as
58 dehydration and hemorrhage³⁹. When blood volume and/or pressure decreases or
59
60

1
2
3 osmolality increases AVP is secreted to the plasma to induce water reabsorption in the
4 kidneys and the contraction of blood vessels, thus reestablishing these variables³⁹.
5 Intravenous administration of ghrelin increases AVP in humans¹¹⁸. In rats, icv
6 administration of ghrelin increases plasma levels of AVP¹⁴⁹, and ghrelin increased AVP
7 release from hypothalamic explants^{122,124,150}. Previous studies showed that ghrelin
8 directly increases the activity of magnocellular AVP PVN neurons^{44,92}. This increase
9 induces both axonal and dendritic release of AVP. The AVP released by the dendrites
10 affects astrocytes that release ATP, which acts in P2X receptors present in pre-synaptic
11 GABA-positive neurons in the PVN. These neurons then release GABA in the
12 magnocellular AVP PVN neurons further increasing their activity in a positive feedback
13 loop⁹², since in magnocellular AVP neurons GABA-A receptor is excitatory, due to
14 changed E_{GABA} resultant from different expression of chloride channels in these
15 neurons¹⁵¹. A later study showed that these P2X pre-synaptic neurons are afferents from
16 the ARC⁶⁷ (Figure 3). Thus, ghrelin influences the activity and secretion of
17 magnocellular AVP neurons potentially being involved in the integrated control of
18 hydromineral balance and cardiovascular responses during conditions of caloric deficit,
19 such as food deprivation. In support of this hypothesis, peripheral and icv
20 administration of ghrelin decrease water intake in basal conditions¹⁵², and icv ghrelin
21 decreases water intake in response to angiotensin II or salt-loading¹⁵³. However, plasma
22 ghrelin levels are inversely related to blood pressure, and the hypotensive effects of
23 ghrelin are possibly mediated by its inhibition of the sympathetic nervous systems¹⁵⁴.
24 Thus, further work is necessary to elucidate the participation of ghrelin on the
25 integration of these variables.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Magnocellular OT PVN neurons secrete OT in the blood, and plasma OT acts to
44 induce birth and lactation, but is also implicated in the responses to hydromineral
45 challenges, since it facilitates ANP release and natriuresis³⁹. Additionally, a
46 subpopulation of OT PVN neurons innervate the NTS and play anorectic effects^{45,155},
47 thus a relationship between OT and ghrelin is likely. Peripheral ghrelin administration
48 increases plasma levels of OT¹²³ and icv ghrelin administration increases c-FOS in OT
49 PVN neurons⁸² in rats. In hypothalamic cell cultures, ghrelin increases OT release and
50 these effects may be blocked by GHSR antagonist¹⁵⁰. Gastric electrical stimulation, a
51 treatment for obesity that activates satiety-related neurons in the hypothalamus,
52 increases the expression of OT in the magnocellular PVN and supraoptic nuclei, while
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 at the same time decreasing the expression of ghrelin in the same nuclei¹⁵⁶. Supraoptic
4 nucleus neurons are similar in structure and function to magnocellular PVN neurons,
5 ghrelin has previously been shown to decrease excitatory input to these neurons¹⁵⁷,
6 which suggests that ghrelin may inhibit neurons in this nucleus. These observations
7 corroborate recent results showing that most OT PVN neurons were hyperpolarized by
8 ghrelin application⁴⁴. As is the case for CRH PVN neurons, these different results may
9 be hypothetically attributed to different populations of OT PVN neurons responding
10 differently to ghrelin. In humans, intravenous OT administration decreases plasma
11 ghrelin¹⁵⁸ and does not influence the ghrelin-evoked increase in growth hormone,
12 prolactin, ACTH and cortisol¹²⁰. Manipulations of ghrelin levels in pregnant mice
13 changes body weight, puberty onset and sexual maturation of the offspring¹⁵⁹ and
14 ghrelin levels vary during pregnancy and lactation in cows and heifers and these
15 animals are more responsive to food restriction when pregnant¹⁶⁰. Therefore, the ghrelin
16 system possibly changes throughout pregnancy and lactation, which may further imply
17 a relation between ghrelin and OT in the regulation of reproductive function.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 CONCLUSION

33
34 The PVN is essential for the regulation of feeding, metabolism and
35 neuroendocrine control in response to ghrelin (Figure 4). Ghrelin induced increases in
36 food intake are mediated by the PVN and ghrelin administration directly to the PVN
37 modulates both food intake and the changes in metabolism in rats. These effects may be
38 influenced by a series of different neuromodulators, such as serotonin, urocortin, α -
39 MSH, AVP, GABA, somatostatin, GLP1, NO, NPY and endogenous cannabinoids.
40 Additionally, ghrelin affects neuroendocrine axes controlled by the PVN increasing
41 AVP and OT release, activating the CRH axis, and inhibiting the TRH axis. The effects
42 of ghrelin on stress response indicate that during acute stress ghrelin enforces the
43 increase in activity of the CRH axis, while during chronic stress ghrelin blunts the
44 endocrine responses to stress. The complex neurocircuitry through which ghrelin affects
45 the different cell types in the PVN is still unknown and requires further studies that
46 address both the different inputs from other brain regions and the intra-nucleus
47 regulation of PVN function. Additionally, some disparities in the effects of ghrelin on
48 PVN neurons may be due to the different species used, since mice and rats may
49 differently respond to ghrelin application.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FUNDING

This work was supported by a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, 88881.068349/2014-01).

REFERENCES

1. Yi C.-X. & M.H. Tschöp. 2012. Brain-gut-adipose-tissue communication pathways at a glance. *Dis. Model. Mech.* **5**: 583–7.
2. Côté C.D., M. Zadeh-Tahmasebi, B. a Rasmussen, *et al.* 2014. Hormonal signaling in the gut. *J. Biol. Chem.* **289**: 11642–9.
3. Morton G.J., D.E. Cummings, D.G. Baskin, *et al.* 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* **443**: 289–295.
4. Kojima M., H. Hosoda, Y. Date, *et al.* 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**: 656–60.
5. Tschöp M., D.L. Smiley, M.L. Heiman, *et al.* 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**: 908–913.
6. Gahete M.D., J. Córdoba-Chacón, R. Salvatori, *et al.* 2010. Metabolic regulation of ghrelin O-acyl transferase (GOAT) expression in the mouse hypothalamus, pituitary, and stomach. *Mol. Cell. Endocrinol.* **317**: 154–160.
7. Morash M.G., J. Gagnon, S. Nelson, *et al.* 2010. Tissue distribution and effects of fasting and obesity on the ghrelin axis in mice. *Regul. Pept.* **163**: 62–73.
8. Wren A.M., C.J. Small, C.R. Abbott, *et al.* 2001. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* **50**: 2540–7.
9. Drazen D.L., T.P. Vahl, D.A. D'Alessio, *et al.* 2006. Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: Evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology* **147**: 23–30.
10. Callahan H.S., D.E. Cummings, M.S. Pepe, *et al.* 2004. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**: 1319–1324.
11. Wren A.M., C.J. Small, H.L. Ward, *et al.* 2000. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* **141**: 4325–8.
12. Nakazato M., N. Murakami, Y. Date, *et al.* 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409**: 194–8.
13. Tolle V., M.-H.H. Bassant, P. Zizzari, *et al.* 2002. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with gh, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* **143**: 1353–1361.
14. Müller T.D., R. Nogueiras, M.L. Andermann, *et al.* 2015. Ghrelin. *Mol. Metab.* **4**: 437–460.

15. Rioux V. 2016. Fatty acid acylation of proteins: specific roles for palmitic, myristic and caprylic acids. *OCL* **23**: D304.
16. Hosoda H., M. Kojima, H. Matsuo, *et al.* 2000. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**: 909–13.
17. De Vriese C., F. Gregoire, R. Lema-Kisoka, *et al.* 2004. Ghrelin Degradation by Serum and Tissue Homogenates: Identification of the Cleavage Sites. *Endocrinology* **145**: 4997–5005.
18. Satou M., Y. Nishi, J. Yoh, *et al.* 2010. Identification and characterization of acyl-protein thioesterase 1/lysophospholipase I as a ghrelin deacylation/lysophospholipid hydrolyzing enzyme in fetal bovine serum and conditioned medium. *Endocrinology* **151**: 4765–75.
19. Stark R., V. V. Santos, B. Geenen, *et al.* 2016. Des-acyl ghrelin and ghrelin O-acyltransferase regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and anxiety in response to acute stress. *Endocrinology* **157**: 3946–3957.
20. Fernandez G., A. Cabral, M.P. Cornejo, *et al.* 2016. Des-Acyl Ghrelin Directly Targets the Arcuate Nucleus in a Ghrelin-Receptor Independent Manner and Impairs the Orexigenic Effect of Ghrelin. *J. Neuroendocrinol.* **28**: n/a-n/a.
21. Fernandez G., A. Cabral, M.P. Cornejo, *et al.* 2016. Des-Acyl Ghrelin Directly Targets the Arcuate Nucleus in a Ghrelin-Receptor Independent Manner and Impairs the Orexigenic Effect of Ghrelin. *J. Neuroendocrinol.* **28**: 12349.
22. Ferrini F., C. Salio, L. Lossi, *et al.* 2009. Ghrelin in Central Neurons. *Curr. Neuropharmacol.* **7**: 37–49.
23. Malagón M.M., R.M. Luque, E. Ruiz-Guerrero, *et al.* 2003. Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. *Endocrinology* **144**: 5372–80.
24. Kageyama K., Y. Kumata, K. Akimoto, *et al.* 2011. Ghrelin stimulates corticotropin-releasing factor and vasopressin gene expression in rat hypothalamic 4B cells. *Stress* **14**: 520–529.
25. Holst B., A. Cygankiewicz, T.H. Jensen, *et al.* 2003. High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol. Endocrinol.* **17**: 2201–10.
26. López Soto E.J., F. Agosti, A. Cabral, *et al.* 2015. Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impairs CaV2.1 and CaV2.2 currents in hypothalamic neurons. *J. Gen. Physiol.* **146**: 205–19.
27. Guan X.M., H. Yu, O.C. Palyha, *et al.* 1997. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **48**: 23–9.
28. Zigman J.M., J.E. Jones, C.E. Lee, *et al.* 2006. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **494**: 528–48.
29. Mani B.K., A.K. Walker, E.J. Lopez Soto, *et al.* 2014. Neuroanatomical characterization of a growth hormone secretagogue receptor-green fluorescent

- 1
2
3 protein reporter mouse. *J. Comp. Neurol.* **522**: 3644–66.
4
5 30. Sutton A.K., M.G. Myers & D.P. Olson. 2016. The Role of PVH Circuits in
6 Leptin Action and Energy Balance. *Annu. Rev. Physiol.* **78**: 207–221.
7
8 31. Harrold J.A., T. Dovey, X.-J.J. Cai, *et al.* 2008. Autoradiographic analysis of
9 ghrelin receptors in the rat hypothalamus. *Brain Res.* **1196**: 59–64.
10
11 32. Mitchell V., S. Bouret, J.C. Beauvillain, *et al.* 2001. Comparative distribution of
12 mRNA encoding the growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) in
13 *Microcebus murinus* (Primate, lemurian) and rat forebrain and pituitary. *J. Comp.*
14 *Neurol.* **429**: 469–89.
15
16 33. Yokote R., M. Sato, S. Matsubara, *et al.* 1998. Molecular cloning and gene
17 expression of growth hormone-releasing peptide receptor in rat tissues. *Peptides*
18 **19**: 15–20.
19
20 34. Perello M., M.M. Scott, I. Sakata, *et al.* 2012. Functional implications of limited
21 leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. *J. Comp. Neurol.*
22 **520**: 281–94.
23
24 35. Uriarte M., P.N. De Francesco, G. Fernandez, *et al.* 2018. Evidence Supporting a
25 Role for the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Transporting Circulating Ghrelin
26 into the Brain. *Mol. Neurobiol.* **3**: 3323–31.
27
28 36. Cabral A., G. Fernandez & M. Perello. 2013. Analysis of brain nuclei accessible
29 to ghrelin present in the cerebrospinal fluid. *Neuroscience* **253**: 406–15.
30
31 37. Cabral A., S. Valdivia, G. Fernandez, *et al.* 2014. Divergent neuronal circuitries
32 underlying acute orexigenic effects of peripheral or central ghrelin: critical role
33 of brain accessibility. *J. Neuroendocrinol.* **26**: 542–54.
34
35 38. Ferguson A. V., K.J. Latchford & W.K. Samson. 2008. The paraventricular
36 nucleus of the hypothalamus – a potential target for integrative treatment of
37 autonomic dysfunction. *Expert Opin. Ther. Targets* **12**: 717–727.
38
39 39. Mecawi A. de S., S.G. Ruginsk, L.L.K. Elias, *et al.* 2015. Neuroendocrine
40 Regulation of Hydromineral Homeostasis. *Compr. Physiol.* **5**: 1465–516.
41
42 40. Joseph-Bravo P., L. Jaimes-Hoy, R.-M. Uribe, *et al.* 2015. 60 YEARS OF
43 NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing
44 hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. *J. Endocrinol.* **226**: T85–
45 T100.
46
47 41. Keller-Wood M. 2015. Hypothalamic-Pituitary--Adrenal Axis-Feedback Control.
48 *Compr. Physiol.* **5**: 1161–82.
49
50 42. Stern J.E. 2001. Electrophysiological and morphological properties of pre-
51 autonomic neurones in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Physiol.*
52 **537**: 161–77.
53
54 43. Luther J.A., S.S. Daftary, C. Boudaba, *et al.* 2002. Neurosecretory and non-
55 neurosecretory parvocellular neurones of the hypothalamic paraventricular
56 nucleus express distinct electrophysiological properties. *J. Neuroendocrinol.* **14**:
57 929–32.
58
59 44. Dos-Santos R.C., H.M. Grover, L.C. Reis, *et al.* 2018. Electrophysiological
60

- 1
2
3 Effects of Ghrelin in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Neurons. *Front.*
4 *Cell. Neurosci.* **12**: 275.
5
- 6 45. Olson B.R., M.D. Drutarosky, M.S. Chow, *et al.* 1991. Oxytocin and an oxytocin
7 agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides* **12**: 113–8.
8
- 9 46. Wang J., S. Ling, T. Usami, *et al.* 2007. Effects of ghrelin, corticotrophin-
10 releasing hormone, and melanotan-II on food intake in rats with paraventricular
11 nucleus lesions. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **115**: 669–673.
12
- 13 47. Steward C.A., T.L. Horan, S. Schuhler, *et al.* 2003. Central administration of
14 thyrotropin releasing hormone (TRH) and related peptides inhibits feeding
15 behavior in the Siberian hamster. *Neuroreport* **14**: 687–91.
16
- 17 48. Schuhler S., A. Warner, N. Finney, *et al.* 2007. Thyrotrophin-releasing hormone
18 decreases feeding and increases body temperature, activity and oxygen
19 consumption in Siberian hamsters. *J. Neuroendocrinol.* **19**: 239–49.
20
- 21 49. Wang J., Z. Yuan, J. Dong, *et al.* 2013. Neuropeptide y loses its orexigenic effect
22 in rats with lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocr. Res.* **38**:
23 8–14.
24
- 25 50. Luo S.X., J. Huang, Q. Li, *et al.* 2018. Regulation of feeding by somatostatin
26 neurons in the tuberal nucleus. *Science (80-.)*. **361**: 76–81.
27
- 28 51. Voigt J.-P. & H. Fink. 2015. Serotonin controlling feeding and satiety. *Behav.*
29 *Brain Res.* **277**: 14–31.
30
- 31 52. Ter Horst G.J., P. de Boer, P.G. Luiten, *et al.* 1989. Ascending projections from
32 the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing
33 study in the rat. *Neuroscience* **31**: 785–97.
34
- 35 53. Schwartz M.W., S.C. Woods, D. Porte, *et al.* 2000. Central nervous system
36 control of food intake. *Nature* **404**: 661–71.
37
- 38 54. Cowley M.A., R.G. Smith, S. Diano, *et al.* 2003. The distribution and mechanism
39 of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit
40 regulating energy homeostasis. *Neuron* **37**: 649–661.
41
- 42 55. Menyhért J., G. Wittmann, E. Hrabovszky, *et al.* 2006. Distribution of ghrelin-
43 immunoreactive neuronal networks in the human hypothalamus. *Brain Res.* **1125**:
44 31–36.
45
- 46 56. Cabral A., E.J. López Soto, J. Epelbaum, *et al.* 2017. Is Ghrelin Synthesized in
47 the Central Nervous System? *Int. J. Mol. Sci.* **18**:.
48
- 49 57. Abbott N.J., A.A.K. Patabendige, D.E.M. Dolman, *et al.* 2010. Structure and
50 function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**: 13–25.
51
- 52 58. Banks W.A., M. Tschöp, S.M. Robinson, *et al.* 2002. Extent and direction of
53 ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique
54 primary structure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**: 822–7.
55
- 56 59. Saunders N.R., C.J. Ek, M.D. Habgood, *et al.* 2008. Barriers in the brain: a
57 renaissance? *Trends Neurosci.* **31**: 279–86.
58
- 59 60. Prevot V., B. Dehouck, A. Sharif, *et al.* 2018. The Versatile Tanycyte: A
60

- 1
2
3 Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocr. Rev.*
4 **39**: 333–368.
5
- 6 61. Lazcano I., A. Cabral, R.M. Uribe, *et al.* 2015. Fasting Enhances Pyroglutamyl
7 Peptidase II Activity in Tanycytes of the Mediobasal Hypothalamus of Male
8 Adult Rats. *Endocrinology* **156**: 2713–23.
9
- 10 62. Schaeffer M., F. Langlet, C. Lafont, *et al.* 2013. Rapid sensing of circulating
11 ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**:
12 1512–1517.
13
- 14 63. Collden G., E. Balland, J. Parkash, *et al.* 2015. Neonatal overnutrition causes
15 early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Mol. Metab.* **4**: 15–
16 24.
17
- 18 64. Zhang X. & A.N. Van Den Pol. 2016. Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine
19 hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis. *Nat. Neurosci.*
20 **19**: 1341–1347.
21
- 22 65. Fry M. & A. V Ferguson. 2010. Ghrelin: central nervous system sites of action in
23 regulation of energy balance. *Int. J. Pept.* **2010**:.
24
- 25 66. Date Y., N. Murakami, K. Toshinai, *et al.* 2002. The role of the gastric afferent
26 vagal nerve in Ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats.
27 *Gastroenterology* **123**: 1120–1128.
28
- 29 67. Xu J., A.M. Bernstein, A. Wong, *et al.* 2016. P2X4 Receptor Reporter Mice:
30 Sparse Brain Expression and Feeding-Related Presynaptic Facilitation in the
31 Arcuate Nucleus. *J. Neurosci.* **36**: 8902–8920.
32
- 33 68. Miyata S. 2015. New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the
34 sensory circumventricular organs of adult brains. *Front. Neurosci.* **9**: 390.
35
- 36 69. Pulman K.J., W.M. Fry, G.T. Cottrell, *et al.* 2006. The subfornical organ: a
37 central target for circulating feeding signals. *J. Neurosci.* **26**: 2022–30.
38
- 39 70. Price C.J., T.D. Hoyda & A. V Ferguson. 2008. The area postrema: a brain
40 monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist* **14**: 182–94.
41
- 42 71. Fry M. & A. V Ferguson. 2009. Ghrelin modulates electrical activity of area
43 postrema neurons. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**: R485-92.
44
- 45 72. Cabral A., M.P. Cornejo, G. Fernandez, *et al.* 2017. Circulating Ghrelin Acts on
46 GABA Neurons of the Area Postrema and Mediates Gastric Emptying in Male
47 Mice. *Endocrinology* **158**: 1436–1449.
48
- 49 73. Rüter J., P. Kobelt, J.J. Tebbe, *et al.* 2003. Intraperitoneal injection of ghrelin
50 induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in
51 rats. *Brain Res.* **991**: 26–33.
52
- 53 74. Kobelt P., J.J. Tebbe, I. Tjandra, *et al.* 2005. CCK inhibits the orexigenic effect
54 of peripheral ghrelin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**: R751-8.
55
- 56 75. Kobelt P., M. Goebel, A. Stengel, *et al.* 2006. Bombesin, but not amylin, blocks
57 the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp.*
58 *Physiol.* **291**: R903-13.
59
60

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
76. Kobelt P., A.-S. Wisser, A. Stengel, *et al.* 2008. Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. *Brain Res.* **1204**: 77–86.
77. Pirnik Z., J. Bundziková, M. Holubová, *et al.* 2011. Ghrelin agonists impact on Fos protein expression in brain areas related to food intake regulation in male C57BL/6 mice. *Neurochem. Int.* **59**: 889–895.
78. Kuo Y.-T., J.R.C. Parkinson, O.B. Chaudhri, *et al.* 2007. The Temporal Sequence of Gut Peptide CNS Interactions Tracked In Vivo by Magnetic Resonance Imaging. *J. Neurosci.* **27**: 12341–12348.
79. Sárvári M., P. Kocsis, L. Deli, *et al.* 2014. Ghrelin modulates the fMRI BOLD response of homeostatic and hedonic brain centers regulating energy balance in the rat. *PLoS One* **9**.
80. Cabral A., E. Portiansky, E. Sánchez-Jaramillo, *et al.* 2016. Ghrelin activates hypophysiotropic corticotropin-releasing factor neurons independently of the arcuate nucleus. *Psychoneuroendocrinology* **67**: 27–39.
81. Thomas M.A., V. Ryu & T.J. Bartness. 2016. Central ghrelin increases food foraging/hoarding that is blocked by GHSR antagonism and attenuates hypothalamic paraventricular nucleus neuronal activation. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **310**: R275–R285.
82. Olszewski P.K., E.M. Bomberg, A. Martell, *et al.* 2007. Intraventricular ghrelin activates oxytocin neurons: implications in feeding behavior. *Neuroreport* **18**: 499–503.
83. Scott V., D.M. McDade & S.M. Luckman. 2007. Rapid changes in the sensitivity of arcuate nucleus neurons to central ghrelin in relation to feeding status. *Physiol. Behav.* **90**: 180–185.
84. Lawrence C.B., A.C. Snape, F.M.H.M.-H.M.H. Baudoin, *et al.* 2002. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* **143**: 155–62.
85. Olszewski P.K., M.K. Grace, C.J. Billington, *et al.* 2003. Hypothalamic paraventricular injections of ghrelin: Effect on feeding and c-Fos immunoreactivity. *Peptides* **24**: 919–923.
86. Shrestha Y.B.Y., K. Wickwire & S. Giraud. 2009. Effect of reducing hypothalamic ghrelin receptor gene expression on energy balance. *Peptides* **30**: 1336–1341.
87. Chen X., Y.-L. Ge, Z.-Y. Jiang, *et al.* 2005. Effects of ghrelin on hypothalamic glucose responding neurons in rats. *Brain Res.* **1055**: 131–136.
88. Cabral A., O. Suescun, J.M. Zigman, *et al.* 2012. Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PLoS One* **7**: 1–10.
89. Kola B., I. Farkas, M. Christ-Crain, *et al.* 2008. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One* **3**: e1797.
90. Soria-Gómez E., F. Massa, L. Bellocchio, *et al.* 2014. Cannabinoid type-1

- receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit stimulated food intake. *Neuroscience* **263**: 46–53.
91. Solomon A., B.A. De Fanti & J. Alfredo Martínez. 2005. Peripheral Ghrelin participates in glucostatic feeding mechanisms and in the anorexigenic signalling mediated by CART and CRF neurons. *Nutr. Neurosci.* **8**: 287–295.
 92. Haam J., K.C. Halmos, S. Di, *et al.* 2014. Nutritional State-Dependent Ghrelin Activation of Vasopressin Neurons via Retrograde Trans-Neuronal-Glial Stimulation of Excitatory GABA Circuits. *J. Neurosci.* **34**: 6201–6213.
 93. Tucci S.A., E.K. Rogers, M.M. Korbonits, *et al.* 2004. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. *Br. J. Pharmacol.* **143**: 520–3.
 94. Melis M.R.R.R., M.S. Mascia, S. Succu, *et al.* 2002. Ghrelin injected into the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats induces feeding but not penile erection. *Neurosci. Lett.* **329**: 339–343.
 95. Shrestha Y.B., K. Wickwire & S.Q. Giraudo. 2004. Action of MT-II on ghrelin-induced feeding in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroreport* **15**: 1365–1367.
 96. Currie P.J., A. Mirza, R. Fuld, *et al.* 2005. Ghrelin is an orexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nuclei. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**: R353–R358.
 97. Szentirmai E., L. Kapás, J.M. Krueger, *et al.* 2007. Ghrelin microinjection into forebrain sites induces wakefulness and feeding in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**: R575–85.
 98. Bomberg E.M., M.K. Grace, M.M. Wirth, *et al.* 2007. Central ghrelin induces feeding driven by energy needs not by reward. *Neuroreport* **18**: 591–595.
 99. Currie P.J., C.S. John, M.L. Nicholson, *et al.* 2010. Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine inhibits the effects of ghrelin on eating and energy substrate utilization. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **97**: 152–155.
 100. Currie P.J., C.D. Coiro, R. Duenas, *et al.* 2011. Urocortin I inhibits the effects of ghrelin and neuropeptide Y on feeding and energy substrate utilization. *Brain Res.* **1385**: 127–134.
 101. Olszewski P.K., E.M. Bomberg, M.K. Grace, *et al.* 2007. α -Melanocyte stimulating hormone and ghrelin: Central interaction in feeding control. *Peptides* **28**: 2084–2089.
 102. Abtahi S., A. Mirza, E. Howell, *et al.* 2017. Ghrelin enhances food intake and carbohydrate oxidation in a nitric oxide dependent manner. *Gen. Comp. Endocrinol.* **250**: 9–14.
 103. Wauson S.E.R., K. Sarkodie, L.M. Schuette, *et al.* 2015. Midbrain raphe 5-HT1A receptor activation alters the effects of ghrelin on appetite and performance in the elevated plus maze. *J. Psychopharmacol.* **29**: 836–44.
 104. Shrestha Y.B., K. Wickwire & S.Q. Giraudo. 2006. Role of AgRP on Ghrelin-induced feeding in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Regul. Pept.* **133**:

- 68–73.
105. Currie P.J., R. Khelemsky, E.M. Rigsbee, *et al.* 2012. Ghrelin is an orexigenic peptide and elicits anxiety-like behaviors following administration into discrete regions of the hypothalamus. *Behav. Brain Res.* **226**: 96–105.
 106. Abtahi S., E. Howell, J.T. Salvucci, *et al.* 2018. Exendin-4 antagonizes the metabolic action of acylated ghrelinergic signaling in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Gen. Comp. Endocrinol.*
 107. Olszewski P.K., D. Li, M.K. Grace, *et al.* 2003. Neural basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus. *Peptides* **24**: 597–602.
 108. So M., H. Hashimoto, R. Saito, *et al.* 2018. Inhibition of ghrelin-induced feeding in rats by pretreatment with a novel dual orexin receptor antagonist. *J. Physiol. Sci.* **68**: 129–136.
 109. Asakawa A., A. Inui, M. Fujimiya, *et al.* 2005. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* **54**: 18–24.
 110. Stevanovic D.M., A. Grefhorst, A.P.N. Themmen, *et al.* 2014. Unacylated ghrelin suppresses grelin-induced neuronal activity in the hypothalamus and brainstem of male rats. *PLoS One* **9**:
 111. Perello M. & S.L. Dickson. 2015. Ghrelin signalling on food reward: a salient link between the gut and the mesolimbic system. *J. Neuroendocrinol.* **27**: 424–34.
 112. Jewett D.C., T.W. Lefever, D.P. Flashinski, *et al.* 2006. Intraparaventricular neuropeptide Y and ghrelin induce learned behaviors that report food deprivation in rats. *Neuroreport* **17**: 733–737.
 113. Patterson Z.R., T. Parno, A.M. Isaacs, *et al.* 2013. Interruption of ghrelin signaling in the PVN increases high-fat diet intake and body weight in stressed and non-stressed C57BL6J male mice. *Front. Neurosci.* **7**: 1–7.
 114. Yasuda T., T. Masaki, T. Kakuma, *et al.* 2003. Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. *Neurosci. Lett.* **349**: 75–8.
 115. Mano-Otagiri A., H. Ohata, A. Iwasaki-Sekino, *et al.* 2009. Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. *J. Endocrinol.* **201**: 341–349.
 116. Wang Y., F. Chen, H. Shi, *et al.* 2015. Extrinsic ghrelin in the paraventricular nucleus increases small intestinal motility in rats by activating central growth hormone secretagogue and enteric cholinergic receptors. *Peptides* **74**: 43–9.
 117. Smith S.M. & W.W. Vale. 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin. Neurosci.* **8**: 383–95.
 118. Coiro V., G. Saccani-Jotti, R. Minelli, *et al.* 2005. Adrenocorticotropin/cortisol and arginine-vasopressin secretory patterns in response to ghrelin in normal men. *Neuroendocrinology* **81**: 103–6.
 119. Arvat E., M. Maccario, L. Di Vito, *et al.* 2001. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and

- interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**: 1169–74.
120. Coiro V., R. Volpi, A. Stella, *et al.* 2011. Oxytocin does not modify GH, ACTH, cortisol and prolactin responses to Ghrelin in normal men. *Neuropeptides* **45**: 139–42.
121. Asakawa A., A. Inui, T. Kaga, *et al.* 2001. A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology* **74**: 143–7.
122. Wren A.M., C.J. Small, C. V Fribbens, *et al.* 2002. The hypothalamic mechanisms of the hypophysiotropic action of ghrelin. *Neuroendocrinology* **76**: 316–24.
123. Pekary A.E. & A. Sattin. 2012. Rapid modulation of TRH and TRH-like peptide release in rat brain and peripheral tissues by ghrelin and 3-TRP-ghrelin. *Peptides* **36**: 157–67.
124. Mozid A.M., G. Tringali, M.L. Forsling, *et al.* 2003. Ghrelin is released from rat hypothalamic explants and stimulates corticotrophin-releasing hormone and arginine-vasopressin. *Horm. Metab. Res.* **35**: 455–9.
125. Kageyama K., K. Akimoto, S. Yamagata, *et al.* 2012. Dexamethasone stimulates the expression of ghrelin and its receptor in rat hypothalamic 4B cells. *Regul. Pept.* **174**: 12–17.
126. Schmidt M. V., S. Levine, S. Alam, *et al.* 2006. Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. *J. Neuroendocrinol.* **18**: 865–874.
127. Spencer S.J., L. Xu, M.A. Clarke, *et al.* 2012. Ghrelin regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and restricts anxiety after acute stress. *Biol. Psychiatry* **72**: 457–465.
128. Patterson Z.R., R. Khazall, H. MacKay, *et al.* 2013. Central ghrelin signaling mediates the metabolic response of C57BL/6 male mice to chronic social defeat stress. *Endocrinology* **154**: 1080–1091.
129. Kawakami A., N. Okada, K. Rokkaku, *et al.* 2008. Leptin inhibits and ghrelin augments hypothalamic noradrenaline release after stress. *Stress* **11**: 363–369.
130. Ziko I., L. Sominsky, S.N. De Luca, *et al.* 2018. Acylated ghrelin suppresses the cytokine response to lipopolysaccharide and does so independently of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain. Behav. Immun.* 0–1.
131. Huang H.-J., X.-C. Zhu, Q.-Q. Han, *et al.* 2017. Ghrelin alleviates anxiety- and depression-like behaviors induced by chronic unpredictable mild stress in rodents. *Behav. Brain Res.* **326**: 33–43.
132. Sominsky L. & S.J. Spencer. 2014. Eating behavior and stress: A pathway to obesity. *Front. Psychol.* **5**: 1–8.
133. Hulbert A.J. 2000. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **75**: 519–631.
134. Caminos J.E., L.M. Seoane, S.A. Tovar, *et al.* 2002. Influence of thyroid status and growth hormone deficiency on ghrelin. *Eur. J. Endocrinol.* **147**: 159–63.

135. Giménez-Palop O., G. Giménez-Pérez, D. Mauricio, *et al.* 2005. Circulating ghrelin in thyroid dysfunction is related to insulin resistance and not to hunger, food intake or anthropometric changes. *Eur. J. Endocrinol.* **153**: 73–9.
136. Riis A.L.D., T.K. Hansen, N. Møller, *et al.* 2003. Hyperthyroidism is associated with suppressed circulating ghrelin levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**: 853–7.
137. Röjdmarm S., J. Calissendorff, O. Danielsson, *et al.* 2005. Hunger-satiety signals in patients with Graves' thyrotoxicosis before, during, and after long-term pharmacological treatment. *Endocrine* **27**: 55–61.
138. Kokkinos A., I. Mourouzis, D. Kyriaki, *et al.* 2007. Possible implications of leptin, adiponectin and ghrelin in the regulation of energy homeostasis by thyroid hormone. *Endocrine* **32**: 30–2.
139. Takaya K., H. Ariyasu, N. Kanamoto, *et al.* 2000. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**: 4908–11.
140. Kluge M., S. Riedl, M. Uhr, *et al.* 2010. Ghrelin affects the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in humans by increasing free thyroxine and decreasing TSH in plasma. *Eur. J. Endocrinol.* **162**: 1059–65.
141. Kluge M., D. Schmidt, M. Uhr, *et al.* 2013. Ghrelin suppresses nocturnal secretion of luteinizing hormone (LH) and thyroid stimulating hormone (TSH) in patients with major depression. *J. Psychiatr. Res.* **47**: 1236–9.
142. Mahmoudi F., F. Mohsenzhad, H. Khazali, *et al.* 2011. The effect of central injection of ghrelin and bombesin on mean plasma thyroid hormones concentration. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **10**: 627–32.
143. Kordi F. & H. Khazali. 2015. The effect of ghrelin and estradiol on mean concentration of thyroid hormones. *Int. J. Endocrinol. Metab.* **13**: e17988.
144. Sosić-Jurjević B., D. Stevanović, V. Milosević, *et al.* 2009. Central ghrelin affects pituitary-thyroid axis: histomorphological and hormonal study in rats. *Neuroendocrinology* **89**: 327–36.
145. Cyr N.E., A.M. Toorie, J.S. Steger, *et al.* 2013. Mechanisms by which the orexigen NPY regulates anorexigenic α -MSH and TRH. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **304**: E640-50.
146. Guo F., K. Bakal, Y. Minokoshi, *et al.* 2004. Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology* **145**: 2221–7.
147. Ghamari-Langroudi M., K.R. Vella, D. Srisai, *et al.* 2010. Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Mol. Endocrinol.* **24**: 2366–81.
148. Perello M., R.C. Stuart & E.A. Nillni. 2006. The role of intracerebroventricular administration of leptin in the stimulation of prothyrotropin releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* **147**: 3296–306.
149. Ishizaki S., T. Murase, Y. Sugimura, *et al.* 2002. Role of ghrelin in the regulation of vasopressin release in conscious rats. *Endocrinology* **143**: 1589–93.

150. Gálfi M., M. Radács, Z. Molnár, *et al.* 2016. Ghrelin-Induced Enhancement of Vasopressin and Oxytocin Secretion in Rat Neurohypophyseal Cell Cultures. *J. Mol. Neurosci.* **60**: 525–530.
151. Haam J., I.R. Popescu, L.A. Morton, *et al.* 2012. GABA Is Excitatory in Adult Vasopressinergic Neuroendocrine Cells. *J. Neurosci.* **32**: 572–582.
152. Hashimoto H., H. Fujihara, M. Kawasaki, *et al.* 2007. Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats. *Endocrinology* **148**: 1638–47.
153. Miettlicki E.G., E.L. Nowak & D. Daniels. 2009. The effect of ghrelin on water intake during dipsogenic conditions. *Physiol. Behav.* **96**: 37–43.
154. Mao Y., T. Tokudome & I. Kishimoto. 2016. Ghrelin and Blood Pressure Regulation. *Curr. Hypertens. Rep.* **18**: 15.
155. Perello M. & J. Raingo. 2013. Leptin activates oxytocin neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in both control and diet-induced obese rodents. *PLoS One* **8**: e59625.
156. Zhang J., S. Liu, M. Tang, *et al.* 2008. Optimal locations and parameters of gastric electrical stimulation in altering ghrelin and oxytocin in the hypothalamus of rats. *Neurosci. Res.* **62**: 262–269.
157. Yokoyama T., T. Saito, T. Ohbuchi, *et al.* 2009. Ghrelin Potentiates Miniature Excitatory Postsynaptic Currents in Supraoptic Magnocellular Neurones. *J. Neuroendocrinol.* **21**: 910–920.
158. Vila G., M. Riedl, M. Resl, *et al.* 2009. Systemic administration of oxytocin reduces basal and lipopolysaccharide-induced ghrelin levels in healthy men. *J. Endocrinol.* **203**: 175–9.
159. Torres P.J., E.M. Luque, M.F. Ponzio, *et al.* 2018. The role of intragestational ghrelin on postnatal development and reproductive programming in mice. *Reproduction* **156**: 331–341.
160. Chouzouris T.M., E. Dovolou, P. Georgoulas, *et al.* 2018. Effects of pregnancy and short-lasting acute feed restriction on total ghrelin concentration and metabolic parameters in dairy cattle. *Theriogenology* **106**: 141–148.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Simplified diagram of the participation of the PVN in the control of feeding. The paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) hosts populations of neurons that project to hindbrain nuclei, such as the nucleus of the solitary tract (NTS) and parabrachial nucleus (PBN), to inhibit food intake. The anorectic PVN neurons receive afferent input from several nuclei that either increase or decrease their activity, such as the subfornical organ (SFO), the lateral hypothalamic area (LHA) and the arcuate (ARC), tuberal (TN) and raphe (RN) nuclei. Additionally, sensory circumventricular organs, such as the SFO and the area postrema (AP) may indirectly influence the PVN through their connections, respectively, to the ARC and NTS.

Figure 2. Ghrelin's effects in PVN neurons. Extracellular recordings from rat PVN neurons demonstrated that the effects of ghrelin are not clearly anatomically distributed (A), and that the excitatory effects are direct while the inhibitory effects are indirect, since they are abolished by the administration of synaptic blockers GABA-A and glutamate receptor antagonists (B). Additionally, the whole cell patch clamp recordings from qPCR identified PVN neurons showed that most of the OT, CRH, and TRH neurons are inhibited in response to ghrelin administration (C). Summary of the data from Dos-Santos, R.C. *et al.* 2018, reproduced with permission. PALM, PAMP, and PAPO, respectively, lateral magnocellular, medial parvocellular and posterior parvocellular portions of the PVN.

Figure 3. Hypothetical model for ghrelin effects on PVN cells. The results from electrophysiological studies of ghrelin effects on paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) neurons suggest that ghrelin either directly affects PVN neurons, affects GABAergic interneurons within the PVN or modulates inputs from NPY-afferents from the arcuate nucleus or other afferents from several different brain nuclei. Then, the affected PVN neuron is able to send retrograde signals through the dendrites to modulate its own function, either releasing vasopressin (AVP) in astrocytes that release ATP in GABAergic interneurons or releasing endocannabinoids (ECN) that act on CB1 receptors in afferent neurons. GHSR, Growth Hormone Secretagogue Receptor; P2XR,

1
2
3 type 2 purinergic receptor; CB1, type 1 cannabinoid receptor; Y 3/5 R, types 3 and 5
4 neuropeptide Y receptors; MC 3/4, types 3 and 4 melanocortin receptors; GABA R,
5 gamma-aminobutyric acid receptor.
6
7
8
9

10
11 **Figure 4. Summary of ghrelin effects in the PVN.** The effects of ghrelin on plasma
12 levels of ACTH, TSH, glucocorticoid and thyroid hormones suggest that ghrelin affects
13 neuroendocrine PVN neurons, increasing the activity of the CRH axis and decreasing
14 the activity of the TRH axis, whilst inducing the release of AVP and OT from
15 magnocellular PVN neurons. Additionally, ghrelin possesses other efferent neurons that
16 decrease food intake and increase fat metabolism, ghrelin inhibits these neurons and,
17 consequently, induces food intake and blunts fat metabolism.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

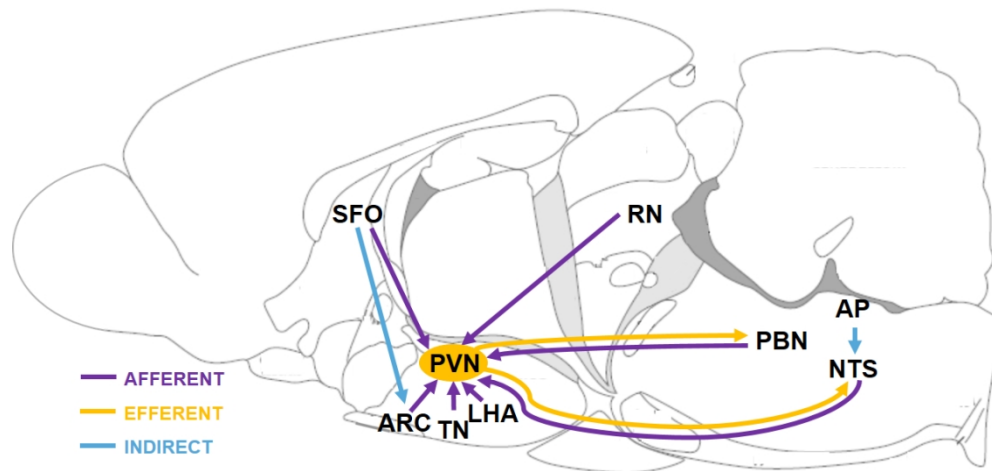


Figure 1. Simplified diagram of the participation of the PVN in the control of feeding. The paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) hosts populations of neurons that project to hindbrain nuclei, such as the nucleus of the solitary tract (NTS) and parabrachial nucleus (PBN), to inhibit food intake. The anorectic PVN neurons receive afferent input from several nuclei that either increase or decrease their activity, such as the subfornical organ (SFO), the lateral hypothalamic area (LHA) and the arcuate (ARC), tuberal (TN) and raphe (RN) nuclei. Additionally, sensory circumventricular organs, such as the SFO and the area postrema (AP) may indirectly influence the PVN through their connections, respectively, to the ARC and NTS.

338x190mm (96 x 96 DPI)

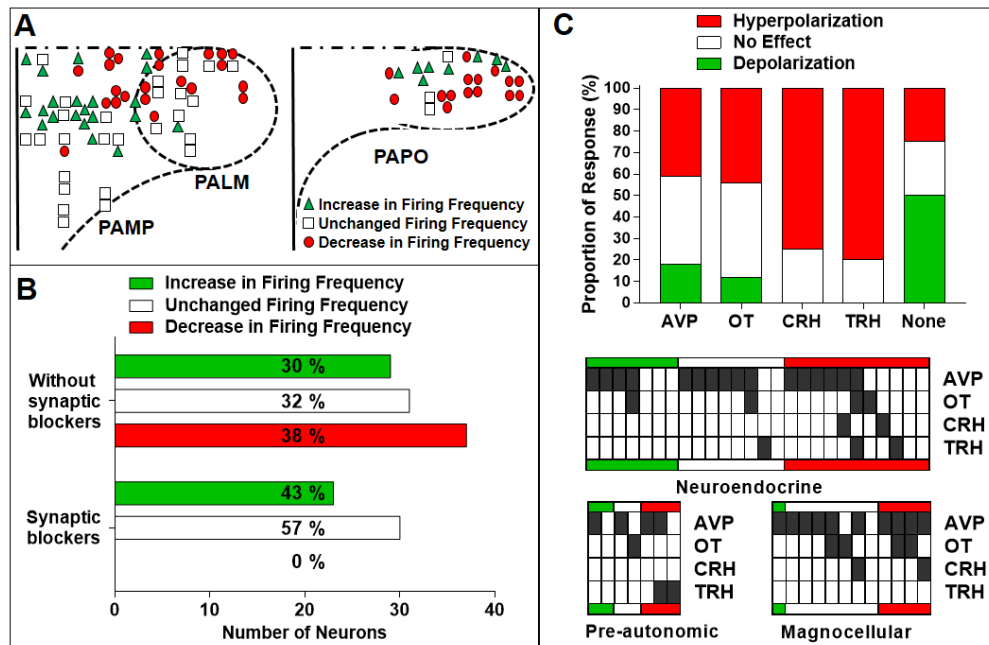


Figure 2. Ghrelin's effects in PVN neurons. Extracellular recordings from rat PVN neurons demonstrated that the effects of ghrelin are not clearly anatomically distributed (A), and that the excitatory effects are direct while the inhibitory effects are indirect, since they are abolished by the administration of synaptic blockers GABA-A and glutamate receptor antagonists (B). Additionally, the whole cell patch clamp recordings from qPCR identified PVN neurons showed that most of the OT, CRH, and TRH neurons are inhibited in response to ghrelin administration (C). Summary of the data from Dos-Santos, R.C. et al. 2018, reproduced with permission. PALM, PAMP, and PAPO, respectively, lateral magnocellular, medial parvocellular and posterior parvocellular portions of the PVN.

279x183mm (96 x 96 DPI)

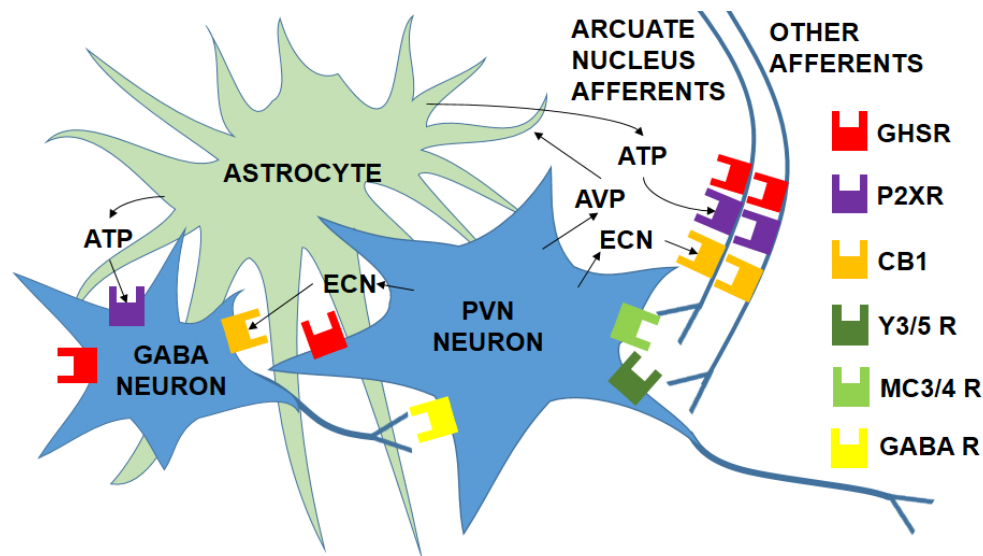


Figure 3. Hypothetical model for ghrelin effects on PVN cells. The results from electrophysiological studies of ghrelin effects on paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) neurons suggest that ghrelin either directly affects PVN neurons, affects GABA-ergic interneurons within the PVN or modulates inputs from NPY-afferents from the arcuate nucleus or other afferents from several different brain nuclei. Then, the affected PVN neuron is able to send retrograde signals through the dendrites to modulate its own function, either releasing vasopressin (AVP) in astrocytes that release ATP in GABAergic interneurons or releasing endocannabinoids (ECN) that act on CB1 receptors in afferent neurons. GHSR, Growth Hormone Secretagogue Receptor; P2XR, type 2 purinergic receptor; CB1, type 1 cannabinoid receptor; Y 3/5 R, types 3 and 5 neuropeptide Y receptors; MC 3/4, types 3 and 4 melanocortin receptors; GABA R, gamma-aminobutyric acid receptor.

246x136mm (96 x 96 DPI)

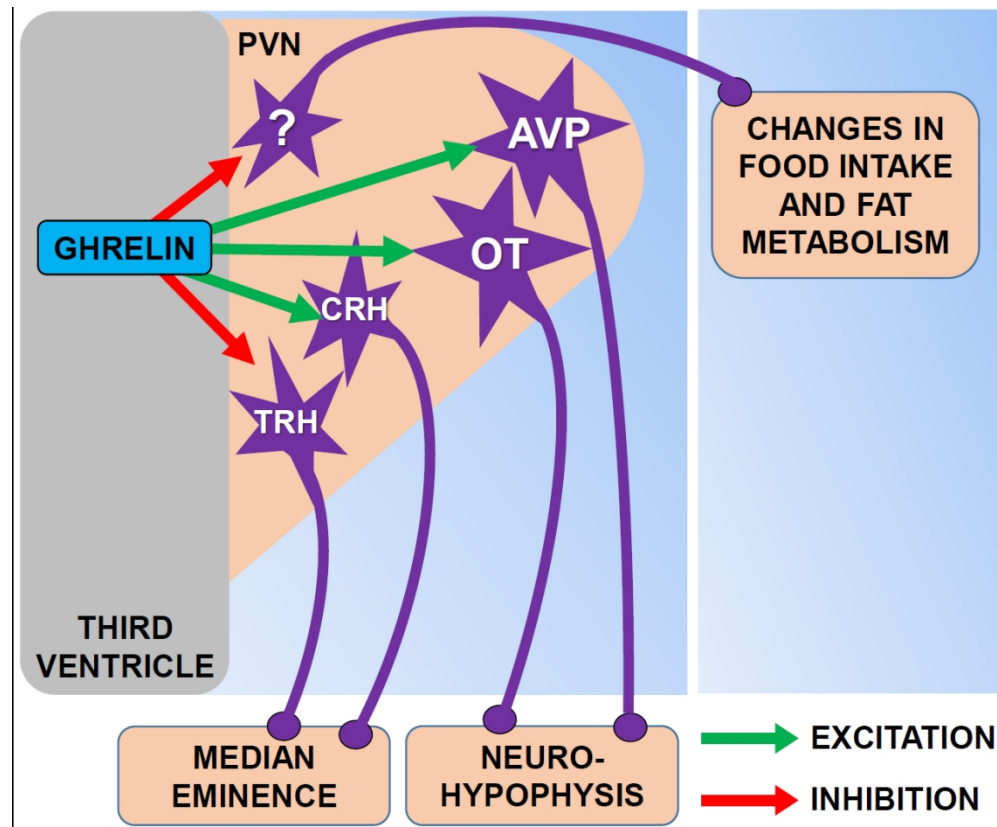


Figure 4. Summary of ghrelin effects in the PVN. The effects of ghrelin on plasma levels of ACTH, TSH, glucocorticoid and thyroid hormones suggest that ghrelin affects neuroendocrine PVN neurons, increasing the activity of the CRH axis and decreasing the activity of the TRH axis, whilst inducing the release of AVP and OT from magnocellular PVN neurons. Additionally, ghrelin possesses other efferent neurons that decrease food intake and increase fat metabolism, ghrelin inhibits these neurons and, consequently, induces food intake and blunts fat metabolism.

344x284mm (96 x 96 DPI)