



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Importância do receptor do hormônio do crescimento no transporte de GH
para o sistema nervoso central**

FILIPPE MENEZES BEZERRA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge
Soares**

**São Paulo
2022**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo
Importância do receptor do hormônio do crescimento no transporte de GH
para o sistema nervoso central

FILIPPE MENEZES BEZERRA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares

Versão corrigida
Versão original disponível no IPEN

São Paulo
2022

Auxílio CAPES: 88887.475080/2020-00

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

MENEZES, F. Importância do receptor do hormônio do crescimento no transporte de GH para o sistema nervosa central. 2022. 107 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Menezes , Filipe

Importância do receptor do hormônio do crescimento no transporte de GH para o sistema nervoso central / Filipe Menezes ; orientador Carlos Roberto Jorge Soares. -- São Paulo, 2022.

107 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2022.

1. hormônio do crescimento. 2. barreira hematoencefálica.
3. sistema nervoso central. I. Roberto Jorge Soares, Carlos , orient. II. Título.

Agradecimentos

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, em especial, ao Centro de Biotecnologia e Centro de Radiofarmácia pelo suporte na realização deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Roberto Jorge Soares pela oportunidade, orientação, transmissão de conhecimentos e experiências, além da gentileza e motivação.

À Dra. Cibele Nunes Peroni e Dra. Miriam Fussae Suzuki do Centro de Biotecnologia do IPEN pelo auxílio e direcionamento no desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia do IPEN, João Ezequiel de Oliveira e Antonio Carlos Junqueira, pelo auxílio e suporte na execução do trabalho.

Aos pesquisadores e amigos Felipe Douglas Silva e Renan Passos Freire, pelo auxílio e suporte em momentos de dúvidas.

À pesquisadora Amanda Palermo Nunes, com estima e consideração pela amizade, pelo apoio em todos os momentos, pelas conversas e trocas sobre neurociências e comportamento.

À querida amiga, pesquisadora Alissandra Moura Gomes, que sempre me motivou e encorajou a pesquisa científica, além de realizar a indicação que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Dr. Emerson Soares Bernardes, gerente do Centro de Radiofarmácia do IPEN e a Dra. Sofia Nascimento dos Santos, pesquisadora do Centro de Radiofarmácia do IPEN, pelo acolhimento e fornecimento de material e treinamento para os testes de radiomarcção, biodistribuição e imagem.

À Dra. Martha Sahyli Ortega e Dr. Fabio Fernando Alves da Silva do Centro de Radiofarmácia do IPEN, e ao Dr. Walter Miguel Turato da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, que auxiliaram nos experimentos de radiomarcção, biodistribuição e imagem.

Ao Dr. José Donato Junior do Laboratório de Neuroanatomia Funcional do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas I (ICB-I), por contribuir com a idealização deste trabalho, fornecendo o suporte para a realização.

Ao Dr. Frederick Wasinski do ICB-I pelo auxílio em ensaios com animais.

A todos os pesquisadores e funcionários que contribuíram de alguma forma, pois a pesquisa científica sempre acontece de forma colaborativa.

À minha amada família, mãe e irmãos pelo apoio e suporte, pois sem eles eu não teria chegado até aqui.

À minha parceira Giovanna Vincitore Fornazari, que me acompanhou e motivou em toda essa jornada, sendo ouvinte das ideias e inquietações.

Epígrafe

“No caminho para o crescimento, o estímulo da vontade é uma chave que dá acesso às janelas do conhecimento.”

Resumo

Menezes, F. **Importância do receptor do hormônio do crescimento no transporte de GH para o sistema nervoso central.** 2022. 118 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP. São Paulo.

O hormônio do crescimento (GH) apresenta uma série de ações sistêmicas, além de atuar diretamente no sistema nervoso central (SNC). O mecanismo pelo qual esse e outros hormônios proteicos entram no SNC a partir da circulação ainda não é bem compreendido. A resposta a essa questão se torna mais desafiadora considerando que o GH possui peso molecular relativamente alto (22 kDa), o que pelos conhecimentos atuais inviabilizaria a sua passagem através da barreira hematoencefálica (BHE) sem a ação de um sistema de transporte. Considerando a alta expressão do receptor do hormônio do crescimento (GHR) no encéfalo, incluindo estruturas que fazem a interface entre a circulação sistêmica e o SNC (plexo coróide e eminência mediana, por exemplo), existe a hipótese do GHR se ligar a esse hormônio e transportá-lo para o parênquima cerebral ou para o líquido cefalorraquidiano (LCR). O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a importância do GHR para a passagem do GH da circulação sistêmica para o SNC. Para isso, estudamos o transporte do Hormônio do Crescimento Porcino (pGH) marcado com ^{131}I (^{131}I -pGH) para o SNC de camundongos knockout para o gene do GHR. Inicialmente testamos um modelo de camundongo knockout temporal (Cre-loxP), que perde a expressão do receptor na fase adulta, mas não houve uma completa deleção na região do cérebro. Optamos então, por um modelo de camundongo knockout global para o GHR (GHR -/-). Padronizamos a radiomarcagem do pGH com ^{131}I pelo método da Cloramina T (CLT), com elevado rendimento na marcação. Injetamos o radiomarcado nos animais knockout e controle comparando a cinética da permeação do ^{131}I -pGH da circulação periférica para o SNC, através da coleta do cérebro total, hipotálamo, fígado e amostras de sangue desses animais em diferentes tempos de exposição. Como resultado o GH se difundiu em tecidos do cérebro, como o hipotálamo, sem a limitação de um transporte mediado pelo seu receptor. Contribuindo assim, para compreender um pouco mais sobre a ação fisiológica desse hormônio no SNC. Realizamos também um ensaio de imagem utilizando Tomografia Computadorizada de Emissão de Fóton Único/ Tomografia

Computadorizada (SPECT-CT), avaliando a distribuição no cérebro do GH marcado desta vez com ^{123}I . Foi demonstrado o grande potencial desta ferramenta para estudos futuros, após adequações do método, na avaliação do mecanismo de transporte do GH para o SNC.

Palavras chave: hormônio do crescimento, SNC, barreira hematoencefálica

Abstract

Menezes, F. **The importance of the growth hormone receptor in the transport of GH into the central nervous system.** 2002. 118 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP. São Paulo.

Growth hormone (GH) has a series of systemic actions, in addition to acting directly on the central nervous system (CNS). The mechanism by which this and other protein hormones enter the CNS from the circulation is still not well understood. The answer to this question becomes more challenging considering that GH has a relatively high molecular weight (22 kDa), which according to current knowledge would make it impossible for it to pass through the blood-brain barrier (BBB) without the action of a transport system. Considering the high expression of the growth hormone receptor (GHR) in the brain, including structures that make the interface between the systemic circulation and the CNS (choroid plexus and median eminence, for example), there is a hypothesis that GHR binds to this hormone and transport it to the brain parenchyma or to the cerebrospinal fluid (CSF). The main objective of this work was to evaluate the importance of GHR for the passage of GH from the systemic circulation to the CNS. For this, we studied the transport of Porcine Growth Hormone (pGH) labeled with ^{131}I (^{131}I -pGH) to the CNS of knockout mice for the GHR gene. Initially, we tested a temporal knockout mouse model (Cre-loxP), which loses receptor expression in adulthood, but there was no complete deletion in the brain region. We then opted for a global knockout mouse model for GHR (GHR $-/-$). We standardized pGH radiolabeling with ^{131}I using the Chloramine T (CLT) method, with high labeling yield. We injected the radiolabel in knockout and control animals comparing the kinetics of ^{131}I -pGH permeation from the peripheral circulation to the CNS, by collecting whole brain, hypothalamus, liver and blood samples from these animals at different exposure times. As a result, GH diffused into brain tissues, such as the hypothalamus, without the limitation of a receptor-mediated transport. Thus contributing to understand a little more about the physiological action of this hormone in the CNS. We also performed an imaging assay using Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography (SPECT-CT), evaluating the distribution in the brain of GH labeled this time with ^{123}I . The great potential of this tool for future studies was demonstrated,

after adaptations of the method, in the evaluation of the GH transport mechanism to the CNS.

Keywords: growth hormone, CNS, blood-brain barrier

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Hormônio do crescimento	4
2.2. Radiomarcção	11
2.3. Receptor do hormônio do crescimento	14
2.4. Modelos animais usados no estudo	21
3. OBJETIVO	25
3.1. Objetivos específicos	25
4. MATERIAIS	25
4.1. Infraestrutura	25
4.2. Equipamentos e acessórios principais	26
4.3. Reagentes e Soluções	27
4.3.1. Desativação gênica dos camundongos Cre-loxP	27
4.3.2. Extração e quantificação de RNA total	27
4.3.3. Real-time PCR	27
4.3.4. Radiomarcção	28
4.3.5. SDS-Page 15%	28
4.3.6. High performance size-exclusion chromatography (HPSEC)	29
4.4. Animais utilizados	29
5. MÉTODOS	30
5.1. Indução dos camundongos knockout para o GHr	30
5.2. Confirmação da ablação do GHr	31
5.2.1. Extração de RNA total	31
5.2.2. Tratamento com Dnase I	31
5.2.3. Transcriptase reversa	32

5.2.4.	Reação de PCR em tempo real.....	32
5.2.5.	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	33
5.3.	Radiomarcção	33
5.3.1.	Padronização do protocolo de radiomarcção	33
5.3.2.	Controle de qualidade iTLC	34
5.3.3.	Estudo de estabilidade do produto marcado (<i>in vitro</i>)	34
5.4.	Impactos da cloramina T no pGH	34
5.5.	Ensaio de biodistribuição e autoradiografia	35
5.6.	Ensaio de biodistribuição em animais knockout global (GHR-/-).....	35
5.7.	Estudo do transporte de ¹³¹ I-pGH e ¹²³ I-albumina para o cérebro em diferentes tempos de exposição	36
5.8.	Estudo do transporte de diferentes doses de ¹³¹ I-pGH para o cérebro em diferentes tempos de exposição	36
5.9.	Estudo do transporte de ¹³¹ I-pGH para o cérebro de animais GHR -/- e controles em diferentes tempos de exposição	37
5.10.	Tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT-CT)	
	37	
6.	RESULTADOS	38
6.1.	Avaliação dos modelos animais Cre-loxP	38
6.2.	Padronização da radiomarcção	42
6.3.	Avaliação dos impactos da CLT no pGH	49
6.4.	Ensaio de biodistribuição	53
6.5.	Avaliação do transporte de ¹³¹ I-pGH para o cérebro em diferentes tempos de exposição.....	57
6.6.	Ensaio de imagem por SPECT-CT	64
7.	DISCUSSÃO	68
8.	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

Lista de Siglas

^{123}I - Iodo-123

^{131}I - Iodo-131

%ID/g - Porcentagem de dose injetada por grama de tecido

μl - Microlitro

μg - Micrograma

kDa – Kilodalton

AGL - Ácidos graxos livres

ARC – Núcleo arqueado do hipotálamo

BHE – Barreira hematoencefálica

CLT - Cloramina T

CP - Plexo coróide

CVOs - Órgãos circunventriculares

GH – Hormônio do crescimento

GHr – Receptor do hormônio do crescimento

GHr -/- - Knockout do receptor global de GH

GHBPs - Proteínas de ligação ao GH

GHRH - Hormônio liberador do hormônio do crescimento

HPSEC - Cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular

IGF- I – Fator de crescimento semelhante à insulina 1

JAK2 - Janus quinase 2

Kev - Quiloelétron-volt

LCR - Líquido encefalorraquidiano

LPL – Lipoproteína lipase

MBq – Mega Bequerel

ME – Eminência mediana

Na ^{131}I - Iodeto de sódio

Na $_2\text{S}_2\text{O}_5$ - Metabissulfito de sódio

Rf - Fator de retenção

SNC - Sistema nervoso central

SPECT - Tomografia computadorizada por emissão de fóton único

SPECT-CT - Tomografia computadorizada de emissão de fóton

ínico/tomografia computadorizada

STAT5b - ativador de transcrição de sinal e transdutor de ativação 5b

STT – Somatostatina

TG – Triglicerídeos

TMX – Tamoxifeno

WT – Wild Type

1. INTRODUÇÃO

A passagem de hormônios da corrente sanguínea para o sistema nervoso central (SNC) é um campo de estudo promissor para compreender a maneira como o corpo e o cérebro estão profundamente integrados (Banks, 2019). As recentes descobertas sobre a atuação do hormônio do crescimento – growth hormone (GH) na regulação central do metabolismo sugerem que os níveis circulantes de GH podem representar um sinal que transmite informações homeostáticas ao cérebro para produzir ajustes metabólicos a fim de promover homeostase energética (Donato *et al.*, 2021). Além disso, o GH periférico é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), interface de comunicação entre a microcirculação cerebral (periferia composta por vasos sanguíneos) e o parênquima cerebral (regiões internas com populações de neurônios) e exercer ações neuroprotetoras, neuroregenerativas, entre outras (Baltazar-Lara *et al.*, 2022). Ainda assim, a questão há muito tempo discutida de como e por onde ocorre a permeação do GH para o SNC ainda não foi elucidada, o que é de grande interesse, já que o conhecimento sobre esse mecanismo de transporte pode revelar ainda mais respostas sobre a ação desse hormônio no SNC e contribuir para a identificação das regiões envolvidas no percurso de passagem e potenciais alvos terapêuticos.

A técnica de radiomarcagem do GH com Iodo-131 (¹³¹I) desenvolvida por Greenwood & Hunter (1963) permitiu a realização de estudos de biodistribuição do hormônio, administrado por injeção, através de equipamentos capazes de detectar a radiação emitida pelo radioisótopo ligado à proteína, revelando dessa forma a sua localização nos órgãos e tecidos. Em 1975, Stern e colaboradores usaram essa técnica para demonstrar que o GH radiomarcado era capaz de ser absorvido pelo cérebro quando injetado intraperitonealmente em ratos adultos normais e hipofisectomizados, evidenciando dessa forma a permeação do GH através da BHE. Na época, pelo dogma existente, o peso molecular desse hormônio (22 kDa) inviabilizaria a sua entrada no cérebro sem a atuação de um sistema de transporte ativo. Assim, surgiu a hipótese de que o receptor do hormônio do crescimento (GHR) estaria envolvido nesse transporte e através de estudos sobre a localização do GHR

no SNC, foi sugerido que o plexo coroide (CP) seria a região responsável pela passagem do GH pela BHE e assim o GH circulante entraria no parênquima cerebral (Nyberg & Burman., 1996).

Para avaliar se o influxo sangue-cérebro do GH ocorreria por um mecanismo de transporte saturável, ou seja, dependente de receptor, Pan e colaboradores (2005) realizaram um teste injetando GH radiomarcado em um grupo de camundongos selvagens e GH radiomarcado com adição de um excesso de GH não marcado em outro grupo. Curiosamente, os resultados mostraram que não houve modulação do influxo. Os autores atribuíram essa difusão passiva às características físico-químicas do hormônio, mas as regiões envolvidas no percurso de passagem e a necessidade do GHr para difusão do GH no parênquima cerebral permaneceram inconclusivas. Este é o trabalho mais recente que encontramos na literatura com o objetivo de estudar o mecanismo de transporte do GH para o SNC. Em relação aos mecanismos potenciais para o GH permear da circulação para o SNC, existe a especulação de que este hormônio pode alcançar seus locais responsivos no cérebro contornando a BHE através da eminência mediana (ME) no hipotálamo, região conhecida por servir como órgão circumventricular (CVO) que permite que os polipeptídeos hipotalâmicos deixem o cérebro sem romper a BHE e que também torna possível que compostos hormonais que não cruzam a BHE interajam com circuitos cerebrais (Ganong, 2000; Hallberg & Nyberg., 2012).

O uso de animais transgênicos contribui significativamente para a compreensão da participação de receptores envolvidos no transporte de hormônios para o SNC. Um estudo realizado com a prolactina (PRL), outro hormônio hipofisário, utilizando camundongos knockout global para o receptor de prolactina (PRLr), demonstrou que o transporte da PRL radiomarcada no cérebro do camundongo é independente do PRLr. Apesar disso, no teste de saturação foi observada modulação do influxo sangue-cérebro, indicando que esse transporte ocorreu por um mecanismo saturável, possivelmente através de outro receptor ainda desconhecido (Brown *et al.*, 2016). A insulina é um hormônio produzido no pâncreas, que a partir da circulação é capaz de atravessar a BHE por um mecanismo de transporte ativo e saturável para regular o metabolismo sistêmico da glicose e a alimentação. Recentemente, em um estudo utilizando camundongos knockout para o receptor de insulina em células especializadas da ME, foi demonstrado que a ausência do receptor nesta região, mas não em vasos endoteliais, comprometeu o acesso da insulina a outras regiões do

hipotálamo como o núcleo arqueado (ARC) (Kumar *et al.*, 2021). A grelina, um hormônio secretado pelas células endócrinas do trato gastrointestinal que atua no SNC através do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHSR), é capaz de extravasar passivamente os capilares fenestrados de CVO's, como a ME a área postrema (AP) (Schaeffer *et al.*, 2013; Cabral *et al.*, 2017). Em camundongos knockout para o GHSR, a grelina é capaz de atravessar a ME e o CP, mas em menor grau, comparado aos animais Wild Type (WT), indicando que a grelina circulante atravessa a barreira sangue-cérebro através de mecanismos dependentes e independentes do receptor (Uriarte *et al.*, 2021).

Até agora, nenhum estudo havia sido realizado com animais transgênicos para avaliar a necessidade do GHr no transporte de GH para o SNC. O estudo realizado por Pan e colaboradores (2005), utilizando camundongos WT, demonstrou que o excesso de GH não foi capaz de modular o influxo sangue-cérebro, mas a presença do receptor no modelo animal utilizado no estudo e a sensibilidade do ensaio não foi capaz de avaliar a participação do GHr nesse transporte. Portanto, se há algum grau de variação do influxo sangue-cérebro na ausência do receptor e se o GHr é necessário para que o GH possa se difundir no parênquima cerebral e alcançar as regiões mais profundas do cérebro, são questões que permaneceram em aberto. Sendo assim, nos debruçamos nesse trabalho para elucidar esse aspecto do transporte do GH para o SNC e discutimos os impactos e relevância dos resultados obtidos. A luz desse conhecimento nos permitirá entender um pouco mais sobre a ação fisiológica desse hormônio no SNC, contribuindo com informações como o grau de alcance que o GH possui ao penetrar nos tecidos do cérebro para atuar promovendo sinalização e efeitos neuroprotetores.

Nosso grupo de pesquisa possui experiência em trabalhos com hormônios hipofisários, incluindo a expressão, purificação e caracterização do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH), do seu antagonista (hGH-G120R) e preparação de um padrão em radioimunoensaio do rhGH, influência da iodação da cloramina T (CLT) na atividade biológica e imunológica ou raio molecular deste hormônio, bioensaios e usos em terapia gênica (Soares *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2003; Ribela *et al.*, 1993; Bartoline & Ribela., 1986; Bellini *et al.*, 1998; Peroni *et al.*, 2012; Menezes *et al.*, 2017). Também houve colaboração do nosso grupo em um estudo sobre a atuação do GH no SNC, juntamente com o grupo de pesquisa do nosso colaborador Dr. José Donato Junior (Furigo *et al.*, 2017) e através desses e outros

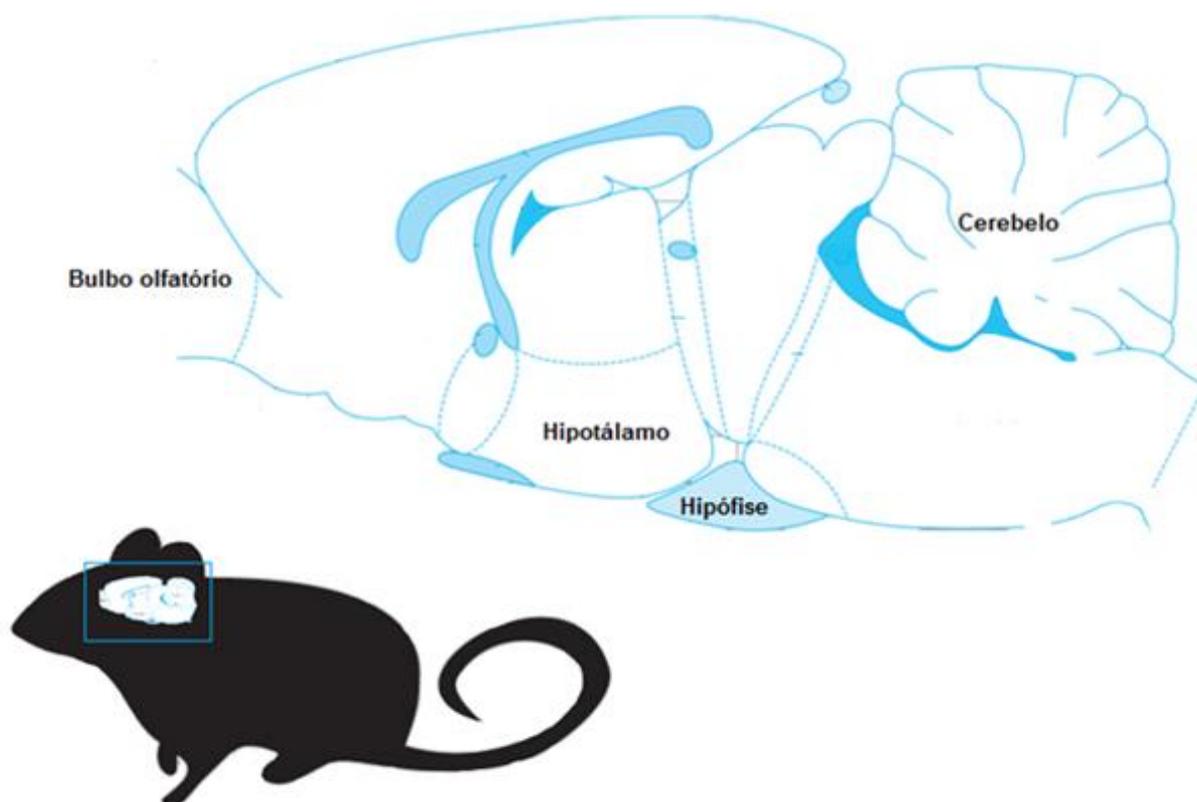
estudos decidimos reunir as experiências de ambos os grupos para elaborar o presente trabalho, com o objetivo de contribuir com a questão que permanece em aberto sobre como e onde ocorre a permeação do GH para o SNC. Fizemos isso realizando a radiomarcagem do GH e avaliando a presença do radiomarcado no hipotálamo e no cérebro total de camundongos selvagens e knockouts para o GHr. Utilizamos nesse estudo, o hormônio do crescimento porcino (pGH) hipofisário, que não se liga ao receptor de prolactina humana, ao contrário do GH humano. O pGH tem 88,9% de homologia de aminoácidos para o GH de camundongo (mGH) e está disponível comercialmente (o mesmo não ocorre com o mGH), sendo amplamente utilizado em diversos trabalhos com camundongos, incluindo estudos para avaliar a atuação do GH no SNC (Cahill, *et al.*, 1997; Khodr *et al.*, 2010; Furigo *et al.*, 2019).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hormônio do crescimento

O hormônio do crescimento (GH) também conhecido como somatotropina, é um polipeptídeo de cadeia simples de 191 aminoácidos (22 kDa) produzido no cérebro por células somatotróficas da hipófise anterior (Buchman *et al.*, 2018), liberado na corrente sanguínea através da qual é capaz de alcançar os mais variados tecidos promovendo múltiplos efeitos no corpo (Devesa *et al.*, 2016). Como o nome indica, o GH está envolvido no crescimento do corpo, mas logo foi observada a sua ampla atuação através da transmissão de informações entre células e órgãos, para controle do desenvolvimento, reprodução e manutenção da homeostase metabólica (Evans & Long., 1921; Ketterer *et al.*, 1957; Birge *et al.*, 1967).

Figura 1 – Representação de um corte sagital do cérebro de um murino identificando a região frontal (bulbo olfatório), occipital (cerebelo) e as regiões anatômicas envolvidas na regulação e secreção do GH (hipotálamo e hipófise).



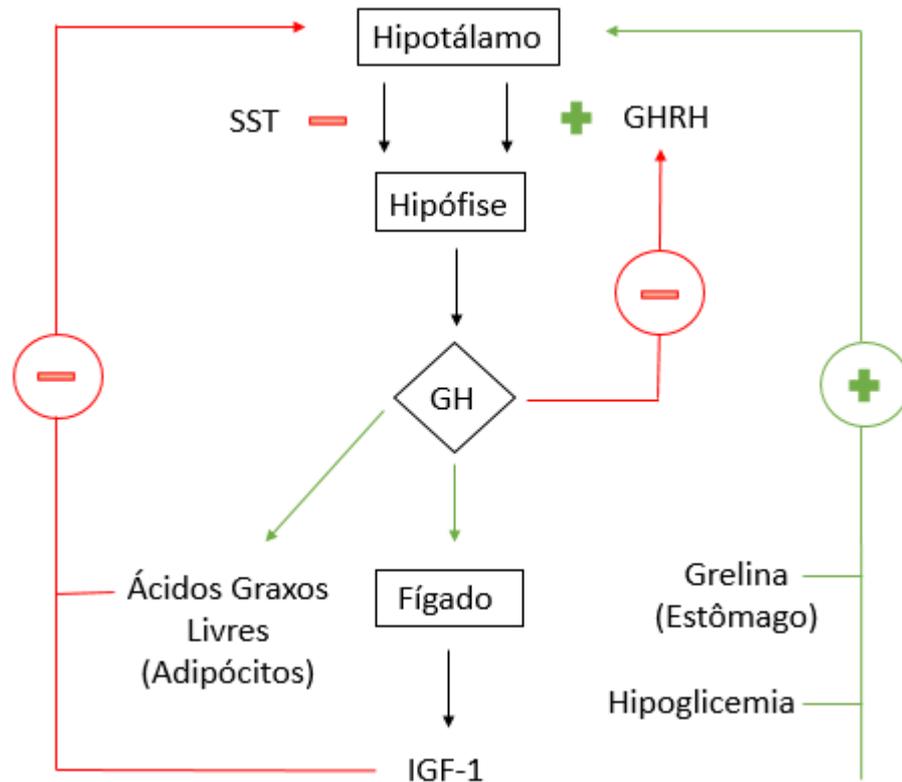
Fonte: The rat brain in stereotaxic coordinates by Paxinos & Watson., 2007 (Adaptado).

A secreção de GH pela hipófise é regulada por meio de vários mecanismos em resposta ao estresse, sono, exercício e nutrição. Isso se dá por complexas interações homeostáticas, mediadas por influências centrais e periféricas (Steyn *et al.*, 2016). O hipotálamo, localizado acima da hipófise, exerce controle induzindo a secreção de GH através do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) e inibindo através da somatostatina (STT), pelo eixo hipófise-hipotálamo. A secreção do GH é regulada por uma complexa inter-relação entre esses dois peptídeos hipotalâmicos secretados em vias independentes e que interagem com secretagogos adicionais do GH, gerando uma liberação pulsátil deste hormônio (Steyn *et al.*, 2016). O padrão pulsátil da secreção do GH é autorregulado por alças de feedback negativo que atuam na hipófise, onde o GH serve como um fator autócrino/parácrino intra-hipofisário (Zhou *et al.*, 2004). Além disso, o GH presente na circulação pode retornar para o SNC e ser detectado pela hipófise, assim como pelo hipotálamo, sinalizando

mudanças nos níveis circulantes de GH e promovendo regulação do eixo somatotrópico (Nass *et al.*, 2000a; Nass *et al.*, 2000b). Um dos principais órgãos de atuação do GH é o fígado, onde estimula a produção do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I), principal responsável pela ação do crescimento longitudinal. Quando os níveis de IGF-I presente na circulação estão elevados, há uma sinalização que resulta em regulação através de um mecanismo de feedback negativo pelo eixo GH-IGF-I (Gahete *et al.*, 2011).

A ingestão alimentar e a composição corporal mudam consideravelmente a secreção do GH. Portanto, não é surpreendente que um número de intermediários que são tradicionalmente vistos como reguladores da ingestão alimentar e do equilíbrio metabólico contribuam para essa regulação (Steyn *et al.*, 2016). A grelina, um hormônio produzido pelo estômago como parte da resposta à fome, possui ação indutora na secreção do GH, capaz de modular a pulsatilidade da secreção de acordo com as necessidades metabólicas (Zhao *et al.*, 2010). Os níveis diminuídos de glicose no sangue também representam um sinal indutor na secreção do GH (Roth *et al.*, 1963). Os ácidos graxos livres (AGL) também influenciam a secreção do GH, mas apesar de representarem um sinal de privação alimentar, possuem efeito inibidor na secreção do GH, promovendo uma sinalização de feedback negativo, pois os níveis elevados de GH são acompanhados de um aumento nos níveis de AGL na corrente sanguínea (Winkler *et al.*, 1964; Sharma *et al.*, 2018). Essas evidências indicam que há um aumento na secreção do GH durante situações de estresse metabólico como a privação alimentar e a hipoglicemia. A regulação da secreção do GH é amplamente modificada pelas necessidades metabólicas e, portanto, está sob controle de feedback de numerosos intermediários que sinalizam fome, saciedade, acúmulo ou desnutrição (Steyn *et al.*, 2016).

Figura 2 - Esquema da regulação da secreção do GH pelo eixo somatotrófico sob influência de fatores hormonais e metabólicos.



Fonte: Fernández-Pérez *et al.*, 2013 (adaptado).

Outros agentes metabólicos estão envolvidos na secreção do GH, como a leptina, um hormônio secretado pelos adipócitos em proporção à massa gorda capaz de inibir o apetite e promover a utilização de energia (Kalra *et al.*, 1999). A queda induzida pelo jejum na secreção de GH em ratos é totalmente prevenida pela administração central de leptina (La Paglia *et al.*, 1998). Em contrapartida, durante os períodos de excesso, como a obesidade, um aumento nos níveis circulantes de leptina é observado juntamente com uma diminuição na secreção de GH (Molero-Conejo *et al.*, 2006). Sendo assim, o efeito da leptina na regulação da secreção do GH está bem estabelecido; no entanto, persiste algum debate sobre potenciais ações inibitórias e estimuladoras, pois esses efeitos podem depender do estado nutricional. Os efeitos na regulação da secreção do GH promovidos pela insulina, que atua estimulando a absorção de glicose pelas células, também podem ser influenciados pelos níveis nutricionais, atenuando ou facilitando vias de sinalização do GH (Qiu *et al.*, 2017). Isso justifica mais estudos para a compreensão de como a secreção do GH é modulada pelas mudanças metabólicas que acontecem no corpo em situações de privação

alimentar, saciedade e excesso. Além de participarem da regulação da secreção do GH, a grelina, leptina e insulina participam da regulação central do metabolismo (Nogueiras *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2008). A permeação de hormônios metabólicos da corrente sanguínea para o SNC tem sido descrita e há indícios de que ocorra por regiões estratégicas objetivando uma resposta mais rápida ao cérebro para a sinalização do estado nutricional (Hoyda *et al.*, 2009). Esse mecanismo de transporte pode fornecer sugestões sobre a passagem do GH para o cérebro, mediante o compartilhamento das ações reguladoras da secreção do GH e da regulação central do metabolismo.

Uma vez na circulação, o GH se liga às proteínas de ligação ao GH (GHBP). Supõe-se que os GHBP tenham dois papéis: um é estabilizar e prevenir a degradação do GH na circulação, e o outro é controlar a biodisponibilidade do GH competindo com o GHr pela ligação ao GH (Baumann *et al.*, 1994; Tuggle & Trenkle., 1996). O GH produzido localmente ou secretado pela hipófise atua no aumento do crescimento e proliferação celular. A participação do GH no crescimento longitudinal do corpo acontece principalmente através da sua atuação no fígado, que é um dos alvos mais caracterizados deste hormônio, pelo estímulo da produção e secreção de IGF-1, que é o principal responsável pelo aumento do comprimento ósseo e massa muscular (Teran *et al.*, 2016). O IGF-1 também é responsável pelo efeito indireto do GH no metabolismo através da indução da resistência à insulina (Friedrich *et al.*, 2012). De forma direta, o GH estimula a produção hepática de glicose preferencialmente através da glicogenólise (quebra de glicogênio em glicose), mas também através da gliconeogênese (conversão de aminoácidos e intermediários do metabolismo da glicose em glicose) (Nishad *et al.*, 2018). O GH também desempenha um papel importante no metabolismo lipídico do fígado, promovendo a captação de triglicerídeos (TG), aumentando a expressão e/ou atividade da lipoproteína lípase (LPL) e/ou da lípase hepática. Além disso, o GH também pode estimular a oxidação de ácidos graxos hepáticos (Kadowaki *et al.*, 2006). No tecido adiposo, o GH estimula a lipólise, especialmente dos depósitos viscerais e subcutâneos (Freda *et al.*, 2008). Ao contrário do tecido adiposo, o GH induz a captação de ácidos graxos livres (AGL) no músculo esquelético pela regulação positiva da expressão da LPL (Khalfallah, 2001), além de induzir o acúmulo de lipídeos no músculo (Freda *et al.*, 2008). O GH é um hormônio anabólico que promove a síntese de proteínas tanto pela diminuição da oxidação de aminoácidos quanto pelo aumento da absorção de aminoácidos de

cadeia ramificada pelo músculo esquelético (Moller & Jorgensen, 2009). De forma geral, o GH desempenha um papel complexo na regulação do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas; aumenta os níveis circulantes de glicose através do aumento da produção endógena de glicose; estimula a lipólise para aumentar os AGL, que por sua vez inibe a oxidação da glicose; e prejudica a sensibilidade à insulina hepática e periférica, particularmente no músculo onde a oxidação da glicose é reduzida. O efeito anabólico do GH nas proteínas é consequência da ativação da lipólise e das ações poupadoras de proteínas dos combustíveis lipídicos. A lipólise induzida por GH nos tecidos viscerais e o subsequente aumento de AGL também interferem nas vias de sinalização da insulina. (Nishad *et al.*, 2018; Vijayakumar *et al.*, 2011; Moller & Jorgensen., 2009).

Além de atuar nos órgãos periféricos, parte do GH presente na circulação periférica retorna para o SNC. A atuação do GH no SNC é tão abrangente quanto a sua atuação no corpo. Em condições patológicas na qual a BHE, estrutura que reveste o endotélio capilar para impedir a passagem de grandes moléculas para o SNC, é parcialmente danificada, como trauma no SNC, hipóxia/isquemia, tumor, processos degenerativos e lesão medular, o GH é capaz de atravessar a BHE e promover efeito de regeneração neuronal (Hanci *et al.*, 1994; Winkler *et al.*, 2000; Gustafon *et al.*, 1999). As células responsivas ao GH estão distribuídas em várias áreas do cérebro, implicadas em funções cognitivas, emocionais, motivacionais e neurovegetativas. As populações mais proeminentes de neurônios responsivos ao GH estão localizadas em áreas hipotalâmicas, incluindo o núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), núcleo paraventricular (PVN) e núcleo ventromedial (VMN) (Furigo *et al.*, 2017). O GH atua em várias populações neuronais hipotalâmicas para modular o metabolismo e a autorregulação da secreção de GH por meio de alças de feedback negativo. No entanto, poucos estudos haviam investigado se a expressão do GHr em populações neuronais específicas é necessária para o controle homeostático da secreção de GH e homeostase energética.

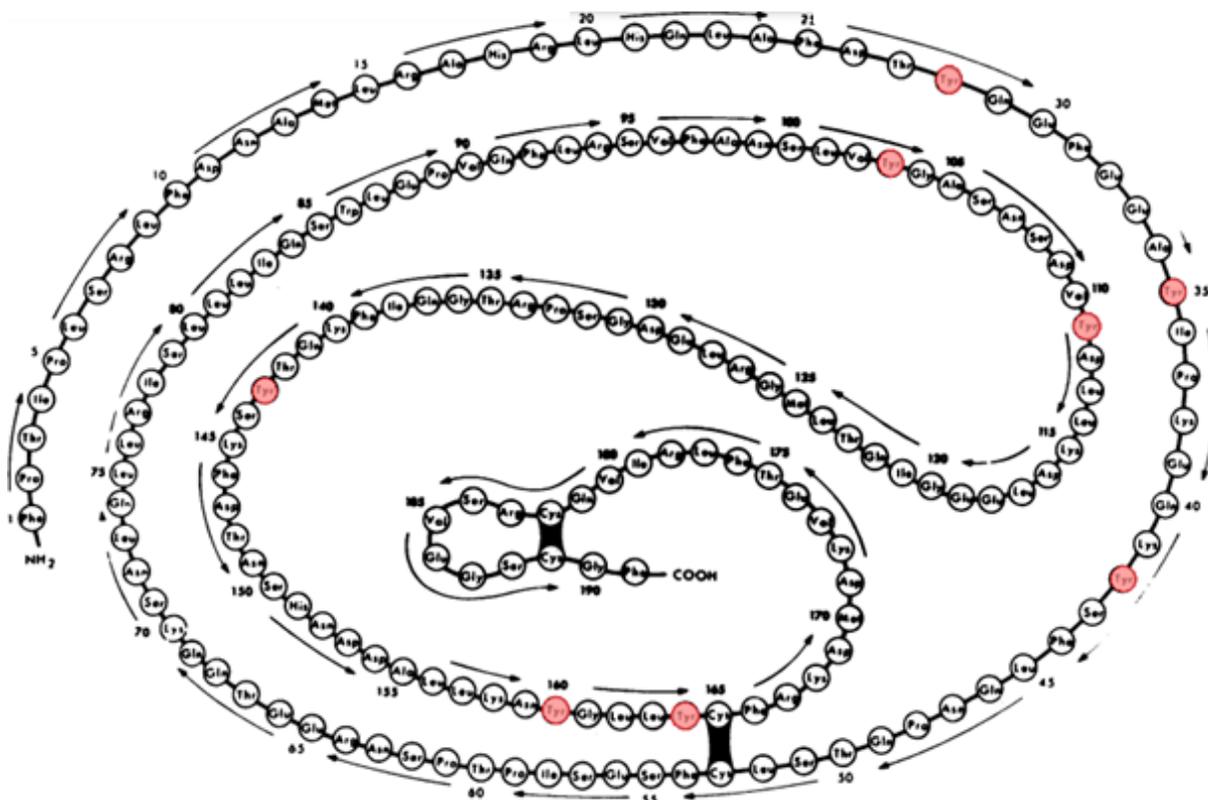
Recentemente, uma série de estudos utilizando modelos animais transgênicos têm sido realizados, esclarecendo cada vez mais a função do GHr em núcleos hipotalâmicos distintos. O modelo proposto anteriormente, previa que a atuação do GH em neurônios hipofisiotrópicos de somatostatina (STT) era capaz de promover uma autoregulação efetiva por meio de feedback negativo (Steyn *et al.*, 2016), mas um estudo realizado com animais knockout de GHr em neurônios de STT do PVN

demonstrou que a ablação de GHR nesses neurônios não impactou os mecanismos de feedback negativo que controlam a secreção pulsátil de GH, sendo observado efeito apenas com a ablação simultânea de GHR e IGF1r (Chaves *et al.*, 2022). Em outro estudo foi observado que a ablação do GHR em neurônios tirosina hidroxilase (TH) no ARC aumentou marcadamente a secreção de pulso de GH e o crescimento corporal de camundongos, desvendando desta forma um grupo crítico e não identificado de interneurônios catecolaminérgicos capazes de detectar os níveis circulantes de GH e usar os neurônios do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) como efetores a jusante para regular os efeitos do eixo somatotrópico (Wasinski *et al.*, 2020). A autorregulação da secreção de GH por meio de alças de feedback negativo também requer a expressão de GHR em células GABAérgicas. Além disso, a ablação de GHR em populações neuronais GABAérgicas e glutamatérgicas leva a alterações metabólicas distintas (Dos Santos *et al.*, 2022). O GH controla a homeostase energética atuando em diferentes núcleos hipotalâmicos. A diminuição das adaptações hipotalâmicas e metabólicas altamente características induzidas pela perda de peso são observadas através da ablação do GHR em neurônios da proteína relacionada ao agouti (AgRP) e a atenuação da hiperfagia glucoprívica em neurônios que expressam proopiomelanocortina (POMC), no ARC (Furigo *et al.*, 2019a; Quaresma *et al.*, 2019). Além disso, há indícios de que o GH tem efeitos tróficos diretos na formação de projeções axonais em neurônios que expressam AgRP e POMC (Wasinski *et al.*, 2020). Os neurônios no VMN que expressam o receptor hipotalâmico de leptina (LepR) e fator esteroideogênico 1 (SF1) respondem diretamente ao GH e a deleção do GHR nessas células também prejudica as respostas neuroendócrinas durante situações de estresse metabólico. Ademais, a sinalização do GHR nestes neurônios regula a capacidade de adaptação ao exercício aeróbio de maneira célula-específica (Furigo *et al.*, 2019a; Pedroso *et al.*, 2020). Assim, fica evidente a importância da expressão do GHR no hipotálamo, colocando essa região em destaque na observação dos impactos da deleção deste receptor no SNC para avaliar a participação do GHR na entrada e difusão do GH nos tecidos do cérebro.

2.2. Radiomarcção

A técnica de radiomarcção do GH com Iodo-131 (^{131}I), desenvolvida por Greenwood & Hunter (1963), consiste na incorporação dos átomos de iodo radioativo pela molécula por substituição eletrolítica e envolve a iododeprotonação de anéis aromáticos ricos em elétrons dos resíduos de tirosina (Vaidyanathan & Zalutsky., 2019). O GH possui oito tirosinas na sua composição (Figura 3). Como o iodo geralmente está disponível como uma solução de iodeto de sódio, um agente oxidante se faz necessário para converter o iodeto de sódio em uma forma eletropositiva. A cloramina T (CLT), um sal sódico de N-clorotoluenosulfonamida, tem sido amplamente utilizada como agente oxidante para liberar iodo diatômico do sódio. O metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) é usado para deter a reação, reduzindo o excesso de CLT, transformando I_2 em I^- e limitando a danificação química (Yamada *et al.*, 2000). A iodação geralmente é restrita a um átomo de iodo por molécula, pois muitos estudos mostraram efeitos deletérios na molécula devido à radioiodação. A atividade específica do ^{131}I calculada para o GH considerando a substituição de um átomo por molécula é de aproximadamente 5,55 MBq/ μg (Freedlender., 1969). Também foi demonstrado que a radioiodação de até 2,7 átomos / molécula não compromete significativamente a atividade biológica e imunológica do GH (Bartolini & Ribela., 1986). Outro fator capaz de causar danificação na molécula do GH é a oxidação causada pela CLT, que pode gerar agregados, ou outras formas alteradas do hormônio, como quebra de pontes internas da molécula (Norman & Turtter., 1968). O fato de o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ não ter efeito no grau de agregação, mesmo quando usado em grande excesso, sugere que a CLT é a principal responsável pela alteração do peso molecular da proteína, mas com relação à perda da atividade biológica e imunológica, o GH se mostrou resiliente após sofrer reação com grandes excessos de CLT (Krohn *et al.*, 1972; Bartolini & Ribela., 1986).

Figura 3 - Representação da cadeia de aminoácidos da estrutura primária do hormônio do crescimento humano, destacando as tirosinas (em vermelho).



Fonte: Li et al., 1976 (adaptado)

Figura 4 - Esquema da radioiodação com uso de iodeto de sódio (Na^{131}I) e incorporação dos átomos de ^{131}I pela molécula de tirosina em uma região do anel aromático composto por uma hidroxila, promovendo substituição eletrolítica através da oxidação pela CLT.



Fonte: Andrews et al., 1992.

A albumina é uma proteína que possui uma função passiva no soro, que é a de controlar a pressão osmótica e manter a capacidade tampão do sangue. A albumina do soro tem peso molecular da ordem de 69 kDa (Conn & Stumpf., 1972) e é muito utilizada como traçador para estudos de permeação sangue-cérebro por ser considerada como tendo uma permeação transcelular mínima em uma BHE intacta (Amtorp., 1976; Schnitzer & Oh., 1994). A marcação da albumina com iodo radioativo também é realizada pelo método da CLT, de forma semelhante ao GH, com alterações nos níveis dos reagentes empregados na técnica. Nesse caso, a atividade específica calculada para a albumina considerando a substituição de um átomo por molécula é de aproximadamente 7,4 MBq/mg (Hallaba & Drouet., 1971). O método da CLT pode ser usado, indiferentemente, para introduzir ^{131}I (Energia 364 Kev) ou ^{123}I (Energia 159 KeV) na proteína. Para estudos que envolvem a detecção da atividade radioativa por equipamento de tomografia computadorizada de emissão de fóton único - tomografia computadorizada (SPECT-CT), capaz de formar imagens do corpo do animal e da localização do radioisótopo, deve-se considerar que a energia do fóton gama emitido pelo radionuclídeo que entra na composição do radiofármaco deve situar-se entre os 80-300 keV. Isto porque os raios gama com energia inferior a 80 keV são absorvidos pelos tecidos e não são detectados exteriormente. Por outro lado, quando a sua energia é superior a 300 keV a eficiência dos detectores dos equipamentos de aquisição de imagens é baixa, resultando em imagens de qualidade baixa (Saha., 2004). Dessa forma, o ideal é que para estudos de SPECT-CT seja utilizada a marcação com ^{123}I .

A radiomarkação tem sido uma ferramenta muito valiosa para as descobertas da atuação do GH no SNC e contribuiu para as linhas de evidência que levaram à especulação da capacidade desse hormônio em cruzar a BHE (Coculescu *et al.*, 1999). Pelo dogma atual, a massa molecular de 22 kDa do GH, seria considerada muito grande para atravessar a BHE. Entre os fatores restritivos, a presença de junções apertadas entre as células endoteliais, os capilares que compõem a BHE e a membrana basal contínua subjacente reduzem substancialmente a permeação paracelular de grandes proteínas (Nyberg., 2000; Begley., 1992). Apesar disso, a passagem do GH através da BHE foi confirmada pela detecção da atividade radioativa presente no cérebro de camundongos que receberam a injeção do hormônio radiomarcado. Essas indicações sugeriram que a travessia do GH pela BHE

puдesse ocorrer através de um mecanismo de transporte ativo, como a transitose mediada por receptores (Nyberg., 2000).

2.3. Receptor do hormônio do crescimento

O receptor do hormônio do crescimento (GHr) é membro da família de receptores de citocinas classe I, que inclui mais de 30 receptores, como o receptor de prolactina, receptor de eritropoietina e receptor de trombopoietina (Waters & Brooks., 2015). O GHr é um receptor homodimérico de 638 aminoácidos com um domínio homólogo ao receptor de citocina, um domínio transmembranar de passagem única e um domínio intracelular citoplasmático (Postel-Vinay & Finidori., 1995). Quando os dois sítios de ligação do GH se ligam aos dois receptores respectivamente, resulta em uma mudança conformacional nos receptores e nas moléculas de tirosina quinase Janus quinase 2 (JAK2) associadas. A JAK2 ativada fosforila o domínio citoplasmático do GHr em resíduos de tirosina, e as vias de transdução de sinal intracelular dependentes e independentes de JAK2 subsequentes evocam respostas celulares, incluindo alterações na transcrição gênica, proliferação, reorganização do citoesqueleto, e metabolismo de lipídios e glicose. JAK2 fosforila os ativadores de transcrição de sinal e transdutores de ativação como STAT5, que é um fator de transcrição chave na regulação do GH de genes-alvo associados ao crescimento corporal e metabolismo intermediário (Waters & Brooks., 2015). Um passo inicial na finalização da sinalização dependente de GH é a remoção do GHr por endocitose e ubiquitinação. O nível de ubiquitina ligase SOCS2 é constitutivamente baixo, mas sua expressão é rapidamente induzida pelo GH. A ligação de SOCS2 ao complexo GH/GHr promove sua ubiquitinação e posterior degradação proteossômica, contribuindo para o término da sinalização intracelular do GH (Flores-Morales *et al.*, 2006).

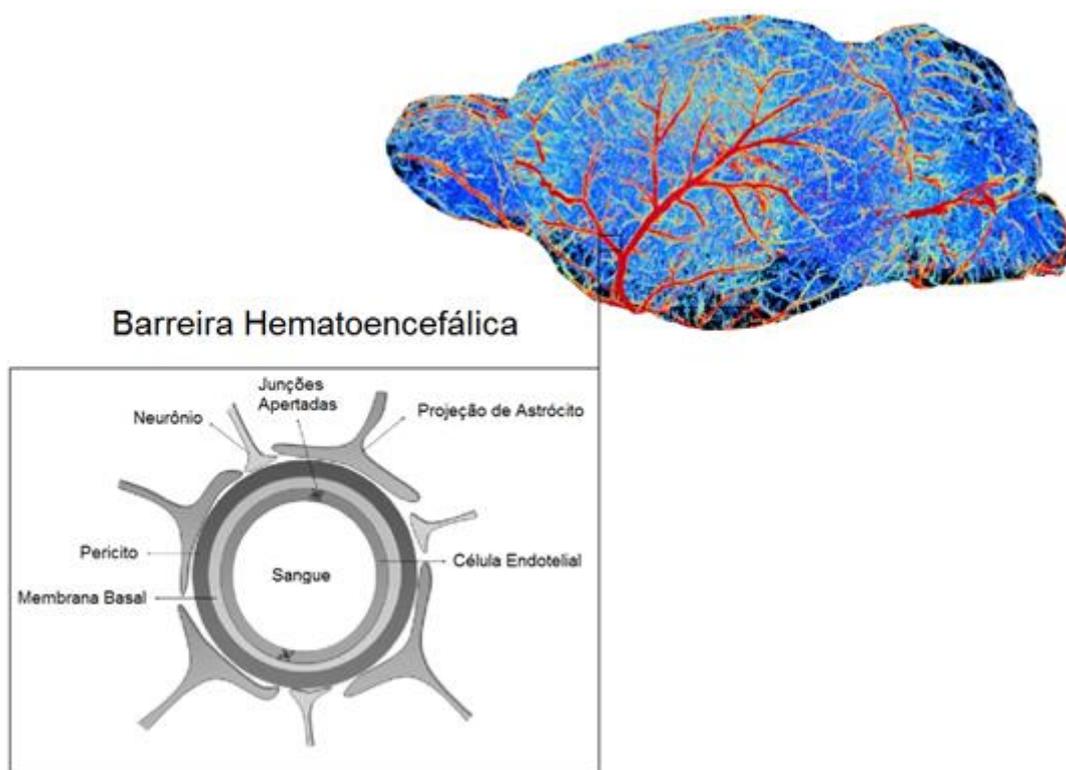
Diferentes vias de internalização podem influenciar no direcionamento do complexo GH/GHr para diferentes regiões do interior da célula, assim como a participação das proteínas de membrana clatrina e caveolina, que desempenham um papel importante na formação de vesículas membranares (Kerkhof *et al.*, 2001; Lobie *et al.*, 1999). Em hepatócitos suínos, o GH/GHr pode se deslocar para núcleos celulares onde exibem importantes funções fisiológicas em uma rota que envolve a

entrada no citoplasma através de endocitose mediada por ambas as proteínas de membrana (Hainan *et al.*, 2018). Foi demonstrado em células derivadas de ovário de hamster chinês (CHO), que a internalização do GH/GHr com direcionamento para as mitocôndrias, com a finalidade de promover estímulo no consumo de oxigênio, é essencialmente conduzida pela via caveolar e a Caixa 1 do domínio intracelular do GHr foi necessário para a ativação da respiração celular a uma exposição ao GH (Perret-Vivancos *et al.*, 2006). Também foi observado que a endocitose mediada pelo receptor pode resultar em exocitose em células IM-9, componente imunológico do sangue periférico, via reciclagem de endossomos e degradação nos lisossomos, respectivamente (Ilondo *et al.*, 1992). Isso fez levantar a hipótese de que o GH periférico pudesse ser transportado dentro de células imunológicas para diferentes regiões do corpo, mas nenhum estudo demonstrou esse tipo de transporte para a entrada do GH no SNC.

A transcitose é um processo pelo qual grandes moléculas atravessam a BHE para o SNC. Este é um processo ativo, saturável e dependente de pH e temperatura (Scherrmann., 2002). Agora, a transcitose pode ser alcançada de duas maneiras: transcitose mediada por receptor ou transcitose mediada por adsorção (Abbott *et al.*, 2010; Tajés *et al.*, 2014; Patel & Page., 2017). Moléculas que são carregadas eletrostaticamente e policatiônicas por natureza, se ligam às moléculas aniônicas da superfície luminal das células endoteliais. Essas moléculas limitadas são então internalizadas em vesículas e transportadas através da membrana (Kamalinia *et al.*, 2015 ; Patel e Page, 2017). Nas células endoteliais cerebrais, os poços revestidos por clatrina estão envolvidos na maior parte da transcitose mediada por receptor, enquanto as caveolinas participam da transcitose mediada por adsorção (Mayor & Pagano., 2007). O GHr expresso nos vasos endoteliais possui papel na mediação do crescimento da parede do vaso (Caicedo *et al.*, 2020), mas a sua atuação no transporte de GH para o SNC a partir dos vasos endoteliais não está claro. O transporte de GH para o SNC mediado pelo receptor ou mediado por adsorção foi testado injetando GH radiomarcado em um grupo de camundongos e GH radiomarcado com adição de um grande excesso de GH não marcado em outro grupo, avaliando a atividade radioativa no cérebro e nos vasos endoteliais que compõe a BHE. Também foi estudada a ligação e captação celular em células endoteliais de microvasos cerebrais em cultura. Os resultados mostraram que o excesso de GH não mostrou modulação aguda do influxo sangue-cérebro e também foi descartada a

presença de endocitose adsorptiva (Pan *et al.*, 2005). Esses resultados demonstraram que o influxo cerebral de GH pode ocorrer por difusão simples, mas as regiões envolvidas no percurso de passagem e a participação do GHr no transporte de GH para o SNC permaneceram não elucidadas.

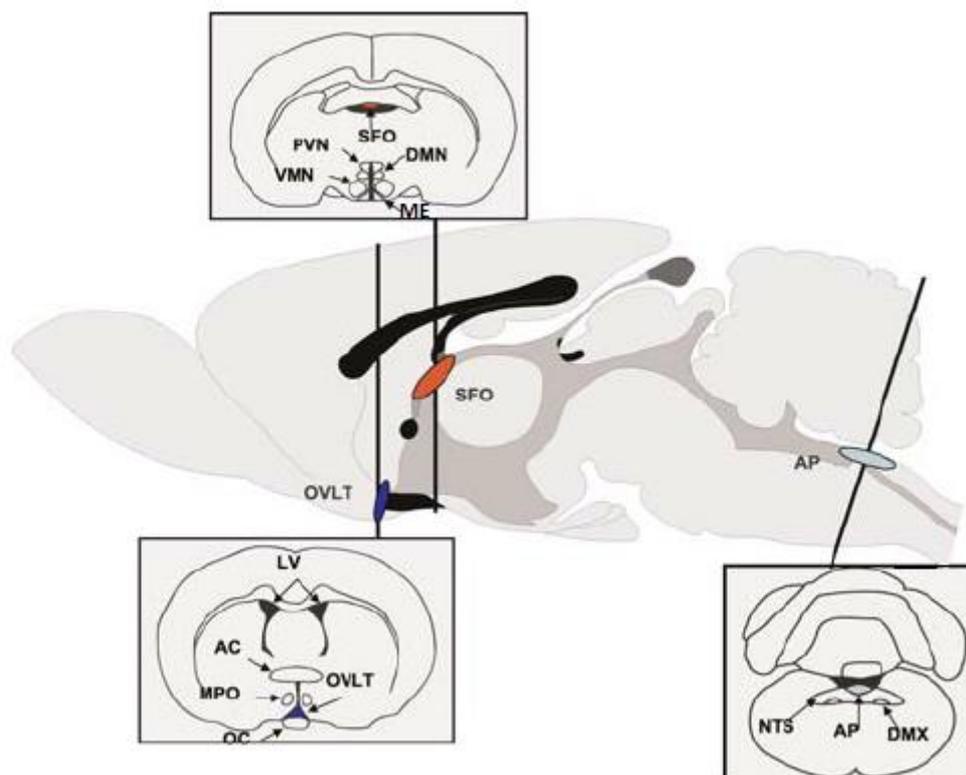
Figura 5 - Imagem representativa mostrando detalhes da vasculatura cerebral de um camundongo e desenho esquemático da barreira hematoencefálica em corte transversal mostrando endotélio, membrana basal, pericitos, astrócitos e junções apertadas.



Fonte: Torodov *et al.*, 2020; Loch-Neckel & Koepp., 2010. Adaptado.

Os órgãos circunventriculares (CVO's) são estruturas cerebrais que revestem o terceiro e o quarto ventrículos (cavidades no cérebro preenchido por líquido) e desempenham um papel na regulação da homeostase do corpo com base na comunicação sangue-cérebro (Gross & Weindl., 1987). Nos CVO's, a interface sangue-cérebro é formada por um rico plexo capilar que abriga um endotélio fenestrado. Esse contorno da BHE por vasos fenestrados é o motivo pelo qual os CVO's são descritos como "janelas cerebrais" (Weindl & Sofroniew., 1981; Gross & Weindl., 1987). Os CVO's são compostos por núcleos secretores e sensoriais, dos quais este último inclui o órgão subfornical (SFO) e a área postrema (AP). Cada um dos CVO's sensoriais estabelece redes neurais, direta e indiretamente, para o hipotálamo, e evidências sugerem que a sinalização nos CVO's sensoriais pode modular parâmetros metabólicos amplos através do controle hipotalâmico (Jeong *et al.*, 2021). O SFO está localizado na linha média do cérebro dentro do ventrículo lateral e é composto por duas sub-regiões anatomicamente distintas, incluindo a casca externa e o núcleo ventromedial. Evidências sugerem arranjo diferencial de moléculas de junção apertada dentro dessas sub-regiões do SFO, que impactam a permeabilidade dependente do tamanho das moléculas transportadas pelo sangue. Por exemplo, a administração periférica de indicadores de permeabilidade revelou que moléculas pequenas (<3000 kDa) acumularam-se principalmente no núcleo ventromedial enriquecido com colágeno IV, enquanto a casca externa dominante em laminina foi mais seletiva para moléculas maiores (>10.000 kDa) (Morita *et al.*, 2016). A AP, situada na parede do quarto ventrículo, consiste em três áreas anatomicamente distintas: as zonas perivascular, central e lateral. A zona central é muito mais fenestrada do que os capilares periféricos, assim, algumas moléculas circulantes podem acessar diretamente a zona central e então se difundir nas zonas perivascular e lateral (Morita *et al.*, 2016). O GHR é expresso tanto no SFO quanto no AP (Furigo *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2020), mas nenhum estudo foi encontrado na literatura avaliando se o GH é capaz de extravasar os capilares dessas regiões ou se o GHR expresso no SFO e no AP poderia participar do transporte do GH da circulação periférica para o SNC.

Figura 6 - O centro deste diagrama mostra uma representação esquemática de um corte sagital mediano através de um cérebro de rato ilustrando as localizações anatômicas dos órgãos circunventriculares (CVO's).

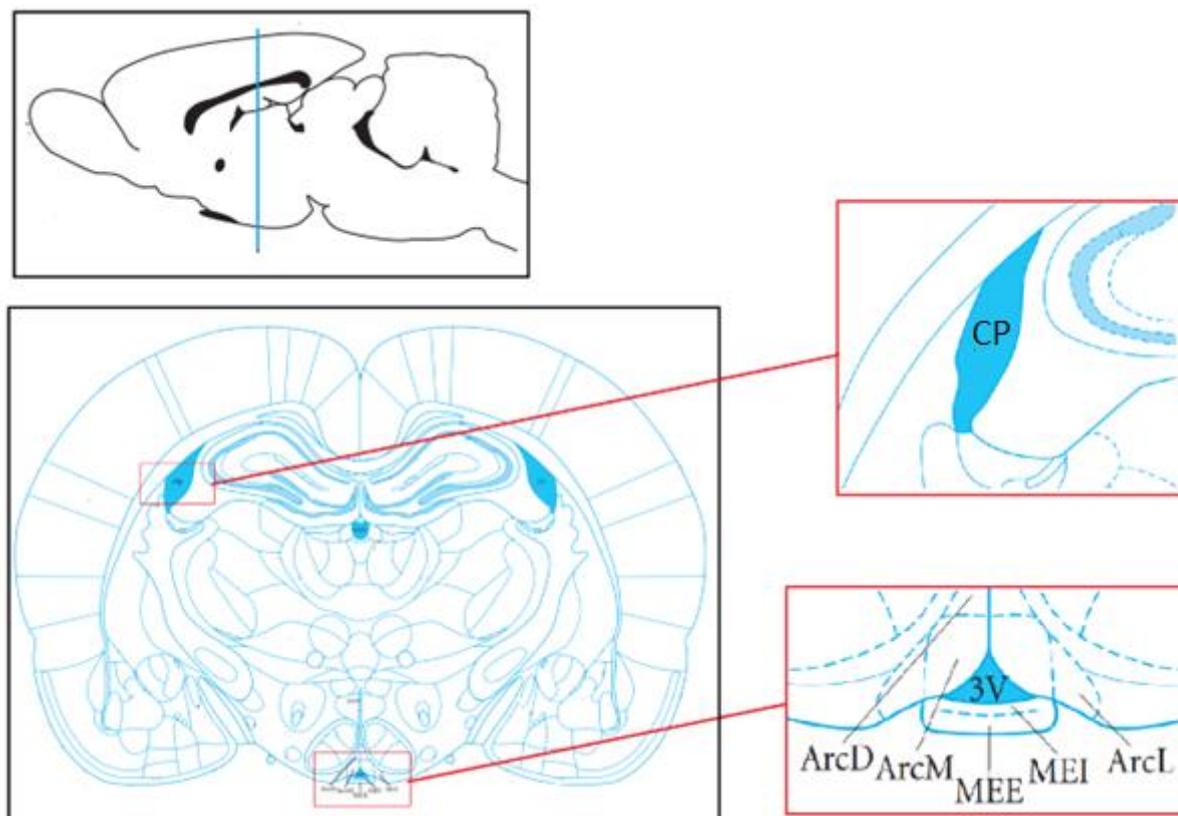


As três inserções mostram cortes coronais destacando o posicionamento do SFO e OVLT dentro do hipotálamo, o AP na medula e a relação dessas áreas com outras regiões implicadas na regulação da homeostase energética e alimentação. Abreviaturas: OVLT, órgão vascular da lâmina terminal; SFO, órgão subfornical; AP, área postrema; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; VMN, núcleo ventromedial; DMN, núcleo dorsomedial; ME, eminência mediana; NTS, núcleo do trato solitário; DMX: núcleo motor dorsal do vago. Fonte: Fry *et al.*, 2007.

Entre os núcleos secretores que compõe as CVO's, está a eminência mediana (ME), uma estrutura do hipotálamo médio basal onde os hormônios liberadores e inibidores do hipotálamo convergem para a porta de um sistema capilar que vasculariza a hipófise anterior (Yin & Gore., 2010). A ME está localizada adjacente ao ARC (Figura 7). Enquanto alguns estudos propuseram o ARC como parte das CVO's (Ciofi., 2011), essa região de fato possui uma BHE intacta e, portanto, está totalmente protegida da circulação (Smith & Ferguson., 2014). O ARC desempenha um papel fundamental na regulação metabólica e os fatores circulantes acessam essa

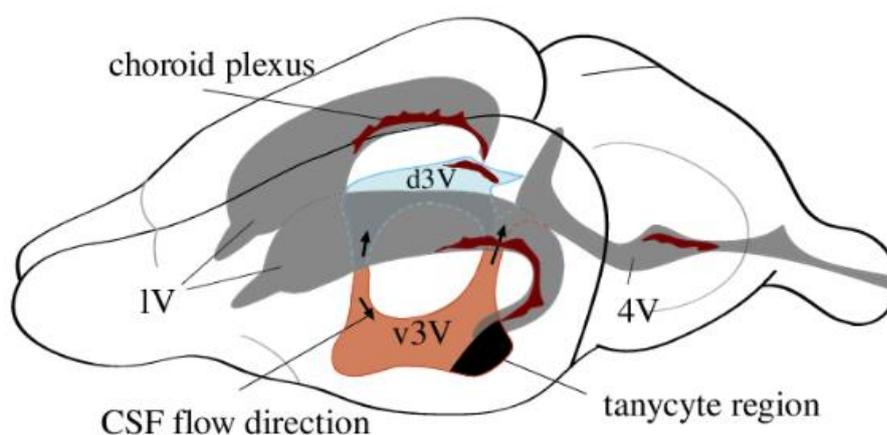
região através da ME e/ou do complexo ME-3V (Jiang *et al.*, 2020; Balland *et al.*, 2014). Além das populações neuronais dentro do ARC, astrócitos e tanícitos (Figura 8), células gliais especializadas localizadas na parte inferior da parede do 3V, também expressam uma ampla gama de receptores metabólicos. A ME tem sido considerada uma janela de acesso aos hormônios metabólicos, como a leptina, insulina e grelina, ao hipotálamo, e as células especializadas que se projetam da ME para a parede do 3V, permitem o acesso ao ARC através de fenestrações e expressão de receptores. (Jiang *et al.*, 2020; Porniece *et al.*, 2021; Spiezio *et al.*, 2018; Uriarte., 2021). O GHr é amplamente expresso no hipotálamo médio basal, uma região estratégica para uma resposta rápida ao cérebro sobre os níveis do GH circulante, condições metabólicas e controle da homeostase energética (Wasinski *et al.*, 2020; Furigo *et al.*, 2019a; Furigo *et al.*, 2019b). A transferência de GH entre neurônios pode ocorrer através de um transporte anterógrado dentro dos axônios, como demonstrado em uma linha neuronal de rato, onde o GH foi secretado das pontas dos axônios em vesículas sinápticas (Schweitzer & Kelly *et al.*, 1985). Sendo assim, existe a possibilidade de que o GH circulante possa se ligar em receptores localizados nas células especializadas da ME e ser transportado ao ARC e outros núcleos hipotalâmicos, sendo conduzido entre os neurônios para atuar em populações neuronais distintas. Por esse motivo, para estudar a passagem do GH para o SNC, avaliar se o GH pode estar presente no hipotálamo na presença e na ausência do GHr é de suma importância. Além disso, a ME é uma porta de entrada que dá acesso ao início do 3V (Figura 7), permitindo acesso ao LCR, um fluido que fornece nutrição e amortecimento para o cérebro e a medula espinhal e por onde o GH pode ser distribuído para as mais variadas regiões do encéfalo. O GHr é expresso em alta densidade no plexo coróide (CP), uma estrutura fina que reveste a maior parte dos ventrículos. O CP tem sido sugerido como tendo um papel na transcitose de GH mediado por receptores através do LCR para o parênquima cerebral (Nyberg., 2000). Existe a possibilidade de que o GH possa extravasar através dos vasos fenestrados da ME e de outros CVO's, estando disponível no LCR por difusão passiva, mas dependendo do GHr para se difundir no parênquima cerebral.

Figura 7 - Ilustração de um corte coronal do cérebro de rato, adaptado para destacar as regiões anatômicas da eminência mediana (ME) camada externa (MEE) e camada interna (MEI), núcleo arqueado do hipotálamo (Arc) lateral (ArcL), medial (ArcM) e dorsal (ArcD), terceiro ventrículo (3V) e plexo coróide (CP). Como o ARC possui uma BHE intacta, alguns fatores circulantes acessam essa região através da ME e/ou do complexo ME-3V. O 3V dá acesso ao LCR e conseqüentemente ao CP.



Fonte: The rat brain in stereotaxic coordinates by Paxinos & Watson., 2007 (Adaptado).

Figura 8 - Representação dos quatro ventrículos cheios de LCR no cérebro de camundongo. Destacadas em cores estão as partes dorsal (d3V, azul) e ventral (v3V, marrom claro) do terceiro ventrículo. Os dois ventrículos laterais alimentam-se através de um canal no plano médio localizado no 3V. No local da junção, o LCR flui dorsalmente (seta para cima) no d3V ou ventralmente (seta para baixo) no v3V. Em seu final, d3V e v3V se conectam através do aqueduto em 4V. A área sombreada em v3V consiste principalmente em tanicitos (células gliais especializadas que possuem fenestrações e também expressam uma ampla gama de receptores metabólicos). As características marrom-escuras representam o epitélio do plexo coróide (CP) que libera o LCR e secreta uma grande variedade de solutos pequenos e macromoleculares, além de ser uma região onde o GHR é expresso em alta densidade. Dorsal está no topo e anterior à esquerda.



Fonte: Eichele *et al.*, 2019.

2.4. Modelos animais usados no estudo

Para ajudar a descobrir as várias atividades do GH, camundongos knockout do receptor global de GH (GHR^{-/-}) que elimina a sinalização intracelular induzida pelo hormônio e, portanto, suas ações biológicas, foram gerados há mais de 20 anos e se tornaram uma ferramenta valiosa para ajudar a definir vários parâmetros da fisiologia do GH. Esse modelo de camundongo também é chamado de camundongo interrompido pelo gene da proteína de ligação GHR/GH (GHBP) (GHR/BP^{-/-}) porque o gene GHBP está embutido no gene GHR. Ao direcionar o exon 4 do gene GHR/BP,

as proteínas codificadas por GHr e GHBP são eliminadas (Zhou *et al.*, 1997). Os animais com essa mutação são anões, com níveis severamente deprimidos de IGF-I no soro e níveis elevados de GH, que são resultado da falta de sensibilidade ao GH devido à falta de GHr e menos feedback negativo do IGF-I na glândula pituitária (Zhou *et al.*, 1997, Venken *et al.*, 2007). Os camundongos GHr *-/-* são férteis, no entanto, às vezes a reprodução é um desafio. Apesar disso, esses camundongos têm maior longevidade, quando comparado aos camundongos Wild Type (WT) (Coschigano *et al.*, 2003). Camundongos GHr *-/-* são fortemente hipoinsulinêmicos, sensíveis à insulina e passam de hipoglicêmicos para normoglicêmicos com a idade (Panici *et al.*, 2009). Embora a massa magra seja proporcional ao tamanho corporal, as diferenças na composição corporal persistem em camundongos GHr *-/-* em grande parte devido às mudanças na abundância de tecido adiposo. O acúmulo de tecido adiposo em excesso, como visto em camundongos GHr *-/-*, geralmente resulta de um desequilíbrio energético positivo no qual a ingestão de energia excede o gasto de energia. Camundongos GHr *-/-* consomem menos energia total, o que seria esperado devido ao seu tamanho de anão (Berryman *et al.*, 2006). No entanto, apesar de algumas exceções, muitos estudos mostram que camundongos GHr *-/-* consomem significativamente mais energia quando os valores são normalizados para a massa corporal (Berryman *et al.*, 2006, Egeciouglu., 2006, Longo *et al.*, 2010)

Estudos sobre os efeitos do GH no crescimento e desenvolvimento do cérebro, ao avaliar os pesos dos tecidos de vários órgãos de camundongos GHr *-/-* de 3 meses de idade, mostraram que o cérebro é um dos poucos órgãos que aumenta de tamanho em relação a outros órgãos em animais GHr *-/-*. Em proporção ao peso corporal total, a massa cerebral em camundongos GHr *-/-* é 151,5% do WT, embora os pesos absolutos do cérebro em camundongos GHr *-/-* sejam diminuídos (Sjogren *et al.*, 2000). Assim, como no cérebro total, o tamanho da hipófise em camundongos GHr *-/-* é relativamente maior em massa quando normalizado para o peso corporal. Isso acontece, porque a produção de GH na hipófise está sujeita a um sistema de feedback complexo que inclui loops de feedback ultracurtos, curtos e longos, todos pensados para depender da sinalização GHr intacta (Wong *et al.*, 2006). A interrupção dessas alças de feedback em camundongos GHr *-/-* resulta em um aumento de 30 vezes no GH sérico. Em resumo, os loops de feedback negativo em camundongos GHr *-/-* são interrompidos devido a uma completa ausência de sinalização de GHr, na qual os mecanismos reguladores dependem para detectar a quantidade apropriada

de GH a ser produzida. As pituitárias de camundongos GHR^{-/-} produzem altos níveis de GH em uma tentativa fútil de satisfazer os ciclos de feedback negativo que foram perturbados (Zhou *et al.*, 1997).

Para discernir as ações diretas do GH em tecidos específicos, vários camundongos GHRKO tecido específico foram desenvolvidos na última década através do sistema Cre-loxP, uma ferramenta muito poderosa para a edição de genes de mamíferos. A Cre (Cre recombinase) é uma das recombinases específicas do sítio da tirosina (T-SSRs), incluindo a flipase (Flp) e a recombinase específica D6 (Dre) (Nagy., 2000, Meinke *et al.*, 2016). Foi descoberto como uma recombinase de DNA de 38 kDa produzida a partir do gene Cre (recombinase de ciclização) do bacteriófago P1 (Sternber *et al.*, 1978, Sauer., 1998). Ele reconhece as sequências específicas de fragmentos de DNA chamadas de sítio loxP (locus of x-over, P1) e medeia a deleção específica de sítio de sequências de DNA entre dois sítios loxP (O'Neil *et al.*, 1990, Sauer & Henderson., 1988). O sítio loxP é uma sequência de 34 pb consistindo em duas repetições invertidas e palindrômicas de 13 pb e sequências de núcleo de 8 pb. No que diz respeito ao mecanismo do sistema Cre-loxP, uma única Cre recombinase reconhece dois sítios loxP repetidos diretamente, então o Cre extirpa o DNA flanqueado (floxed) do loxP, criando assim dois tipos de DNA com o gene Y circular, excisado e inativado. Enquanto o sistema Cre-loxP é predominantemente usado na excisão genética, ele também induz a inversão e translocação de DNA entre dois sítios loxP dependendo da orientação e localização dos sítios loxP (Nagy., 2000, Meinke *et al.*, 2016, Branda and Dymecki., 2004).

Para gerar camundongos GHRKO tecido específico, camundongos floxed GHR são cruzados com camundongos transgênicos contendo um gene de Cre precedido por um promotor/potenciador para conduzir a expressão em tecidos selecionados. Quando uma linha de camundongos Cre de tecido específico e uma linha de camundongo com GHR floxed, são cruzadas com sucesso para gerar uma linha de camundongo que é tanto floxed homozigótica quanto Cre positiva, a recombinação do GHR floxed ocorre, resultando em um camundongo knockout de tecido específico para o GHR. Muitas linhagens destes animais foram geradas: fígado, músculo, gordura, osso, coração, intestino, macrófago, células b pancreáticas, células-tronco hematopoiéticas, cérebro e multi-tecido "global". A interrupção do GHR Global com início na fase adulta, faz com que camundongos aGHRKO (que possuem presença do gene responsável pela expressão da proteína fusão Cre-ERT2, incluindo

a sequência do promotor da albumina) compartilhem muitas mudanças fenotípicas com os camundongos knockouts globais originais GHR $-/-$ (Junnila *et al.*, 2016). Ou seja, os camundongos aGHRKO têm comprimento e peso corporal reduzidos com aumento da adiposidade, especificamente no tecido adiposo subcutâneo, tolerância diminuída à glicose e sensibilidade à insulina melhorada. Além disso, os camundongos aGHRKO apresentam maior expectativa de vida em comparação com os controles, embora esse achado tenha sido exclusivo das fêmeas. Esses achados mostram que a interrupção do GHR na idade adulta pode recapitular os achados metabólicos e de longevidade benéficos. Os efeitos da interrupção de GHR no fígado resultam em múltiplas alterações no Eixo GH/IGF-I. Apesar das reduções dramáticas no IGF-I circulante, o GH elevado resultou em expressão local elevada de mRNA de IGF-I no músculo esquelético e tecido adiposo (List *et al.*, 2014).

Pretendemos avaliar no nosso estudo, se o GH exógeno depende do seu receptor, para entrar no SNC de camundongos. Ainda não há uma definição sobre as regiões envolvidas nessa passagem, sendo assim, é preferível que seja utilizado um animal que possua a interrupção do GHR Global. Decidimos testar se os animais que possuem as alterações genéticas do gene do GHR floxed por um par de sítios loxP no exon 4 e a presença do gene responsável pela expressão da proteína fusão Cre-ERT2, incluindo a sequência do promotor da ubiquitina humana C (Ubi-GHRKO), seria um modelo adequado para esse estudo. Para que ocorra deleção do GHR no animal, é necessário que seja realizada aplicações de tamoxifeno (TMX), um modulador seletivo do receptor de estrógeno que é oxidado no fígado e dá origem a metabólitos bioativos que liberam o Cre ERT2 para recombinação de alelos floxed no núcleo da célula. (Feil *et al.*, 1997; Indra *et al.*, 1999). Após aplicação de TMX, a taxa de expressão de GHR em camundongos aGHRKO diminui drasticamente, variando de acordo com o tecido. O fígado é o órgão com a maior taxa de deleção (99%), enquanto tecidos como o músculo esquelético e cardíaco possuem uma taxa de deleção de aproximadamente 38% e 60%, respectivamente (Junnila *et al.*, 2016). A absorção e depuração de tamoxifeno e seus metabólitos bioativos no cérebro é rápida. A recombinação máxima pode ser alcançada em diferentes regiões do cérebro no caso de deleção em receptores específicos do SNC (Jahn *et al.*, 2018). O TMX é injetado intraperitonealmente no animal e se difunde através da circulação sistêmica, alcançando gradualmente os sistemas periféricos e o SNC. Com o objetivo de avaliar a taxa de deleção do GHR no cérebro de animais Ubi-GHRKO, realizamos injeções de

TMX nesses animais e em controles, medimos a composição corporal antes e depois das aplicações e medimos os níveis séricos de IGF-1 e presença de IGF-1 e mRNA do GHr no fígado e hipotálamo.

3. OBJETIVO

O objetivo principal desse trabalho é avaliar a participação do receptor do hormônio do crescimento no transporte de GH da circulação sistêmica para o SNC, atravessando a barreira hematoencefálica.

3.1. Objetivos específicos

1. Definição do modelo de camundongo knockout que será utilizado.
2. Padronização da radiomarcagem do hormônio do crescimento porcino (pGH).
3. Caracterização físico-química do pGH antes e depois de reagir com a cloramina T.
4. Detecção da presença do radiomarcado no cérebro total e hipotálamo dos animais knockout e controle.

4. MATERIAIS

4.1. Infraestrutura

Este trabalho foi realizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-USP), nos laboratórios do Centro de Biotecnologia (CEBIO), onde foi realizado o estudo de caracterização do hormônio do crescimento porcino (pGH) e ensaios imunoenzimáticos. Tivemos a colaboração do grupo de pesquisa e dos laboratórios do Centro de Radiofarmácia (CECRF), onde foram realizados os testes de radiomarcagem e estudos de biodistribuição e imagem do radiofármaco. Também houve colaboração do Laboratório de Neuroanatomia Funcional do

Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas I (ICB I), onde foram produzidos os animais knockout e realizados os testes com camundongos Cre-loxP. Esses laboratórios forneceram toda a infraestrutura necessária para a manipulação das biomoléculas, materiais radioativos e animais usados no estudo.

4.2. Equipamentos e acessórios principais

- ✓ 2470 WIZARD2 Automatic Gamma Counters – PerkinElmer
- ✓ Agulha 24G Hipodérmica - MEDIX
- ✓ MicroPET/SPECT/CT – ALBIRA ARS ONCONVISION 2010
- ✓ Contador Gama, tipo poço, CRCTM-35R, CAPINTEC, INC.
- ✓ Balança analítica, modelo H20T – METTLER (Zurique, Suíça);
- ✓ Balança analítica, modelo P1000N – METTLER (Zurique, Suíça);
- ✓ Destilador de água, modelo 016, FABBE-PRIMAR (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Dosímetro termoluminescente - METROBRAS
- ✓ Centrífuga refrigerada, modelo 22R- BECKMAN COULTER (Brea, CA, EUA);
- ✓ Espectrofotômetro Nanodrop – THERMO SCIENTIFIC
- ✓ Espectrofotometro Epoch – BIOTEK EPOCH
- ✓ Castelos de chumbo, IPEN-CNEN/SP
- ✓ Freezer -80° C, modelo 8425 – FORMA SCIENTIFIC (Marietta, OH, EUA);
- ✓ Coluna cromatográfica para HPLC de exclusão molecular (HPSEC) – TSKgel G2000SW, 10µm, 125Å sílica, 7.5mmID x 60cm
- ✓ HPLC marca Shimatzu Modelo Prominence.
- ✓ ITLC-SG CHROMATOGRAPHY PAPER, 50/PK
- ✓ Leitor de placas de microtitulação modelo MR 400 DYNATECH, (Bethesda, EUA);
- ✓ Minispec, mq 10 - BRUKER
- ✓ Amicon Milipore Filter (3 kDa) - ULTRACEL
- ✓ Papel cromatográfico - WHATMAN
- ✓ Micropipetas - HTL
- ✓ Placas de microtitulação com fundo em “U” - DYNATECH (Chantilly, EUA);

- ✓ Homogeneizador - POLYTRON
- ✓ Seringas descartáveis de 1 mL
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q plus – MILLIPORE (Bedford, MA, EUA);
- ✓ Termociclador da Applied Biosystem modelo 7500
- ✓ Vidraria em geral, tais como béqueres e cubas cromatográficas.
- ✓ Vórtex, modelo *vortex mixer*, FISHER SCIENTIFIC (Pittsburgh, PA, EUA).

4.3. Reagentes e Soluções

4.3.1. Desativação gênica dos camundongos Cre-loxP

- ✓ Tamoxifeno (0,09 g/1,8 mL)
- ✓ Óleo de gergelim

4.3.2. Extração e quantificação de RNA total

- ✓ Trizol (1 mL para cada 50 - 100 mg de tecido)
- ✓ H₂O DPEC
- ✓ Clorofórmio (0,2 mL)
- ✓ Isopropanol (0,5 mL)
- ✓ Álcool 75%

4.3.3. Real-time PCR

- ✓ RNA (2 µg)
- ✓ DNase I, RNase-free (Roche CAT#776785)
- ✓ 25 nM MgCl₂ (Roche CAT#1 699 113)
- ✓ 10X PCR buffer (Invitrogen CAT#18067-017)
- ✓ Superscript II RNase (GIBCO CAT#18064-022)
- ✓ dNTP mix (10 mM mix, 2,5 mM)

- ✓ Random Hexamers, pdN6 (Roche CAT#1 054 731)
- ✓ ABI SYBR master mix (CAT#4312704)

4.3.4. Radiomarcação

- ✓ Hormônio de crescimento extraído da hipófise de porcos (pGH) fornecido pelo Dr. A. F. Parlow do National Hormone and Pituitary Program (NHPP, Torrance, CA, EUA)
- ✓ Na¹²³I e Na¹³¹I (produzidos nos ciclotrons do Centro de Radiofarmácia (CECRF))
- ✓ Chloramine-T hydrate 95%, Aldrich.
- ✓ Tampão fosfato salina (PBS 1X, pH 7,4)
- ✓ Na₂S₂O₅ PM=190,10
- ✓ pH Test Strips P-4536 Lot 010B164536, ST. Louis, U.S.A
- ✓ 85% metanol/água deionizada
- ✓ Albumina do soro bovino
- ✓ Soro fetal bovino (500ul)

4.3.5. SDS-Page 15%

- ✓ H₂O 3.4 mL
- ✓ Acrylamida mix 7.5 mL
- ✓ 1,5 M Tris (pH8.8) 3.8 mL
- ✓ 10% SDS 0.15ml
- ✓ 10% persulfato de amônio 0.15 mL
- ✓ TEMED 0.006 mL
- ✓ H₂O 2.1mL
- ✓ 30% acrylamida mix 0.5 mL
- ✓ 1,5M Tris (pH 6.8) 0.38 mL
- ✓ 10% SDS 0.03 mL

- ✓ 10% ammonium persulfate 0.03 mL
- ✓ TEMED 0.003 mL
- ✓ Washing solution (60 mL etanol (95%))
- ✓ Água destilada
- ✓ Solução de nitrato de prata (0,3 g nitrato de prata + 300 mL água destilada)
- ✓ Solução de revelação 10 min (12 g carbonato de sódio + 200 mL água destilada + 0,15 mL formaldeído (37%) + 200 mL água destilada)
- ✓ Solução de parada 10 min (3 mL ácido acético + 297 mL água destilada) / Água destilada 3 x 3 min

4.3.6. High performance size-exclusion chromatography (HPSEC)

- ✓ Coluna: Marca Tosoh Bioscience- TSK -gel- tipo G 2000 SW;
- ✓ Tampão Bicarbonato de Amônio 0,025 M pH 7,0

4.4. Animais utilizados

Utilizamos neste estudo, dois modelos de camundongos:

- 1) Camundongos geneticamente modificados da linhagem C57BL/6 com duas alterações genéticas principais: a) gene do receptor do hormônio de crescimento (GHR) flanqueado por um par de sítios loxP no exon 4 (camundongo $GHR^{lox/lox}$); e b) presença do gene responsável pela expressão da proteína fusão Cre-ERT2, incluindo a sequência do promotor da ubiquitina humana C (camundongo Ubi-Cre^{ERT}). A indução dos camundongos knockout global (Ubi-GHRKO) foi realizada por ablação genética do GHR após atingir a fase adulta, com injeções de tamoxifeno (TMX), droga que ativa o promotor da Cre, minimizando assim as adaptações que o animal poderia sofrer ao longo do tempo, no caso de uma inativação precoce do GHR. Como animais controle, utilizamos camundongos portadores apenas do alelo Ubi-Cre^{ERT}. Esse modelo animal foi desenvolvido pelo Prof. José Donato Junior, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e colaborador neste trabalho.

- 2) Camundongos knockout do receptor global de GH (Ghr ^{-/-}) da linhagem C57BL/6J, também chamado de camundongo interrompido pelo gene da proteína de ligação Ghr/GH (GHBP) (GHR/BP ^{-/-}) porque o gene GHBP está embutido no gene GHR. Ao direcionar o exon 4 do gene GHR/BP, as proteínas codificadas por Ghr e GHBP são eliminadas (Zhou *et al.*, 1997). Os animais foram doados por John Kopchick (Ohio University). Como animais de controle, foram utilizados camundongos (C57BL / 6J).

Os animais foram produzidos e mantidos em condições de luz (ciclo claro / escuro de 12 h) e temperatura (22 ± 1 °C). Receberam uma dieta regular de ração para roedores (2,99 kcal / g; 9,4% de calorias provenientes de gordura). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelos Comitês de Ética em Uso de Animais (CEUA) dos respectivos Institutos: CEUA do Instituto de Ciências Biomédicas na Universidade de São Paulo (protocolo número 73/2017) e CEUA do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (protocolo número 252/2019).

5. MÉTODOS

5.1. Indução dos camundongos knockout para o GHR

A ablação do gene do Ghr foi induzida quando os camundongos atingiram 10 semanas de idade. Os animais foram previamente submetidos ao equipamento Minispec para avaliar a composição corporal e receberam cinco injeções pela via intraperitoneal de tamoxifeno (TMX) (0,15 mg/g de peso corpóreo, Sigma-Aldrich), diluídas em óleo de gergelim no volume de 1,8 mL (Sigma-Aldrich), em dias alternados. Utilizamos somente fêmeas. Entre os animais gerados para sofrerem knockout do receptor, cinco receberam tamoxifeno e quatro receberam apenas óleo. Os quatro animais controle Ubi-Cre^{ERT} também receberam doses de tamoxifeno. Após a última aplicação, aguardamos quatro semanas até a estabilização do novo peso corporal e em seguida medimos a composição corporal semanalmente durante um

mês. Após esse período os animais foram eutanasiados, amostras de sangue e dos tecidos do fígado e hipotálamo foram coletadas.

5.2. Confirmação da ablação do GHR

5.2.1. Extração de RNA total

O fígado e o hipotálamo dos camundongos foram utilizados para a extração de RNA. Os tecidos foram triturados e o RNA total extraído com Trizol (Invitrogene) de acordo com as instruções do fabricante. Em suma, os tecidos foram solubilizados em trizol (1 mL/100 mg de tecido) com o uso de um homogeneizador elétrico, vinte agitações de trinta segundos cada e o homogeneizado foi centrifugado a 12.000 x rpm por quinze minutos a 4°C. Ao sobrenadante, foi adicionado clorofórmio (200 µL/100 mg tecido), misturado por inversão por quinze segundos e incubado a temperatura ambiente por três minutos. A mistura foi então centrifugada a 13.000 rpm por vinte minutos a 4°C. Recuperou-se a fase aquosa na qual se adicionou isopropanol (500 µL/100 mg tecido) para a precipitação do RNA. Centrifugou-se a 13.000 rpm por quinze minutos e o precipitado foi lavado com etanol 75% (1 mL/100 mg tecido) e centrifugado a 7500 rpm por cinco minutos. O RNA foi ressuscitado em 60 µL de água deionizada, previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Alíquotas dos RNAs foram dosadas por espectrofotometria.

5.2.2. Tratamento com Dnase I

Amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Ambion). As amostras foram diluídas para uma concentração de 10µg/50µL, adicionou-se 0,1 volumes de tampão da DNase 10X e 0,5 µL da enzima. Após trinta minutos de incubação a 37°C adicionou-se mais 0,5 µL da DNase I e, novamente, incubou-se por trinta minutos a 37 °C. Ao término da incubação, foram adicionados 0,1 volumes de reagente inativador de DNase e manteve-se a reação por dois minutos a temperatura ambiente.

As amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM por dois minutos a temperatura ambiente, recolheu-se o sobrenadante e o RNA foi novamente quantificado.

5.2.3. Transcriptase reversa

A síntese do cDNA fita simples foi realizada utilizando o kit SuperScript II RTTM (Gibco). Para tal reação foram utilizados 1-5 µg de RNA total, 1 µl de oligo dT (0,5 µg/µL) e água DEPC, incubados a 70°C por dez minutos. Após a incubação foi preparada uma nova mistura de reação constituída de 2 µL de PCR buffer 10X, 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTP mix 10 mM e 2 µL de DTT 0,1 M totalizando um volume de 7 µL. Esses 7 µL da mistura de reação foram adicionados em cada mistura RNA/primer e incubadas por cinco minutos a 42°C. Posteriormente, foi adicionado 1 µL (200u) da enzima de transcrição reversa SuperScript II RT em cada tubo e incubou-se a 42° por cinquenta minutos. Uma reação controle foi preparada contendo todos os reagentes, exceto a enzima SuperScript II RT para certificar de que o molde da amplificação foi RNA e não DNA. As reações foram interrompidas colocando-se as amostras a 70°C por quinze minutos. Foi adicionado 1 µL de RNase H em cada amostra e incubado a 37°C por vinte minutos para que fosse eliminado todo o RNA da amostra e permanecendo só o cDNA

5.2.4. Reação de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram corridas em termociclador usando o corante fluorescente SYBR Green I. As reações foram realizadas em volume final de 20 µl em que se adicionou 2,5 µL de RNA, 10,0 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), 2,4 µL de primer mix e 5,1 µL de DEPC-H₂O. Foram realizados 40 ciclos, consistindo de desnaturação a 95°C por quinze segundos, anelamento dos iniciadores por trinta segundos e extensão a 72°C por trinta segundos. A fluorescência foi medida em cada ciclo. Após o último ciclo, a especificidade da PCR foi checada pela análise da curva de “melting” para todas as amostras. Em todas as corridas,

foram utilizados controles negativos com amostras em que não foi adicionada a transcriptase reversa.

5.2.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para detectar e quantificar os níveis de IGF-I no soro, fígado e hipotálamo, utilizou-se a técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Os reagentes foram preparados seguindo o protocolo do fabricante. Em cada poço da microplaca foi adicionado 50 µL de Diluente Calibrador RDS-38. Foi adicionado 50 µL de padrão, controle ou amostra por poço. Coberto com a fita adesiva fornecida e incubada por duas horas à temperatura ambiente em um agitador de microplacas orbital horizontal (órbita 0,12°), ajustado em 500 +/- 50 rpm. Cada poço foi aspirado e lavado, repetindo-se o processo quatro vezes para um total de cinco lavagens. A placa foi invertida e seca com toalhas de papel. Em seguida foi adicionado 100 µL de IGF-I conjugado de Camundongo/Rato a cada poço. Seguida por incubação por duas horas em temperatura ambiente, no agitador, aspiração e lavagem. Foi adicionado 100 µL de Solução Substrato e 100 µL de Stop Solution em cada poço. A densidade óptica de cada poço foi medida após trinta minutos, no comprimento de ondas de 450 nm.

5.3. Radiomarcção

5.3.1. Padronização do protocolo de radiomarcção

O hormônio de crescimento extraído da hipófise de porcos (pGH), foi marcado com ^{123}I para estudo de imagem e biodistribuição e o ^{131}I para estudo do transporte de pGH para o cérebro em diferentes tempos de exposição. Utilizamos 5, 10 e 50 µg de pGH em 50 µL de tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4) e 37, 74 e 111 MBq de Na^{123}I ou Na^{131}I . Para iniciar o processo de oxidação, foram adicionados 50 e 100 µg de CLT e avaliados tempos de incubação, com agitação por até 45 min. Para finalizar a reação, foram adicionados 100 e 200 µg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. O pGH radioativamente iodado foi purificado através de centrifugação com colunas de

filtração com poros de 3 kDa (Amicon). O mesmo protocolo de marcação foi aplicado para a albumina bovina com ^{123}I . Foram utilizados 5 mg albumina, 37 MBq de Na^{123}I , 200 μg de CLT incubados sob agitação por 45 min e para finalizar a reação foram adicionados 400 μg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$.

5.3.2. Controle de qualidade iTLC

A pureza radioquímica do produto marcado foi avaliada pela técnica de cromatografia em papel ascendente, utilizando como suporte fitas iTLC Aluminium Sheets e como fase móvel metanol (85%). Após o desenvolvimento cromatográfico, a radioatividade foi medida através da tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT). Nestas condições, o fator de retenção (R_f) do produto marcado foi considerado 0 e o do iodo livre 1,0.

5.3.3. Estudo de estabilidade do produto marcado (*in vitro*)

O estudo foi realizado após a otimização das condições de marcação do ^{123}I -pGH. Quatro amostras foram diluídas em 500 μl de soro fetal bovino e nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 13 horas após a marcação, procedeu-se a análise da pureza radioquímica para avaliar a estabilidade do produto. Utilizou-se 15 μL de cada amostra e a pureza radioquímica da marcação foi avaliada por meio de cromatografia ascendente. Nesse caso, a fita foi cortada ao meio e a atividade de cada uma das partes foi medida através de um contador gama.

5.4. Impactos da cloramina T no pGH

Para avaliar a formação de agregados e/ou formas diméricas provocados pela reação de oxidação da CLT no pGH, preparamos soluções contendo 50 μg de pGH e 50 μg ou 100 μg de CLT, com tempos de reação de 5 e 45 min. Em seguida, foram realizadas eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com gel de separação a 15% de poliacrilamida e gel de empilhamento a 3%. Também realizamos a cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular

(HPSEC), monitorando-se a absorvância no comprimento de onda de 220 nm. A fase móvel utilizada foi bicarbonato de amônio 0,025 M, pH 7,0, com fluxo de 1 ml/min. Foram aplicados 10 µg de pGH e 10 µg de hormônio de crescimento humano recombinante (r-hGH).

5.5. Ensaio de biodistribuição e autoradiografia

Uma injeção via caudal de solução salina (100µL) contendo ¹²³I-pGH com atividade de 3,6 MBq (4,9 µg do hormônio) foi injetada em quatro camundongos C57BL/6J machos, anestesiados com isoflurano 2,53%. O tempo de espera até a eutanásia foi de 2,5 min para um camundongo e de 10 minutos para os outros três animais. O sangue foi coletado pelo plexo orbital (75µL) e os órgãos dissecados (fígado, coração, pulmões, músculo (gastrocnêmio), osso (tíbia), estômago, intestinos, pâncreas, rins, bexiga, tireoide e cérebro) foram pesados e a atividade radioativa foi medida no contador gama.

Com base na atividade injetada e na atividade detectada no tecido, foi calculada a porcentagem de dose injetada por grama de tecido (%ID/g). A razão entre tecido/sangue foi dada pela divisão da atividade (%id/g) do tecido pela atividade (%id/g) do sangue.

Os cortes encefálicos utilizando micrótomo de congelamento foram expostos ao filme radiográfico por 12 horas seguido de revelação do filme.

5.6. Ensaio de biodistribuição em animais knockout global (GHR^{-/-})

Uma injeção intraperitoneal de solução salina (100 µL) contendo ¹²³I-pGH com atividade de 3,6 MBq foi aplicada em dois camundongos knockout global (GHR^{-/-}) e três animais controle C57BL/6J machos. No tempo de 45 minutos após a injeção, os animais foram eutanasiados, o sangue foi coletado pela artéria aorta (75 µL) e os órgãos foram dissecados, pesados e a atividade radioativa foi medida através do contador gama.

5.7. Estudo do transporte de ^{131}I -pGH e ^{123}I -albumina para o cérebro em diferentes tempos de exposição

Duas injeções intraperitoneais seguidas de solução salina (100 μL) contendo ^{131}I -pGH e ^{123}I -albumina com atividade de 3,6 MBq foram injetadas em cinco camundongos C57BL/6J machos. O tempo transcorrido até a eutanásia variou entre 2 e 45 min. O sangue foi coletado pela artéria aorta (75 μL). O fígado e o cérebro foram pesados e a atividade radioativa foi medida através do contador gama.

A leitura da atividade do radioisótopo de cada amostra foi realizada em um contador gama logo após o experimento e seis dias depois, tempo necessário para o decaimento completo do ^{123}I , que possui meia vida de 13,3 horas, bem menor que a do ^{131}I , com meia vida de 8,02 dias. Os cálculos de decaimento foram realizados e através da atividade inicial do ^{131}I -pGH foi obtido a atividade inicial da ^{123}I -albumina.

5.8. Estudo do transporte de diferentes doses de ^{131}I -pGH para o cérebro em diferentes tempos de exposição

Para comparar a cinética da permeação de diferentes doses do hormônio marcado, outro experimento foi realizado, dessa vez injetando apenas ^{131}I -pGH com atividade de 0,12 MBq (1 milhão de contagem por minuto - CPM) ou seja, 0,16 μg do hormônio em cada um dos camundongos C57BL/6J machos. O tempo de espera até a eutanásia variou entre 2 e 45 min. O sangue foi coletado através da artéria aorta (75 μL) e o fígado, hipotálamo e cérebro (sem o hipotálamo) foram pesados e a atividade radioativa foi medida através do contador gama. Tanto o peso quando a atividade radioativa do hipotálamo e do cérebro sem o hipotálamo foram somados, gerando os dados do cérebro total. Os dados obtidos foram comparados com os resultados anteriores.

5.9. Estudo do transporte de ^{131}I -pGH para o cérebro de animais GHr -/- e controles em diferentes tempos de exposição

Injeções intraperitoneais de solução salina (100 μL) contendo ^{131}I -pGH com atividade de 0,24 MBq foram aplicadas em cada animal controle (9 animais) e 0,12 MBq nos animais knockout (9 animais). Foi realizada a eutanásia em diferentes tempos variando entre 2 e 45 min. O sangue foi coletado pela artéria aorta (75 μL). O fígado, o hipotálamo e o cérebro (sem o hipotálamo) foram pesados e a atividade radioativa foi medida através do contador gama.

5.10. Tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT-CT)

Uma injeção via caudal de solução salina contendo ^{123}I -pGH com atividade de 20 MBq foi injetada em um camundongo C57BL/6J fêmea, anestesiada com isoflurano 1%. No tempo de 45 minutos após a injeção, o animal foi colocado na câmara de escaneamento e analisado no microPET (Albira). A imagem foi obtida após 2 horas. Outro estudo foi realizado com injeção via intraperitoneal de solução salina contendo ^{123}I -pGH com atividade de 20 MBq injetada em um camundongo C57BL/6J macho. No tempo de 45 minutos após a injeção o animal foi colocado em um recipiente e recebeu uma dose letal de isoflurano 1% através da inalação. Em seguida o animal foi colocado na câmara de escaneamento e analisado.

A média e o desvio-padrão dos experimentos foram analisados utilizando ANOVA para comparação entre grupos e os gráficos foram construídos usando o software GraphPad Prism versão 5.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação dos modelos animais Cre-loxP

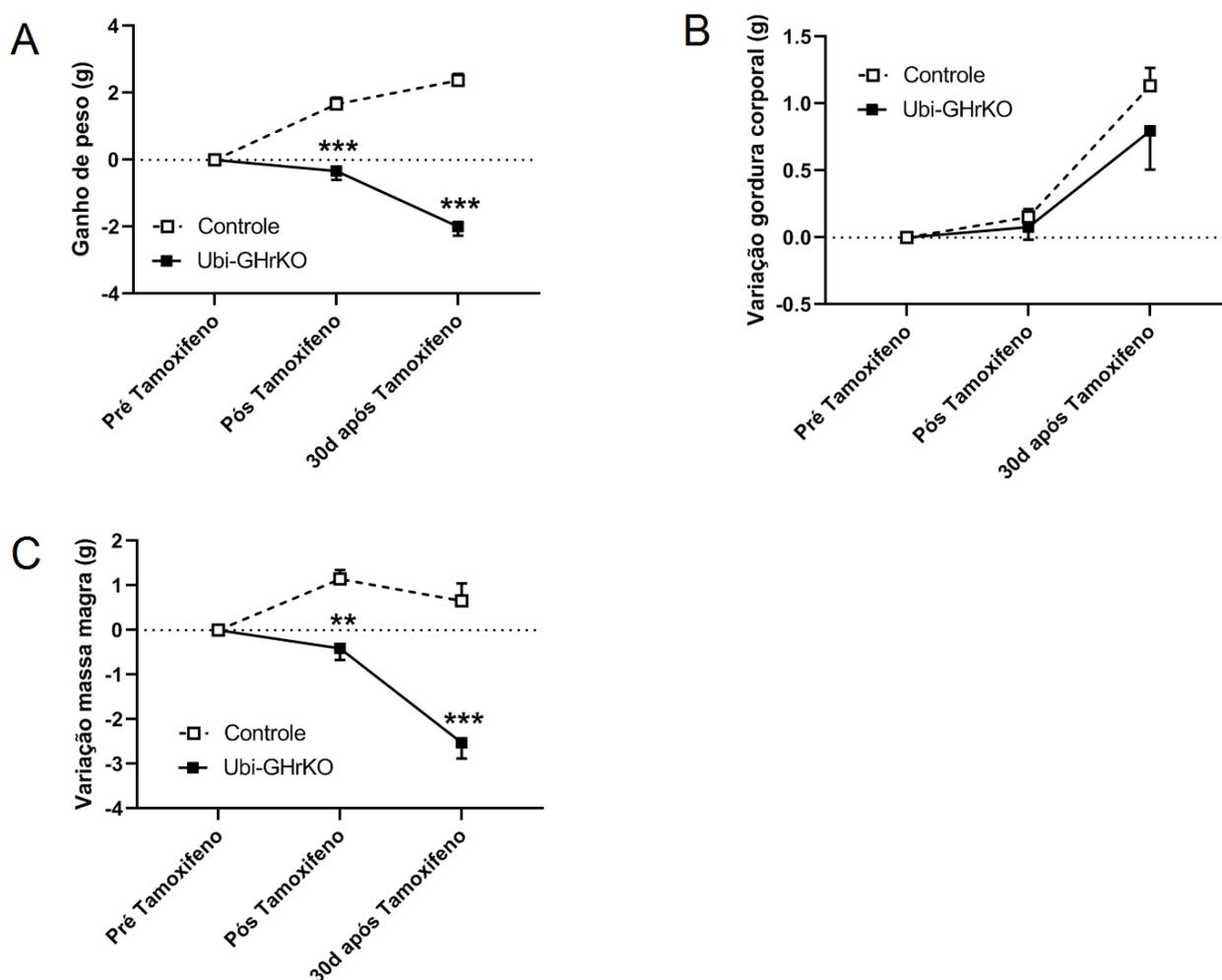
Para avaliar como a interrupção da ação do GH em camundongos adultos altera o peso e a composição corporal, medimos esses parâmetros um dia antes do tratamento com TMX, no dia seguinte à última aplicação do TMX e 30 dias depois. Os resultados mostraram que após a aplicação de TMX, os camundongos Ubi-Cre^{ERT} (Controle) ganharam peso, enquanto os camundongos knockout (Ubi-GHrKO) perderam peso ao longo do tempo (Figura 9A), essa diferença foi estatisticamente significativa, com $P = 0,0001$. A diminuição da ação do GH em camundongos knockout não alterou a variação da gordura corporal, comparado aos controles (Figura 9B), mas a variação da massa magra foi significativamente menor nos animais knockout, com $P = 0,0001$ (Figura 9C).

A eficácia da ablação gênica do receptor de GH induzida por TMX foi avaliada através da expressão do gene GHr usando RT-qPCR nos tecidos do fígado e hipotálamo. Através dos resultados apresentados na Figura 10, é possível observar que os camundongos portadores do sistema completo Cre-loxP que receberam apenas óleo de gergelim (Ubi-GHr), apresentaram níveis menores na expressão do receptor em ambos os tecidos, comparando-se aos camundongos portadores apenas do alelo Ubi-Cre^{ERT} que receberam tamoxifeno (Controle). No fígado, os camundongos portadores do sistema completo Cre-LoxP que receberam tamoxifeno (Ubi-GHrKO) apresentaram uma expressão significativamente menor do GHr comparado ao Ubi-GHr e Controle, com $P = 0,0216$ e $P = 0,0026$ respectivamente. No hipotálamo, apesar de ser observada através do gráfico (Figura 10B) uma redução na expressão dos animais transgênicos que receberam apenas óleo, comparado aos controles, essa diferença não foi significativa. Também não foi observada diferença na expressão de GHr no hipotálamo dos animais knockout em comparação com os animais transgênicos que receberam óleo, embora em comparação com os animais Ubi-Cre^{ERT}, os animais Ubi-GHrKO tenham apresentado uma diminuição significativa da expressão, com $P = 0,0433$.

Os níveis de IGF-1 no soro dos animais Ubi-GHr comparado aos Ubi-Cre^{ERT}, foram significativamente menores, com $P = 0,0403$. Também foi observada diferença significativa nos animais knockout comparado aos Ubi-Cre^{ERT}, com $P =$

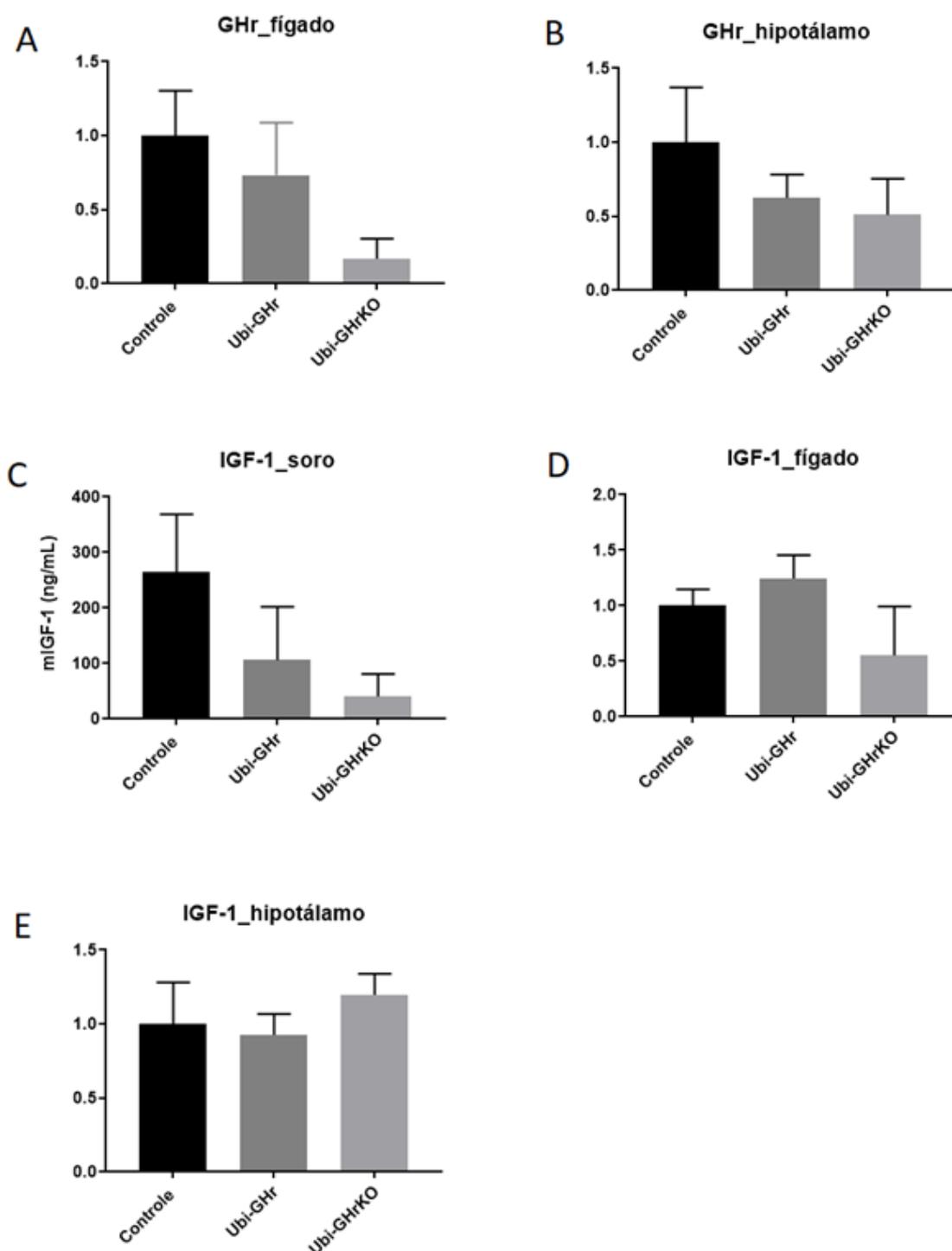
0,0054. No fígado, os níveis de IGF-1 foram significativamente menores nos animais knockout, comparado aos Ubi-Cre^{ERT}, com $P = 0,0108$. No hipotálamo, os níveis de IGF-1 foram semelhantes em todos os grupos.

Figura 9 - Efeitos causados pela aplicação de tamoxifeno na composição corporal de animais portadores apenas do alelo Ubi-Cre^{ERT} (Controle) e animais portadores do sistema completo Cre-loxP (Ubi-GHrKO), obtido através do Minispec antes da aplicação, um dia depois da última aplicação e 30 dias após a última aplicação do Tamoxifeno. Ganho de peso (A), variação de gordura corporal (B) e variação de massa magra (C).



Fonte: autor da dissertação

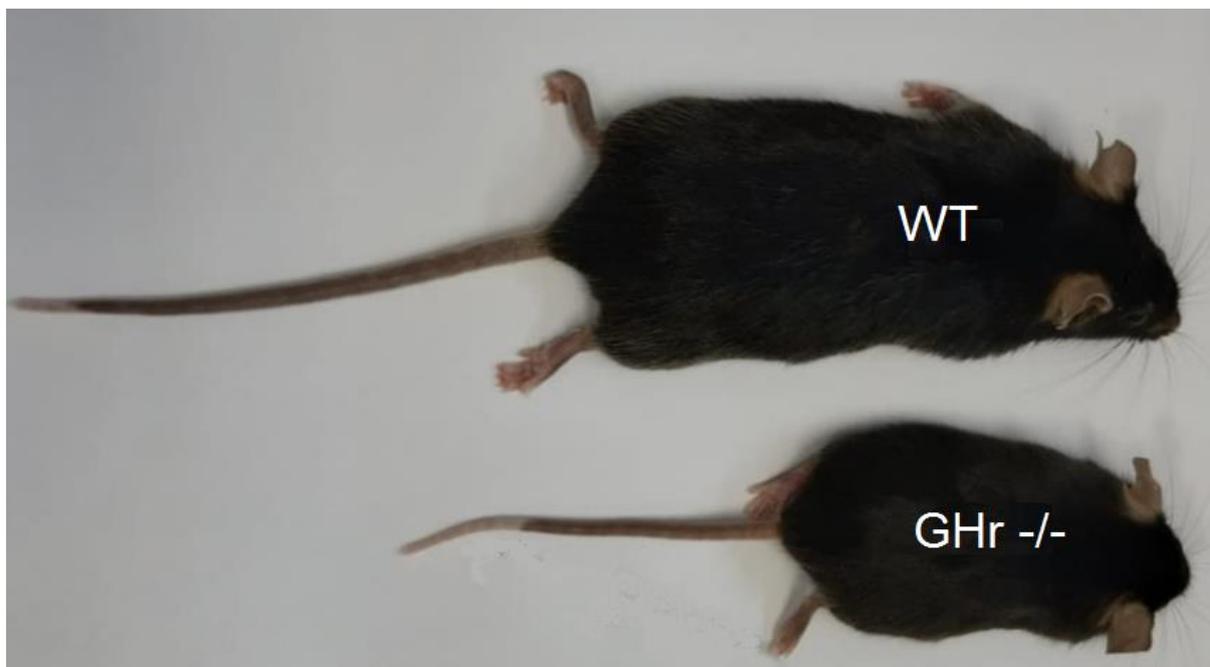
Figura 10 – Unidades relativas da expressão de GHr no fígado (A) e hipotálamo (B) de animais Ubi-Cre^{ERT} que receberam tamoxifeno (Controle), animais Cre-loxP que receberam apenas óleo (Ubi-GHr) e animais Cre-loxP tratados com tamoxifeno (Ubi-GHrKO). Concentração de IGF-1 no soro (C), no fígado (D) e hipotálamo (E) desses animais.



Fonte: autor da dissertação

Com base nesses resultados, concluímos que o modelo animal Ubi-GHrKO, com interrupção do receptor na fase adulta, não seria adequado para o nosso estudo, pois não observamos uma boa deleção do receptor na região do cérebro. Sendo assim, decidimos substituí-lo por um modelo animal knockout do receptor global de GH (GHR^{-/-}), que possui a deleção completa de GHR desde o nascimento, garantindo assim a ausência completa do receptor em todos os tecidos do animal.

Figura 11 - Comparação entre o tamanho corporal de um camundongo do tipo selvagem (Wilde Type - WT) e um camundongo knockout do receptor global de GH (GHR^{-/-}). Média do comprimento naso-anal; peso corporal do camundongo adulto: WT (9,5 cm; 25 g) e GHR^{-/-} (6,5 cm; 10 g).



Fonte: autor da dissertação

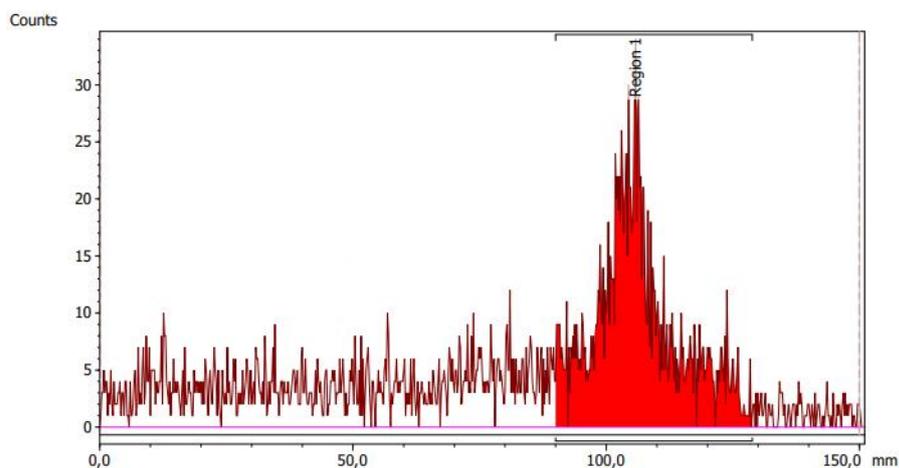
6.2. Padronização da radiomarcção

A radioiodação foi realizada pelo método da cloramina T de Hunter e Greenwood (1962) e padronizada para obter um alto rendimento na marcação com impacto reduzido na molécula de pGH. Na condição de marcação controlada pelo grau de oxidação induzida pela CLT, não obtivemos uma marcação detectável pelo

equipamento de SPECT, sendo observada apenas a presença de ^{123}I livre na solução, como é possível visualizar no cromatograma da Figura 12. A radiomarcagem foi obtida com a concentração de 100 μg de CLT e tempo de reação de 45 minutos. Diferentes concentrações do hormônio (5 μg e 10 μg) demonstraram que uma quantidade maior era capaz de aumentar o rendimento da marcação (Figura 13). Decidimos aumentar a concentração do hormônio para 50 μg e testamos se o aumento da atividade do ^{123}I de 34 MBq para 74 MBq e 111 MBq com tempo de reação de 15 min com a CLT, poderia aumentar a incorporação do radioisótopo no hormônio, mas como observado na Figura 14, o aumento da atividade na amostra resultou em mais ^{123}I livre presente na solução. Sendo assim, utilizamos a condição de marcação de 50 μg de pGH, 37 MBq de ^{123}I e 100 μg de CLT e testamos diferentes tempos de reação variando de 5 a 45 min, adicionando 200 μg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ no final de cada reação. Observamos que houve um aumento no rendimento da marcação de acordo com o tempo de reação e o melhor resultado obtido foi com 45 min, promovendo um rendimento superior a 95% (Figura 15). Na Figura 16 observamos o resultado da marcação do pGH com ^{131}I , na qual foi diminuída a concentração de CLT para 50 μg , com o objetivo de minimizar os impactos causados ao hormônio pelo reagente. Observamos também um ótimo rendimento na marcação. Na mesma Figura é apresentado o cromatograma da marcação da Albumina bovina com ^{123}I onde também foi obtido um rendimento superior a 95% na marcação.

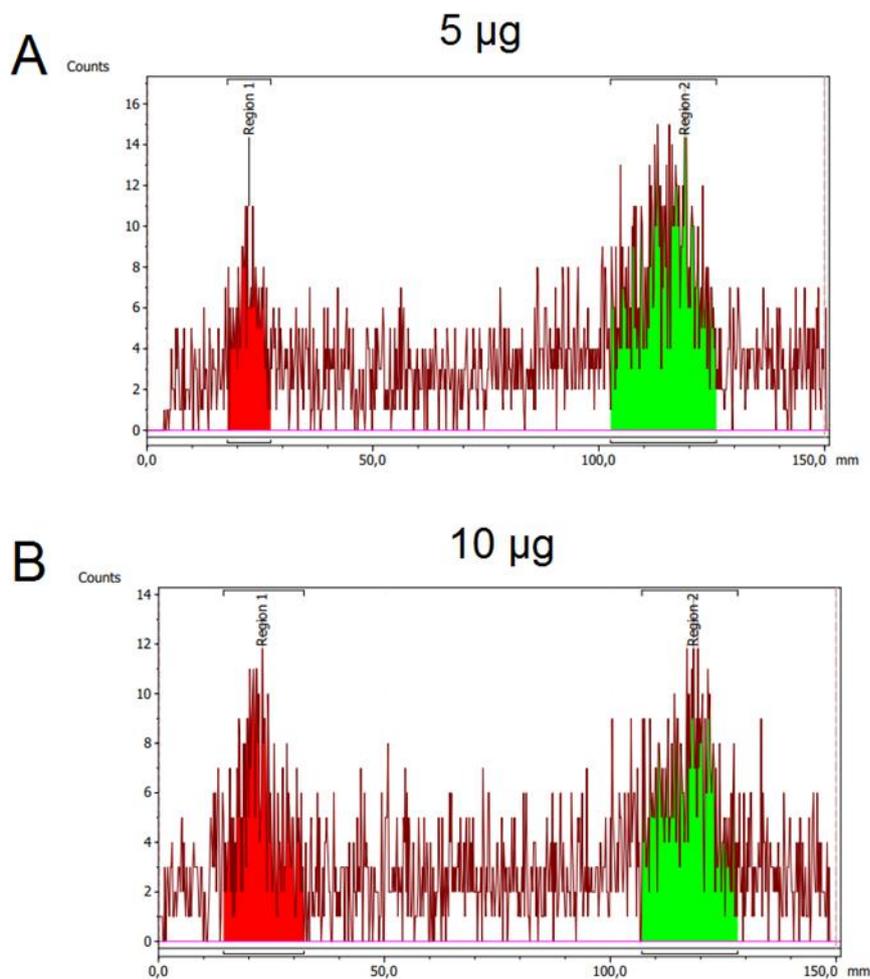
O pGH radioativamente iodado foi purificado através de centrifugação com colunas de filtração com poros de 3 kDa (Amicon). Ao realizar o teste de qualidade do filtrado, cortando a fita de iTLC ao meio para medir a atividade de cada uma das partes no contador Gama, observamos redução de aproximadamente 50% no rendimento da marcação, indicando que não houve uma boa filtração do iodo radioativo livre e que uma grande parte do hormônio marcado foi perdido, retido na coluna de filtração. Considerando que o rendimento da marcação dos produtos foi superior a 95%, o que indica uma alta absorção do radioisótopo pelas proteínas e uma quantidade muito baixa de iodo livre presente nas soluções, optamos por não filtrar as soluções com os produtos marcados, pois consideramos que o radiomarcado com rendimentos de 95% ou mais estão aptos para os estudos de biodistribuição.

Figura 12 - Cromatograma representando a atividade em contagem por minuto (CPM) detectada por SPECT-CT, ao longo da fita de iTLC contendo 2 μl da reação de marcação: pGH (5 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$) com adição de ^{123}I (37MBq/2 μL), CLT (1 $\mu\text{g}/12\mu\text{L}$), tempo de reação de 15 min e adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (1 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$) para finalizar a reação. O pico em vermelho, aproximadamente a 100 mm do início da fita, corresponde ao ^{123}I livre presente na solução.



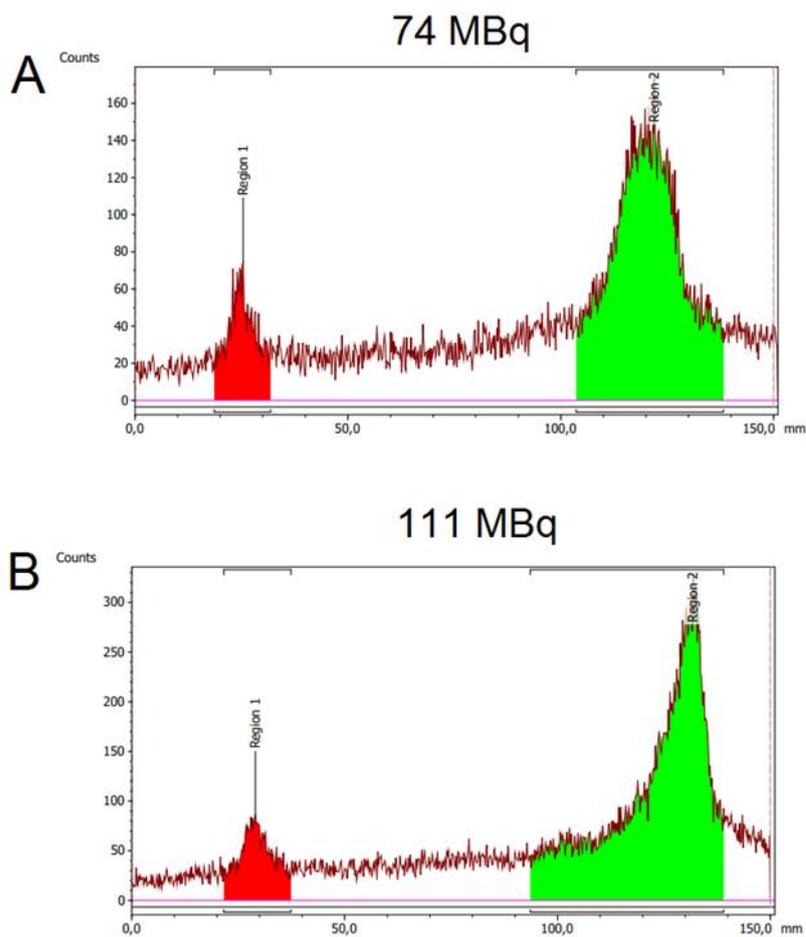
Fonte: autor da dissertação

Figura 13 - Cromatogramas com fita de iTLC contendo 2 μL da reação de marcação: pGH (5 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$) (A) e 10 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ (B) com adição de 50 e 45 μL de PBS, ^{123}I (37MBq/1 μL), CLT (100 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$), tempo de reação de 45 min e adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (200 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$). A região (1) em vermelho, corresponde ao início da fita, onde foi adicionada a solução, o pico (vermelho) corresponde ao ^{123}I -pGH, e a região (2) verde corresponde ao iodo livre, que percorreu pela fita.



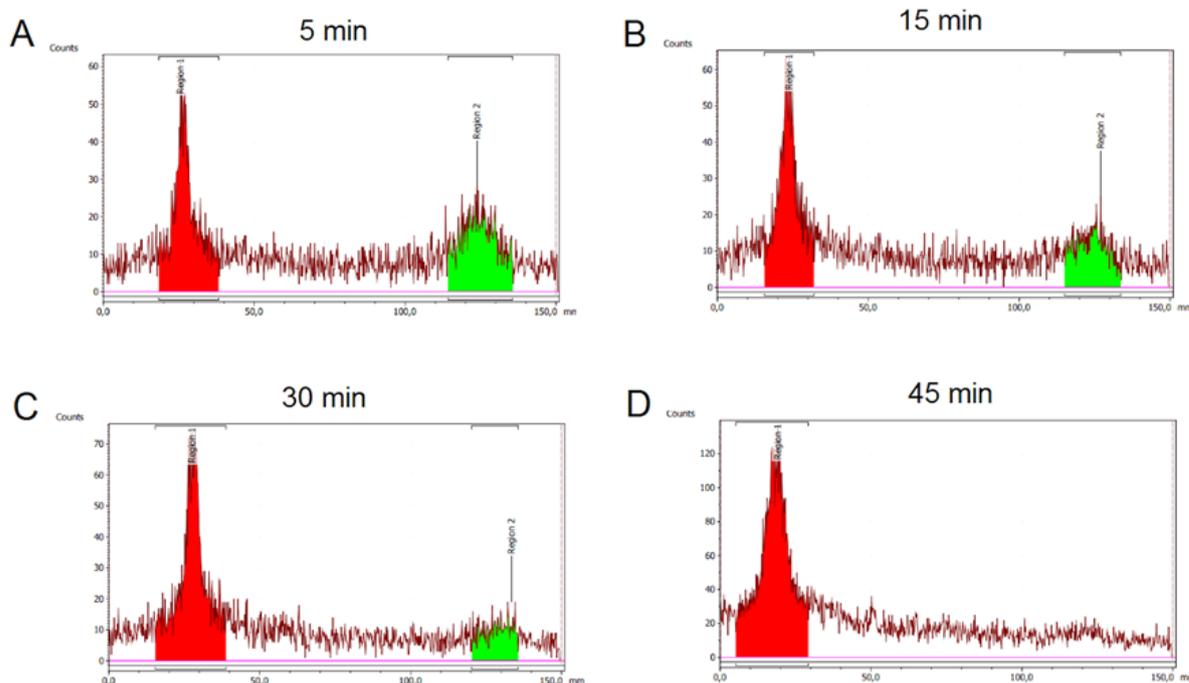
Fonte: autor da dissertação

Figura 14 - Cromatogramas com fita de iTLC contendo 20 μL da reação de marcação: pGH (50 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$) com adição de 50 μL de PBS, ^{123}I (A) 74 MBq/2 μL e (B) 111MBq/3 μL), CLT (100 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$), tempo de reação de 15 min e adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (200 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$).



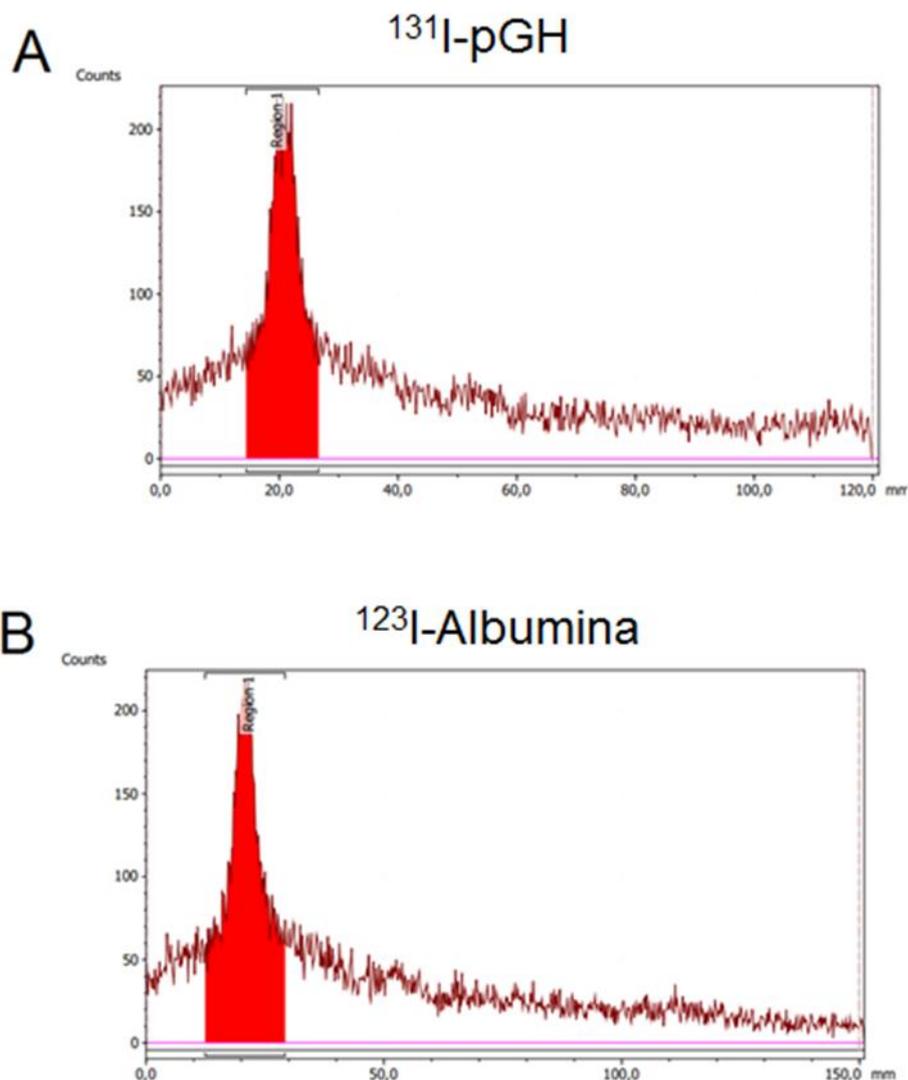
Fonte: autor da dissertação

Figura 15 - Cromatogramas com fita de iTLC analisando 2 μ l das reações de marcação com diferentes tempos de duração: pGH (50 μ g/5 μ L) com adição de 50 μ L de PBS, 125 I (37MBq/2 μ L), CLT (100 μ g/5 μ L). A, B, C e D correspondem aos tempos de reação de 5 min, 15 min, 30 min e 45 min, respectivamente. Foi adicionado Na₂S₂O₅ (200 μ g/ 5 μ l) ao final de cada tempo de reação.



Fonte: autor da dissertação.

Figura 16 - Cromatogramas com fita de iTLC contendo 20 μL da reação de marcação: (A) pGH (50 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$) com adição de 50 μL de PBS, ^{131}I (37MBq/2 μL), CLT (50 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$), tempo de reação de 45 min e adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (100 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$) e (B) Albumina (5mg/50 μL), ^{123}I (37MBq/2 μL), CLT (200 μg) tempo de reação de 45 min e adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (400 μg).



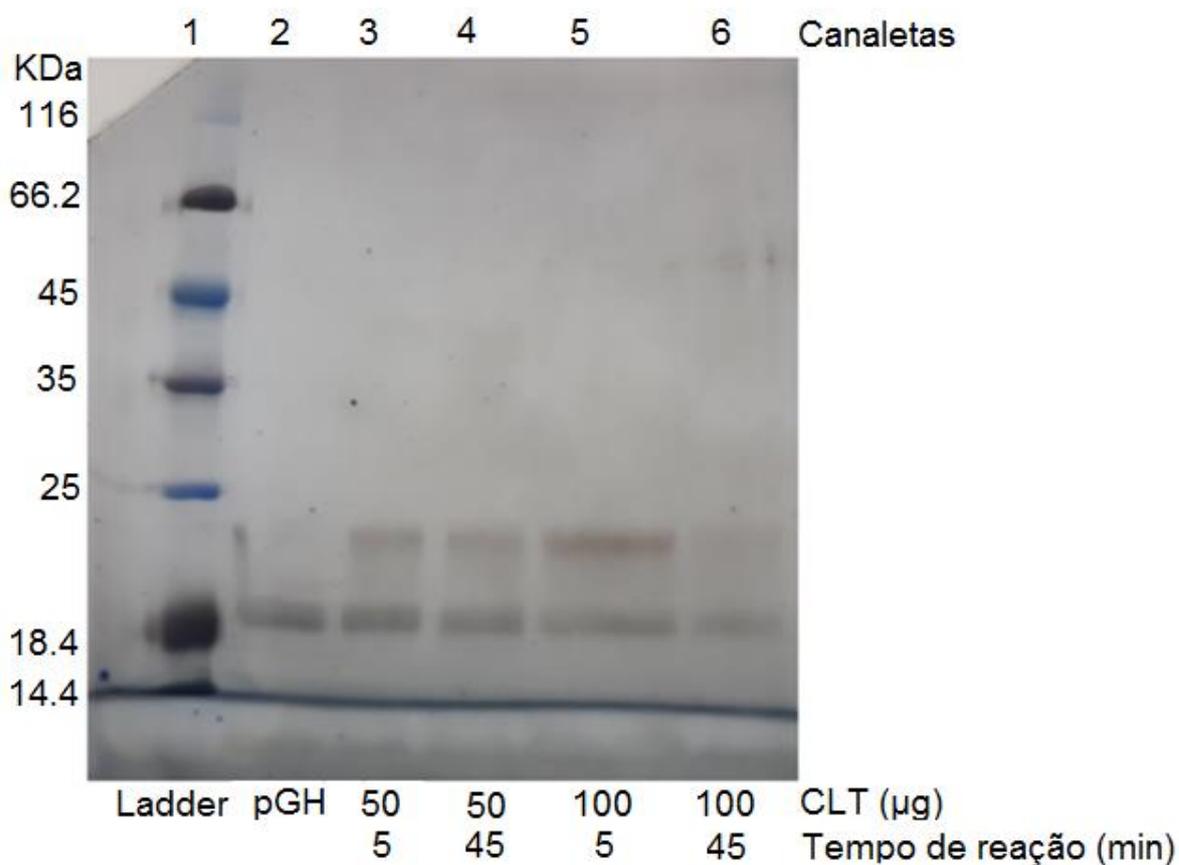
Fonte: autor da dissertação.

Foi avaliado, utilizando um contador gama, se o ^{123}I permaneceu estavelmente ligado ao pGH. O ^{123}I -pGH foi diluído em soro fetal bovino e analisado em diferentes tempos até o isótopo completar uma meia-vida de decaimento (13 horas). Foi observado através do teste de estabilidade, uma redução de 50% da atividade das quatro amostras contendo ^{123}I -pGH após uma meia-vida, o que indica a alta pureza radioquímica da marcação

6.3. Avaliação dos impactos da CLT no pGH

Para avaliar os impactos da CLT na estrutura do pGH, como a formação de agregados e formas alteradas do hormônio, realizamos um SDS-PAGE 15% analisando amostras expostas a concentrações de 50 e 100 µg de CLT e dois tempos de reação (5 e 45 min). Na Figura 17, é possível visualizar que na canaleta correspondente ao pGH, sem reagir com a CLT, observamos uma banda com massa molecular de 22 kDa, posição esperada para o pGH. Já nas canaletas correspondentes ao pGH que reagiu com a CLT, observamos nas diferentes concentrações e tempos de reação, o surgimento de banda na região superior à massa molecular esperada, indicando possivelmente formação de agregados da proteína. Na canaleta correspondente ao pGH que sofreu reação de 45 min com 100 µg de CLT, é possível observar que a banda (22 kDa) ficou mais fraca, indicando uma redução do material disponível e as respectivas massas moleculares. Isso foi confirmado através das análises de cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão de tamanho (HPSEC) Figura 18.

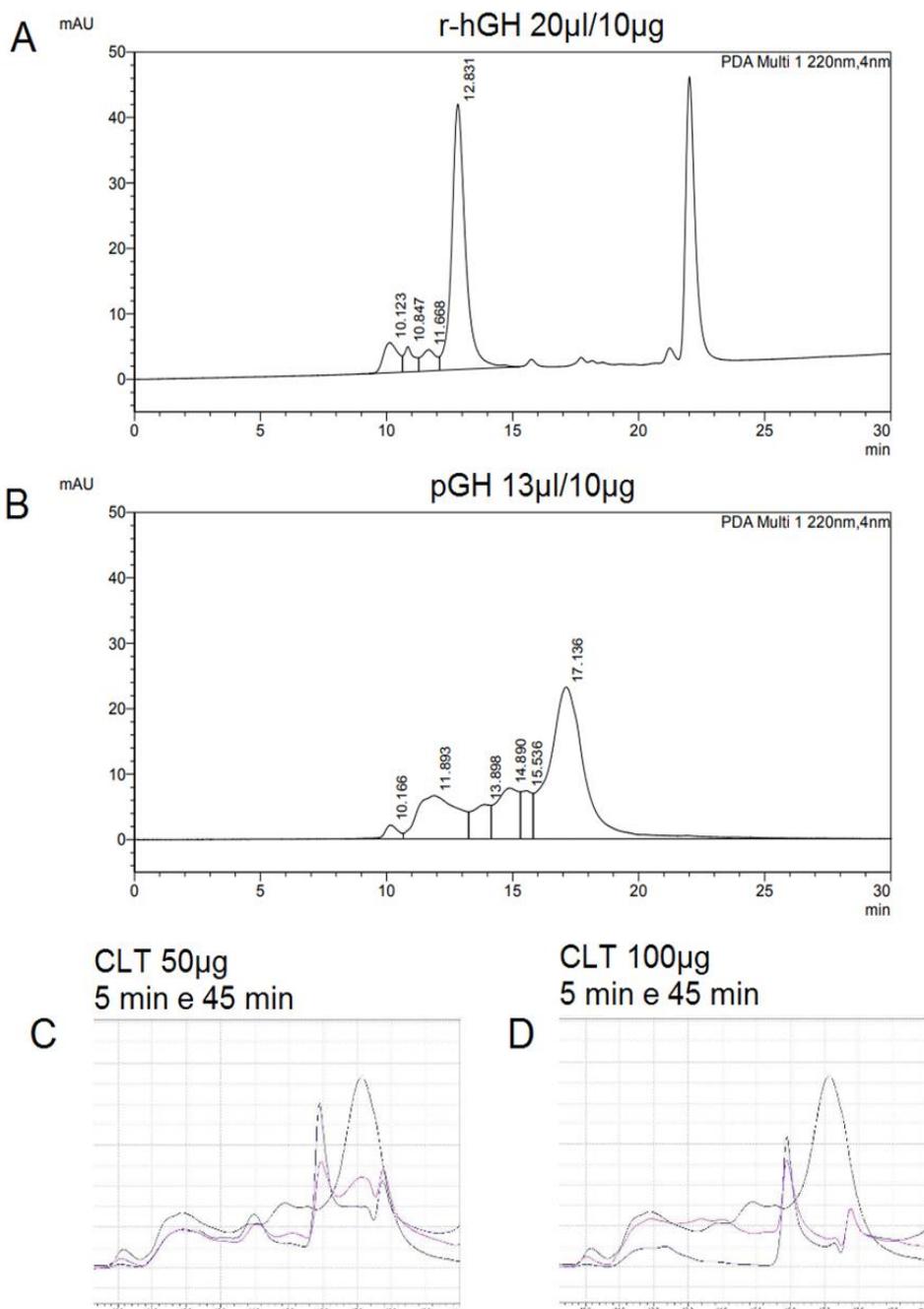
Figura 17 - Análise por SDS-PAGE 15%, não reduzido, das amostras de pGH diluídos em tampão PBS e de soluções contendo o pGH depois de incubados com 50 e 100 μg de CLT, por 5 e 45 minutos. 1) Marcador de massa molecular (kDa), 2) pGH sem CLT, 3) pGH com 50 μg de CLT e 5 min de incubação, 4) pGH com 50 μg de CLT e 45 min de incubação, 5) pGH com 100 μg de CLT e 5 min de incubação, 6) pGH com 100 μg de CLT e 45 min de incubação. Gel corado com nitrato de prata.



Fonte: autor da dissertação.

Os perfis cromatográficos obtidos em HPSEC do hormônio de crescimento variam de acordo com a espécie (Fridman *et al.*, 1990). A Figura 18B apresenta a análise por HPSEC do hormônio de crescimento porcino que apresentou tempo de retenção (t_R) de 17,13 min (pico principal) e formas diméricas e agregadas que aparecem a partir de 10,16 min em comparação com o padrão do hormônio de crescimento humano recombinante (Figura 18A) t_R de 12,83 min do pico principal e formas diméricas e agregadas com t_R a partir de 10,12 min. Ao realizar a quantificação da proteína total, a unidade de área correspondente ao pGH, que não sofreu reação com a CLT, foi de 4.069.664 unidades de área (ua) (100%). Uma redução na quantidade da amostra nos tempos de retenção correspondente ao pGH foi observada de acordo com a concentração e tempo de reação com a CLT. Apesar disso, foi identificada conservação nas áreas correspondentes ao t_R entre 15,80 min e 17,75 min, mais próximos do pico principal do pGH (ver Tabela 1). Foram estabelecidos que o tempo de reação de 45 min e a concentração de 50 μ g de CLT promoveu o melhor rendimento na marcação e com menor alteração nas características do hormônio.

Figura 18 – Perfil cromatográfico das amostras de pGH incubadas com 50 μg ou 100 μg de CLT por 5 ou 45 minutos. Análises por cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular (HPSEC). A solução contendo hormônio de crescimento humano recombinante (r-hGH). B, solução contendo pGH. C, comparação por sobreposição das soluções contendo pGH sem reagir com CLT (preto) e das soluções contendo pGH incubadas com 50 μg de CLT nos tempos de 5 min (rosa) e 45 min (azul). D, Comparação por sobreposição das soluções contendo pGH sem reagir com CLT (preto) e das soluções contendo pGH e que sofreram reação com 100 μg de CLT e tempo de 5 min (rosa) ou 45 min (azul).



Fonte: autor da dissertação

Tabela 1 – Avaliação por HPSEC do dano ao pGH na presença de CLT após 5 ou 45 minutos.

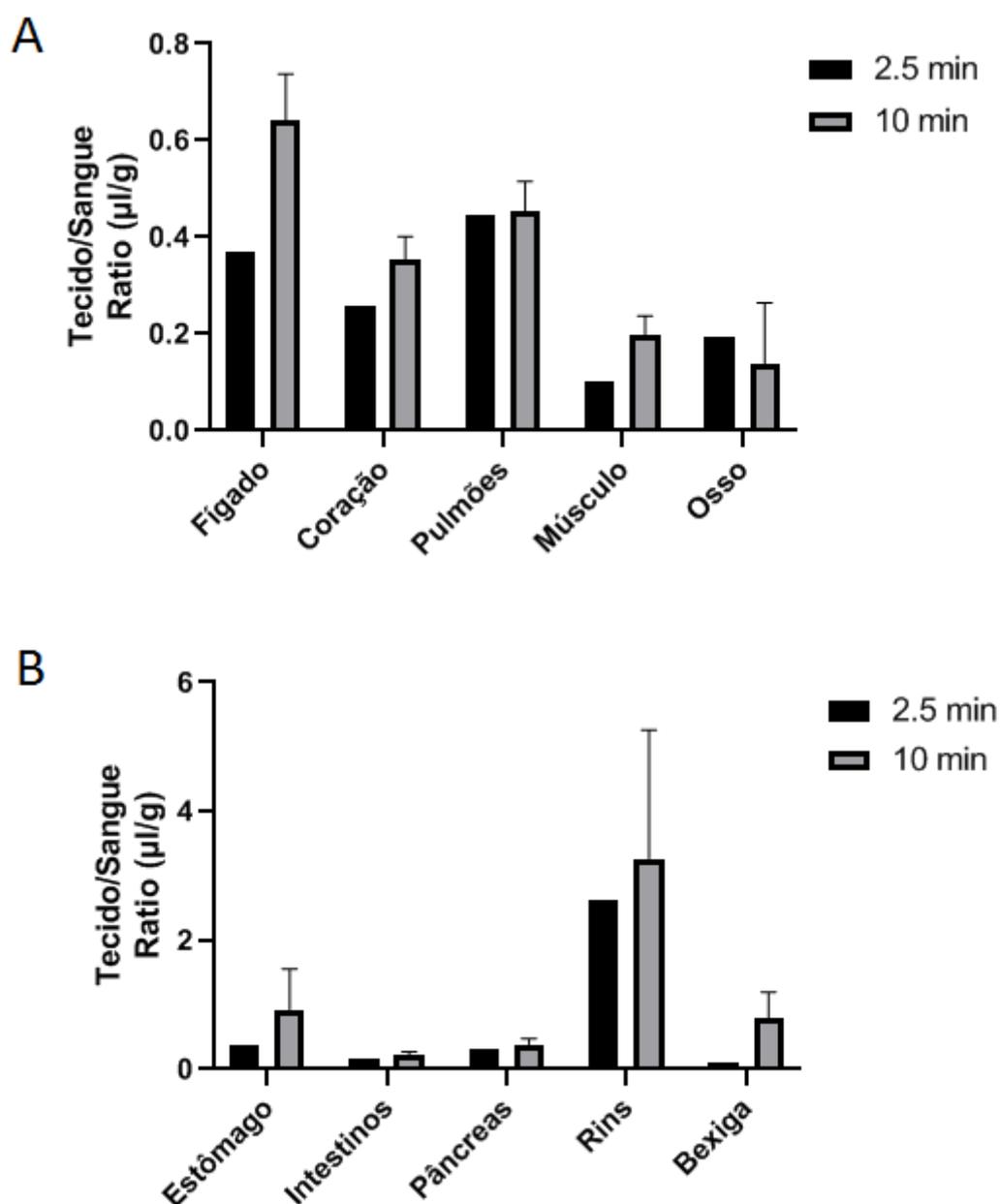
	Área total correspondente ao cromatograma completo do pGH (100 % = 4.069.664 unidades de área)	
Tempo de incubação com CLT	50 µg de CLT	100 µg de CLT
5 min	80,28%	71,89%
45 min	67,59%	32,94%
	Área entre 15,80 min e 17,75 min do pGH total (pico principal - 56,54%)	
Tempo de incubação com CLT	50 µg de CLT	100 µg de CLT
5 min	48%	33%
45 min	44%	25%

6.4. Ensaios de biodistribuição

Com a definição do protocolo de marcação capaz de gerar um produto com alta pureza radioquímica, decidimos testar a aplicação do protocolo de biodistribuição, com injeção do radiomarcado em animais seguido de eutanásia e coleta dos tecidos para análise através do contador gama. No gráfico apresentado na Figura 19 é possível visualizar que houve uma variação para mais na contagem da atividade dos tecidos dos animais eutanasiados no tempo de 10 min, comparado ao animal eutanasiado 2,5 min após a injeção, embora o número de amostras reduzido não tenha permitido realizar uma análise estatística. Na Figura 20 é possível visualizar uma contagem maior no sangue e no cérebro dos animais eutanasiados 2,5 min em comparação aos animais eutanasiados 10 min após a injeção.

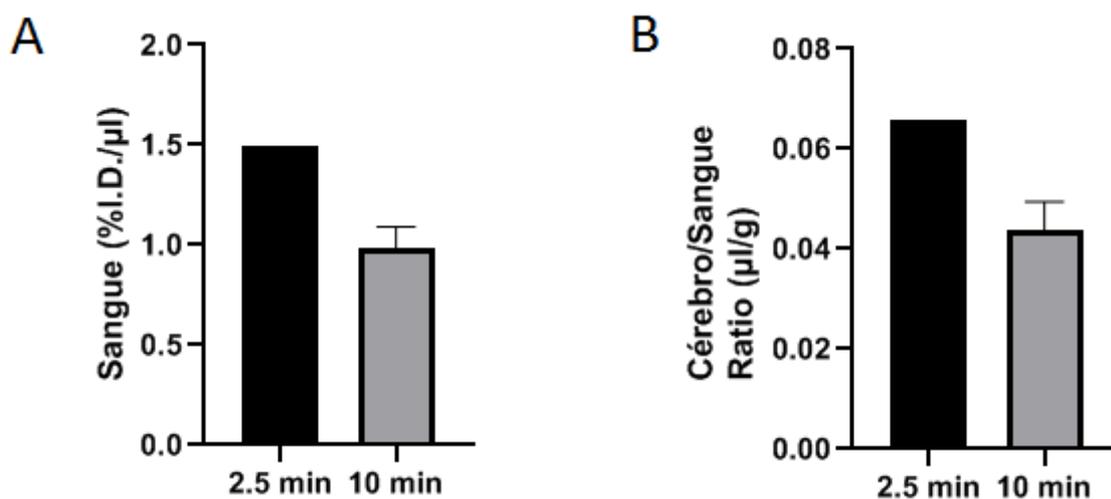
Não observamos imagens obtidas através da autorradiografia dos cortes encefálicos dos animais utilizados neste ensaio, pois a atividade radioativa estava abaixo da sensibilidade do equipamento, indicando a necessidade de injetar uma amostra com atividade radioativa maior.

Figura 19 – Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) no ensaio de biodistribuição em camundongos C57BL/6J injetados com ^{123}I -pGH (3,6 MBq) e eutanasiados no tempo de 2,5 e 10 min, após a injeção intravenosa.



Fonte: autor da dissertação.

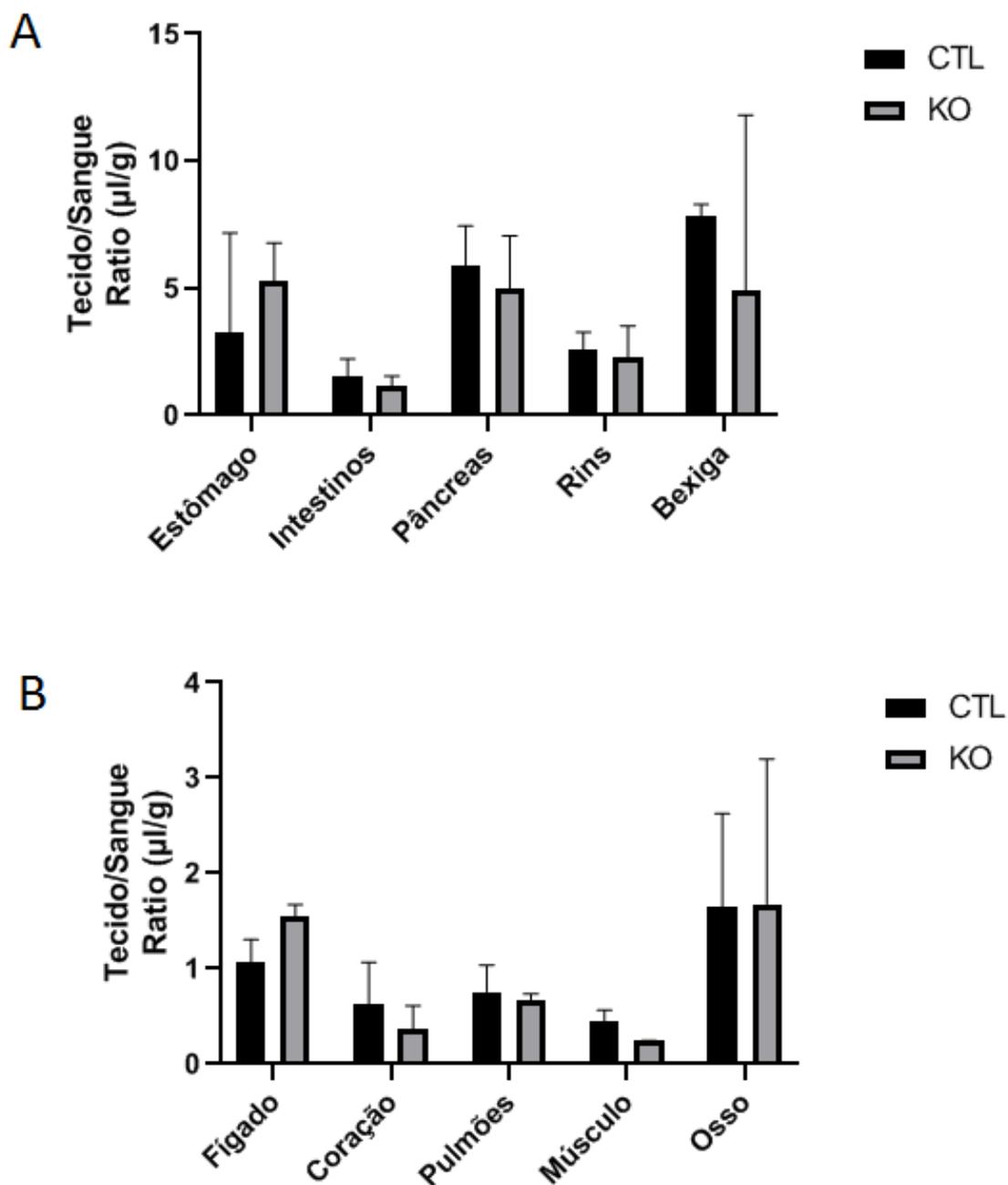
Figura 20 – Porcentagem da dose injetada por μL de sangue (A); Razão Cérebro/Sangue do ensaio de biodistribuição em camundongos C57BL/6J injetados com ^{123}I -pGH (3,6 MBq) e eutanasiados no tempo de 2,5 e 10 min, após a injeção intravenosa.



Fonte: autor da dissertação.

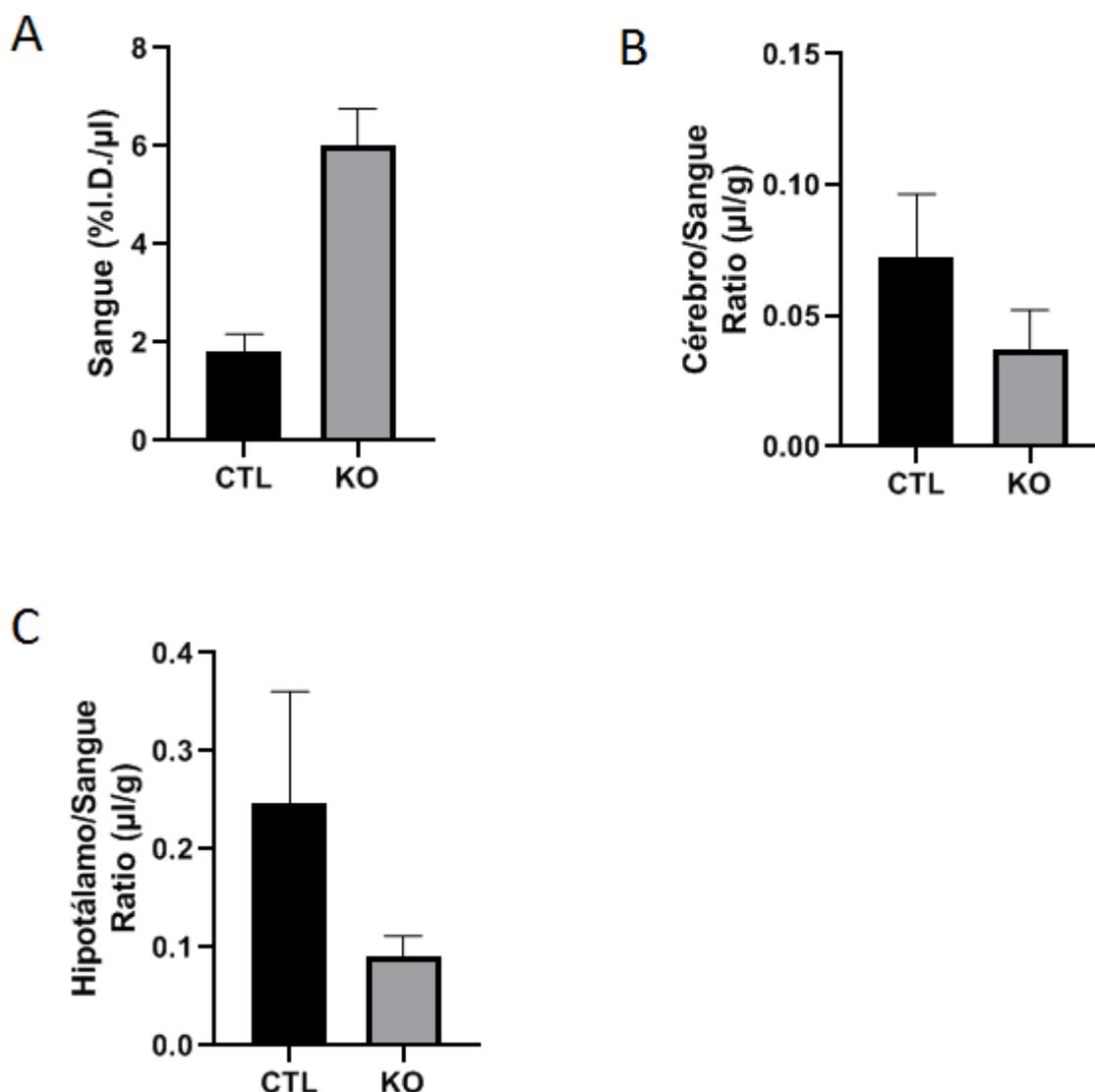
Para avaliar a necessidade do receptor na passagem do GH da circulação para o SNC, camundongos GHR $-/-$ receberam 3,6 MBq de ^{123}I -pGH em 100 μL de PBS, administrado intraperitonealmente, seguido de eutanásia 45 min após a injeção. Utilizamos 5 animais nesse experimento, 2 camundongos knockout global para o GHR (KO) e 3 animais controle fundo C57BL / 6J (CTL). Os órgãos foram coletados, a razão tecido/sangue foi calculada e a análise dos valores obtidos demonstrou uma tendência maior da presença do hormônio marcado nos tecidos dos animais CTL, comparado aos KO, mas nenhuma diferença significativa foi observada nos tecidos apresentados na Figura 21. Ao comparar a porcentagem da dose injetada por μL de sangue, os animais KO apresentaram uma contagem significativamente maior do que os animais CTL, com $P= 0,0032$. Através do gráfico é possível visualizar que a contagem no cérebro total dos animais KO foi menor do que nos animais CTL (Figura 22B), essa diferença foi marcadamente maior quando comparamos o hipotálamo separadamente (Figura 22C). Apesar disso, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Figura 21 – Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) do ensaio comparativo da biodistribuição entre camundongos GHr $-/-$ (KO) e camundongos C57BL/6J (CTL).



Fonte: autor da dissertação.

Figura 22 – Porcentagem da dose injetada por μL de sangue (A) Razão Cérebro/Sangue (B) e Razão Hipotálamo/Sangue (C) do ensaio comparativo da biodistribuição entre camundongos GHR $-/-$ (KO) e camundongos C57BL/6J (CTL).



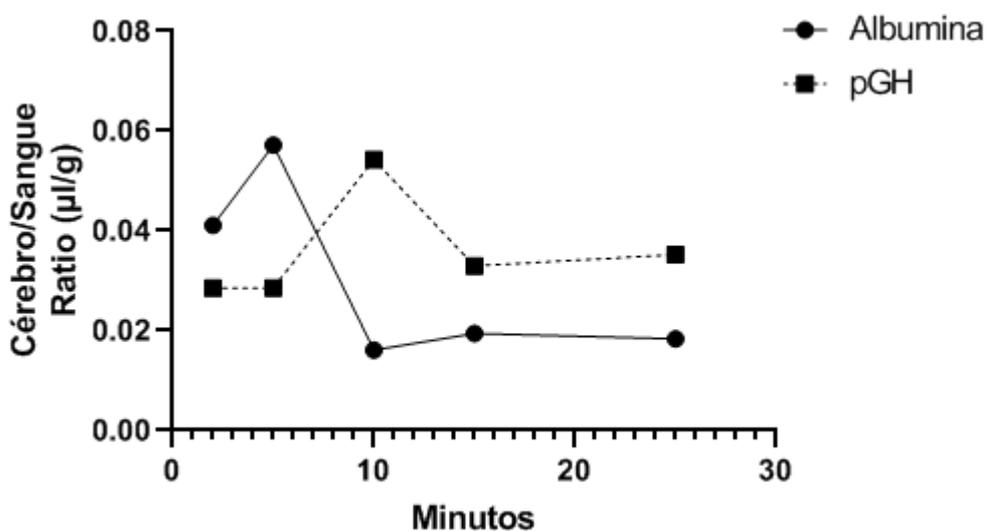
Fonte: autor da dissertação.

6.5. Avaliação do transporte de ^{131}I -pGH para o cérebro em diferentes tempos de exposição

Pra avaliar a passagem do GH para o SNC de acordo com o tempo de exposição, o pGH marcado com ^{131}I e a albumina com ^{123}I foram injetados

simultaneamente em camundongos C57BL/6J. Os animais foram eutanasiados em diferentes tempos após a injeção e o sangue, fígado e cérebro foram coletados. A leitura da atividade do radioisótopo de cada amostra foi realizada em um contador gama logo após o experimento e seis dias depois, tempo necessário para o decaimento completo do ^{123}I , que possui meia vida de 13,3 horas, bem menor que a do ^{131}I , com meia vida de 8,02 dias. Os cálculos de decaimento foram realizados e descontada a atividade inicial do ^{131}I -pGH (calculada após decaimento total do ^{123}I) foi estimada a atividade inicial da ^{123}I -albumina, como apresentado na Tabela 2. Ao comparar a atividade das amostras no cérebro dos animais, observamos que de acordo com o tempo de exposição houve uma tendência ao aumento da atividade do ^{131}I -pGH, enquanto a atividade da ^{123}I -albumina foi diminuindo ao longo do tempo (Figura 23).

Figura 23 – Gráfico referente às contagens detectadas de ^{131}I -pGH e ^{123}I -Albumina no cérebro de camundongos C57BL/6J em diferentes tempos de exposição.



Fonte: autor da dissertação.

Tabela 2 – Medida no contador gama de amostras contendo os isótopos radioativos ^{131}I que possui energia gama de 364 Kev e meia vida de 8,02 dias e ^{123}I que possui energia gama de 159 Kev e meia vida de 13,3 horas. A leitura da atividade dos radioisótopos ocorreu nos dois canais de detecção. Depois do tempo corrido de 8941,54 min, após o decaimento total do ^{123}I , a leitura foi refeita. A análise dos resultados com os devidos ajustes com base no tempo de meia vida do ^{131}I foi possível calcular a atividade inicial em cada amostra.

Atividade inicial		
Radioisótopo	Canal	Atividade (μCi)
^{131}I	^{131}I	183
^{123}I	^{131}I	389
$^{131}\text{I}+^{123}\text{I}$	^{131}I	569
^{131}I	^{123}I	119
^{123}I	^{123}I	253
$^{131}\text{I}+^{123}\text{I}$	^{123}I	371

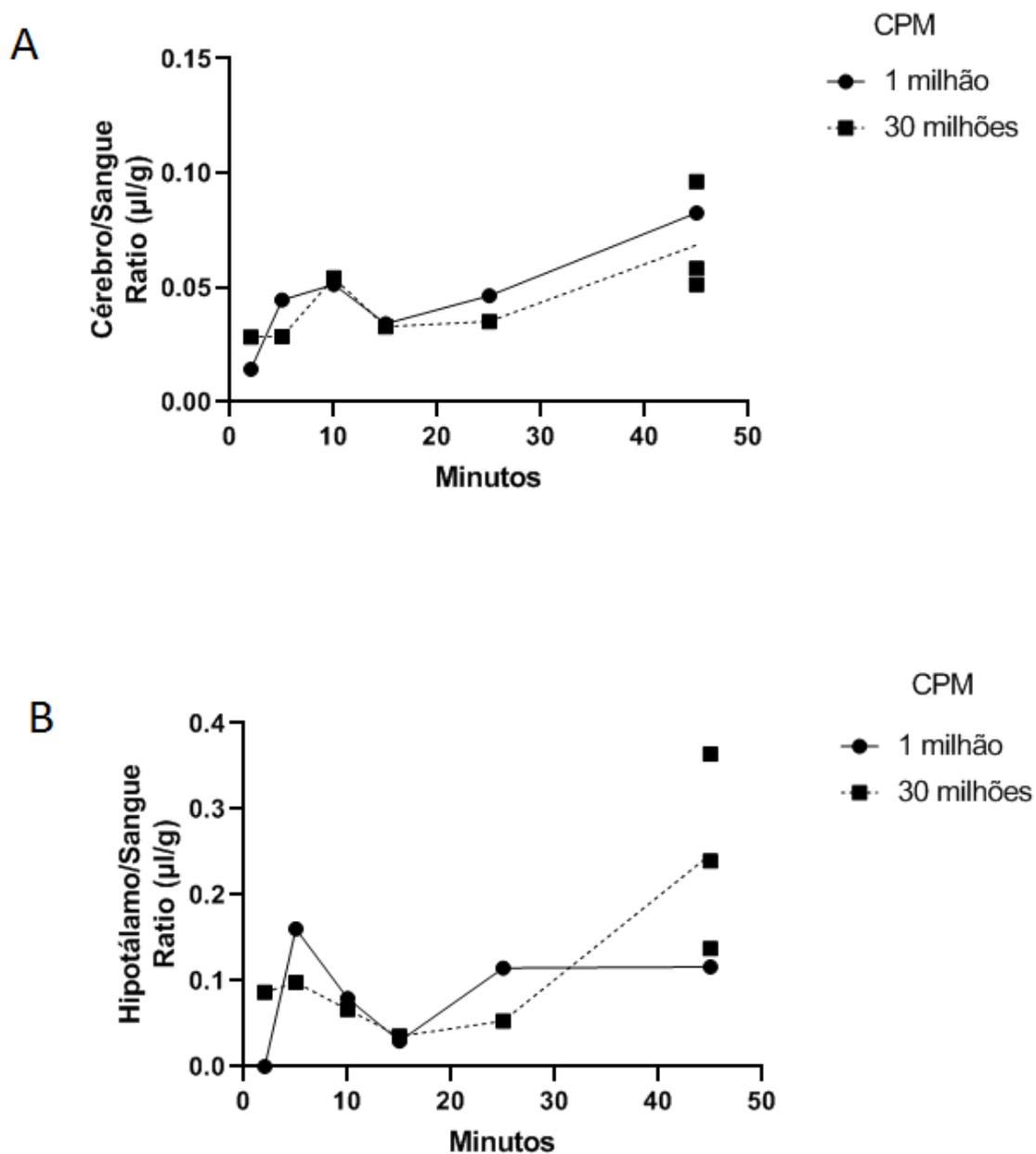
Tempo corrido (8941,54 min) (~6 dias)		
Radioisótopo	Canal	Atividade (μCi)
^{131}I	^{131}I	107
^{123}I	^{131}I	0
$^{131}\text{I}+^{123}\text{I}$	^{131}I	107
^{131}I	^{123}I	70
^{123}I	^{123}I	0
$^{131}\text{I}+^{123}\text{I}$	^{123}I	70

Fonte: autor da dissertação.

Para avaliar se diferentes doses de ^{131}I -pGH presente na circulação podem alterar a cinética da permeação do hormônio para o cérebro, realizamos o experimento do transporte em diferentes tempos de exposição, mas desta vez ao

invés de injetar 3,6 MBq de ^{131}I -pGH (4,9 μg do hormônio), o que corresponde a 30 milhões de contagens por minuto (CPM), injetamos 0,12 MBq de ^{131}I -pGH (0,16 μg do hormônio), correspondente a 1 milhão de CPM. Comparamos com os resultados anteriores, quando foi injetado 30 vezes mais hormônio marcado. Na Figura 24 é possível observar que houve uma similaridade na cinética da permeação do hormônio radiomarcado nas diferentes doses injetadas, tanto no cérebro como no hipotálamo.

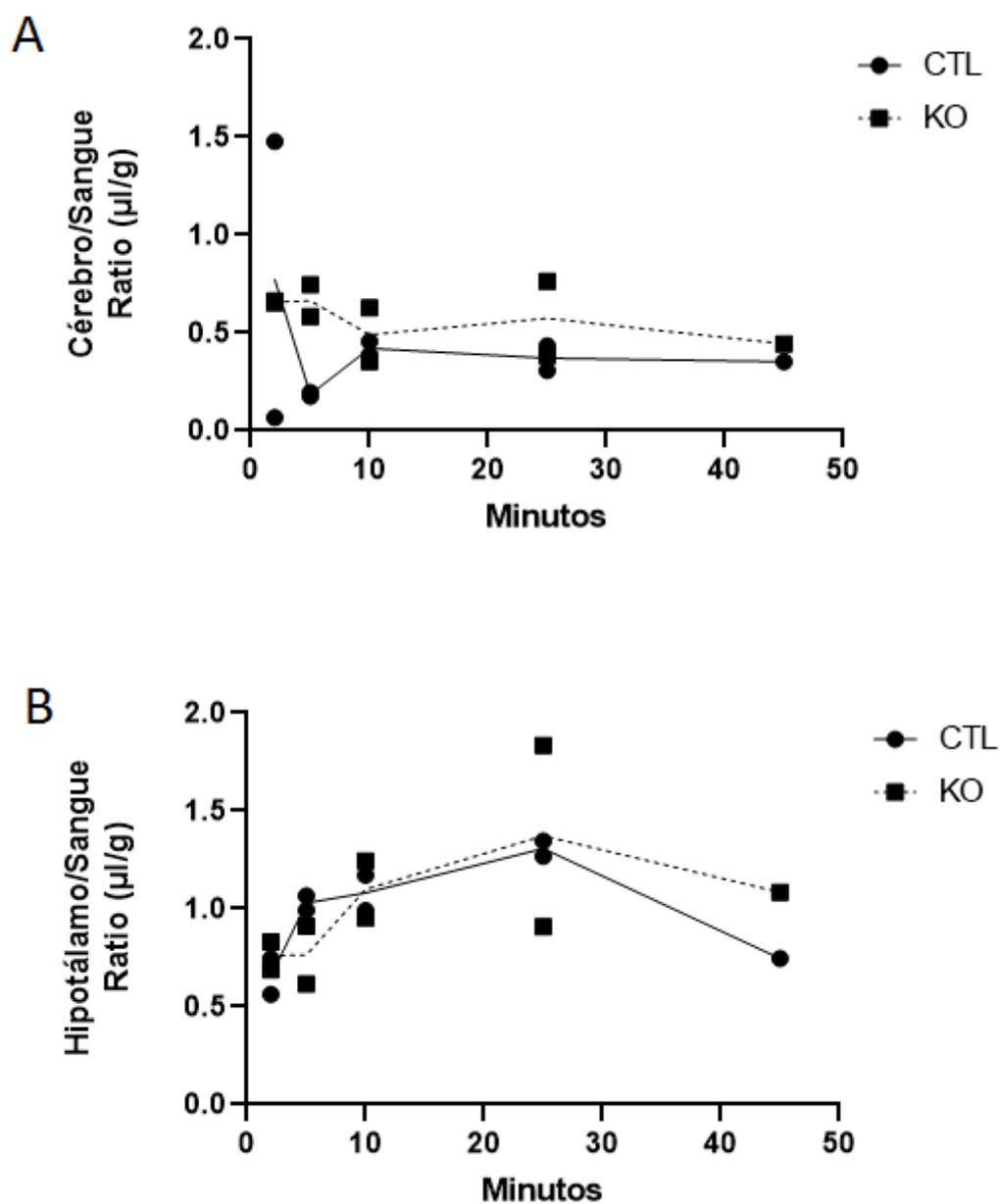
Figura 24 – Gráficos comparando a cinética da permeação no cérebro (A) e hipotálamo (B) de diferentes doses de ^{131}I -pGH injetado em camundongos C57BL/6J. A atividade foi medida em Contagem Por Minuto (CPM), onde 1 milhão de CPM corresponde a aplicação de 0,12 MBq e 30 milhões de CPM correspondem a aplicação de 3,6 MBq.



Fonte: autor da dissertação.

Avaliamos a distribuição de ^{131}I -pGH em diferentes tempos de exposição em camundongos GHr $-/-$ e controles, injetando o hormônio marcado com atividade de 0,12 MBq e 0,24 MBq, respectivamente, já que os animais controle possuem em média o dobro do peso corporal dos animais knockout. Os resultados mostraram que no cérebro total (Figura 25A) a presença do ^{131}I -pGH foi semelhante ao longo do tempo de exposição em ambos os animais. No hipotálamo (Figura 25B) o mesmo foi observado, demonstrando que o GH radiomarcado foi capaz de atravessar a BHE dos camundongos knockout e alcançar o tecido do hipotálamo desses animais.

Figura 25 – Gráfico comparando a cinética da permeação no cérebro (A) e hipotálamo (B) do ^{131}I -pGH em camundongos GHR $-/-$ (KO) e camundongos controle (CTL) em diferentes tempos de exposição.

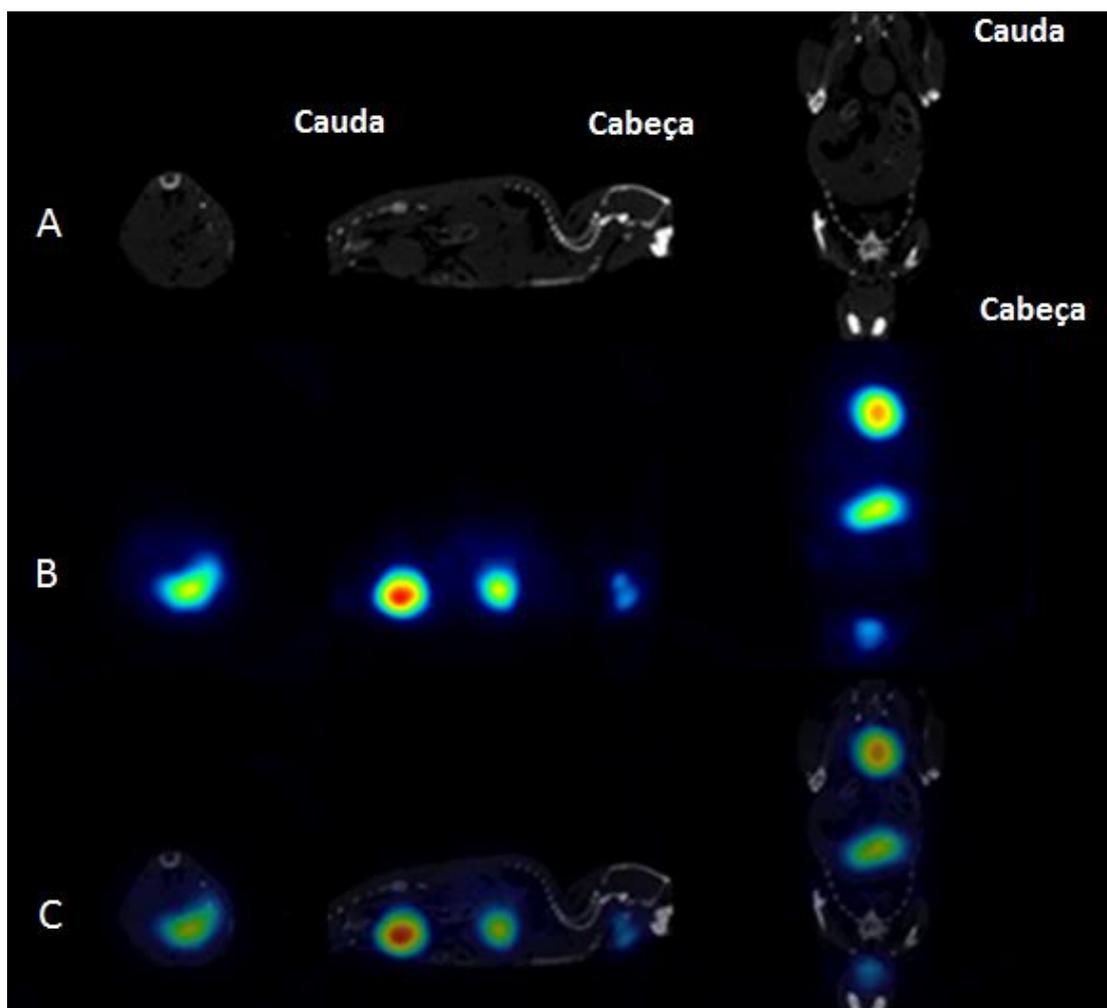


Fonte: autor da dissertação.

6.6. Ensaio de imagem por SPECT-CT

Para obter imagens da biodistribuição do radiomarcado, uma tomografia por emissão de fóton único/ tomografia computadorizada (SPECT-CT) foi realizada. Utilizamos um camundongo C57BL/6J que recebeu uma injeção pela veia caudal de ^{123}I -pGH 20 MBq, em 100 μl de PBS. No tempo de 45 min após a injeção, o animal foi colocado na câmara de escaneamento e analisado no microPET (microPETAlbira), anestesiado através de um cone colocado junto ao nariz. O intervalo entre a injeção e o início da imagem foi de 2 horas, tempo mínimo possível. Não foi detectada radioatividade no cérebro, como observado na Figura 26, na qual o radiomarcado é visível apenas em regiões como a bexiga, o fígado e a tireóide.

Figura 26 - Imagem obtida por tomografia por emissão de fóton único/ tomografia computadorizada (SPECT-CT) do corpo inteiro de um camundongo C57BL/6J, injetado com ^{123}I -pGH, com intervalo de leitura de aproximadamente 2 horas após a injeção. Tomografia computadorizada (A), tomografia por emissão de fóton único (B), sobreposição (C). As cores em vermelho, amarelo, verde e azul representam o grau de atividade radioativa emitida pelo ^{123}I -pGH, onde vermelho representa o maior grau e azul o menor grau.

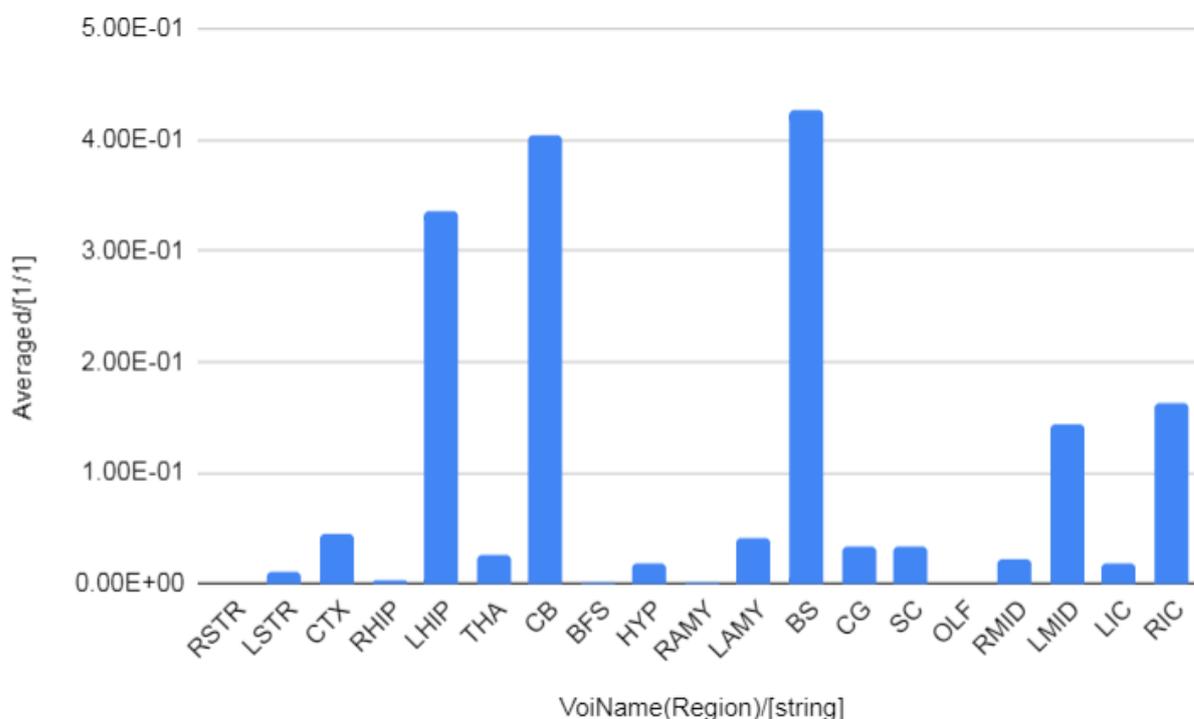


Fonte: autor da dissertação.

Realizamos outro estudo, desta vez utilizando uma dose letal de anestésico 45 min após a injeção, paralisando assim a biodistribuição do radiomarcado. Colocamos o animal eutanasiado na câmara de escaneamento e focalizamos a leitura pelo equipamento na região do cérebro. Assim, obtivemos a localização anatômica do ^{123}I -pGH no cérebro. Como observado no gráfico da Figura 27, as regiões que

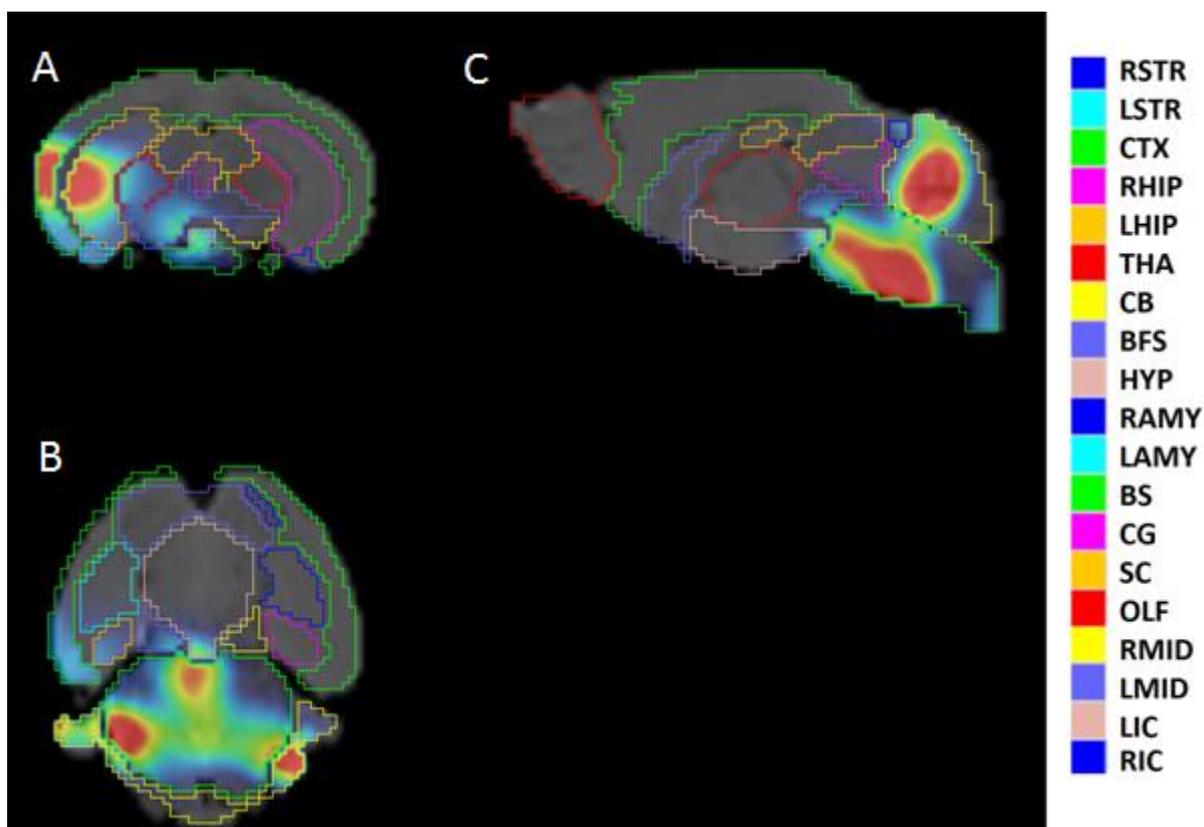
apresentaram as maiores contagens da atividade do hormônio radiomarcado foram o hipocampo esquerdo, o cerebelo e o tronco cerebral. Na Figura 28 é possível visualizar através da imagem a atividade do ^{123}I -pGH nessas e em outras regiões anatômicas.

Figura 27 – Gráfico apresentando a média da contagem da atividade (CPM) do ^{123}I -pGH em diferentes regiões anatômicas do cérebro de um camundongo eutanasiado 45 min após a injeção. Abreviaturas: RSTR, estriado direito; LSRT, estriado esquerdo; CTX, córtex; RHIP, hipocampo direito; LHIP, hipocampo esquerdo; THA, tálamo; CB, cerebelo; BFS, prosencéfalo basal e septo; HYP, hipotálamo; RAMY, amígdala direita; LAMY, amígdala esquerda; BS, tronco cerebral; CG, substância cinzenta periaquedutal; SC, colículo superior; OLF, bulbo olfatório; RMID, mesencéfalo direito; LMID mesencéfalo esquerdo; LIC, colículo inferior esquerdo; RIC, colículo inferior direito.



Fonte: autor da dissertação.

Figura 28 - Imagem obtida por tomografia por emissão de fóton único/ tomografia computadorizada (SPECT-CT), do cérebro de um camundongo eutanasiado 45 min após a injeção de ^{123}I -pGH. Secção frontal (A), secção transversal (B) e secção sagital (C). As áreas delineadas em cores representam regiões anatômicas do cérebro. Dentro das áreas delineadas, as cores de vermelho (maior atividade) a azul representam os graus de radiação emitidos pelo ^{123}I -pGH. Abreviaturas: RSTR, estriado direito; LSRT, estriado esquerdo; CTX, córtex; RHIP, hipocampo direito; LHIP, hipocampo esquerdo; THA, tálamo; CB, cerebelo; BFS, prosencéfalo basal e septo; HYP, hipotálamo; RAMY, amígdala direita; LAMY, amígdala esquerda; BS, tronco cerebral; CG, substância cinzenta periaquedutal; SC, colículo superior; OLF, bulbo olfatório; RMID, mesencéfalo direito; LMID mesencéfalo esquerdo; LIC, colículo inferior esquerdo; RIC, colículo inferior direito.



Fonte: autor da dissertação.

7. DISCUSSÃO

Para avaliar a participação do receptor do hormônio de crescimento no transporte de GH para o SNC, definimos como estratégia inicial utilizar um modelo animal (Cre-loxP) knockout para este receptor. Inicialmente, utilizamos camundongos knockout temporais induzíveis por TMX, que inabilitaria a expressão desse receptor quando exposto a essa droga, o que poderia ser realizado inclusive na fase adulta. Seria um modelo bem adequado para esse estudo, já que o animal teria um crescimento normal até o momento do experimento. No teste de validação, ao comparar o ganho de peso após as aplicações de TMX, observamos que os animais knockout perderam peso ao longo do tempo, em comparação com os controles. Isso aconteceu principalmente pela redução na variação da massa magra, já que curiosamente, ambos os animais tiveram um aumento na variação da gordura corporal (Figura 9).

Essa variação na gordura corporal pode ser devida ao fato do próprio TMX se ligar ao receptor de estrogênio, afetando potencialmente o metabolismo energético. Além da sua expressão nos tecidos reprodutivos, o receptor de estrogênio também está amplamente distribuído no cérebro e tecidos periféricos não neurais, como o tecido adiposo (Vrtacnik *et al.*, 2014). No SNC, quando o estrogênio se liga ao seu receptor, o comportamento alimentar do rato é alterado juntamente com o metabolismo energético (Brown & Clegg, 2010). Da mesma forma, o estradiol afeta o gasto energético no tecido adiposo, que inclui atividade da lipoproteína lipase suprimida, lipogênese reduzida, lipólise aumentada e liberação de ácidos graxos livres (Tara *et al.*, 2005; Homma *et al.*, 2000). Enquanto os dois receptores de estrogênio, ER α e ER β , regulam a adiposidade e a distribuição de gordura, o ER α tem os efeitos dominantes (Brown & Clegg., 2010). O TMX pode imitar os efeitos do estrogênio, aumentando a utilização de ácidos graxos e reduzindo o ganho de peso corporal (Wade & Heller *et al.*, 1993).

Considerando o dimorfismo sexual, na administração de baixas doses de TMX, é observada a diminuição na porcentagem de peso e aumento na termogênese nos tecidos adiposos em fêmeas, mas não em camundongos machos, 3 dias após a aplicação (Zhao *et al.*, 2020). Em outro estudo, utilizando camundongos machos C57BL/6NTac que receberam tratamento com TMX por 5 dias consecutivos, foi observada diminuição aguda na massa de gordura corporal uma semana após o

tratamento, que se converteu em uma massa de gordura corporal relativa significativamente maior cinco semanas após o tratamento, com efeitos recíprocos na massa magra (Hesselbarth *et al.*, 2015). Em nosso estudo, observamos que trinta dias após a aplicação do TMX, camundongos Ubi-Cre^{ERT} fêmeas, tiveram aumento significativo na variação da gordura corporal, com um leve aumento na massa magra. Mais estudos são necessários para avaliar as adaptações metabólicas que ocorrem nesse modelo animal ao longo do tempo, quando submetido ao tratamento com TMX.

A interrupção do GHr em camundongos adultos, 12 meses após o tratamento com TMX, resulta no aumento da adiposidade corporal e redução da massa magra (Duran-Ortiz *et al.*, 2021). Em nosso estudo, observamos essas variações 30 dias após o tratamento. O GH desempenha um papel complexo na regulação do metabolismo, como efeitos catabólicos no tecido adiposo (Vijayakumar *et al.*, 2011). O comprometimento da atuação do GH nesses animais pode explicar esse aumento da adiposidade corporal. Com relação à redução da massa magra, isso pode ser explicado pela diminuição nos níveis circulantes de IGF-1, observado em nosso estudo, devido à expressiva deleção do GHr na região do fígado (Figura 10A), o que pode ser interessante para estudos que buscam avaliar os efeitos da perturbação do Eixo GH/IGF-1, entre outros.

No geral, os camundongos portadores do sistema completo Cre-loxP que receberam apenas óleo de gergelim (Ubi-GHr), apresentaram níveis menores na expressão do receptor, comparando-se aos camundongos portadores apenas do alelo Ubi-Cre^{ERT} que receberam TMX. Isso significa que esses camundongos transgênicos, gerados para perder a expressão do GHr na fase adulta, possuem naturalmente níveis mais baixos da expressão do receptor. Além disso, esses animais possuem níveis significativamente mais baixos de IGF-1 circulante, comparado aos controles (Figura 10C). Para o nosso estudo em específico, seria mais apropriado um modelo animal com deleção completa do receptor, principalmente na região do cérebro, o que não ocorreu nos nossos estudos com o modelo Cre-loxP. Ao medir os níveis de GHr no hipotálamo dos animais knockout temporais, observamos que as aplicações de TMX não foram capazes de promover uma boa deleção nesta região (Figura 10B). Isso pode ter acontecido, porque esses animais possuem a presença do gene responsável pela expressão da proteína fusão Cre-ERT2, incluindo a sequência do promotor da ubiquitina, que está presente em todas as células desses animais. O TMX injetado intraperitonealmente, se difunde gradualmente do peritônio para a circulação,

alcançando inicialmente os tecidos periféricos, como o fígado, que possui uma alta expressão de GHr e onde o TMX é metabolizado gerando os seus metabólitos bioativos que liberam o Cre ERT2 para recombinação de alelos floxed no núcleo da célula (Feil *et al.*, 1997; Indra *et al.*, 1999). Por esse motivo, o fígado é a região que possui a maior disponibilidade de TMX e a maior taxa de deleção do receptor. Ainda, os metabólitos bioativos do TMX terão acesso através da circulação, aos muitos tecidos do corpo do animal que competirão pela disponibilidade do TMX com o SNC.

O método utilizado no nosso trabalho está de acordo com estudos que preveem um limite máximo de dose de TMX para não comprometer a saúde do animal e os resultados esperados (Jahn *et al.*, 2018). Desta forma, concluímos que o modelo animal Ubi-GHrKO, com interrupção do receptor na fase adulta, não foi adequado para o nosso estudo, pois não observamos uma boa deleção do receptor na região do cérebro. Sendo assim, decidimos substituí-lo por um modelo animal knockout do receptor global de GH (GHr -/-), que possui a deleção completa de GHr desde o nascimento, garantindo assim a ausência completa do receptor em todos os tecidos do animal.

A eficiência da radioiodação do GH, ou seja, quantidade de iodo disponível na solução que é transferido para as moléculas, pode mudar de acordo com algumas variáveis, como a quantidade de material disponível na solução e o tempo corrido para a ação dos reagentes. Outro fator muito importante a ser considerado nesse procedimento é o impacto causado na proteína durante a reação, que pode influenciar na sua integridade física, atividade imunológica e biológica (Mattera & Dellacha, 1982; Mattera *et al.*, 1982). No desenvolvimento do método de radiomarcagem do GH empregando a CLT, Greenwood & Hunter (1963) alcançaram uma eficiência de até 76%, utilizando 5 µg de hGH, 14-28 MBq de ¹³¹I, 100 µg de CLT adicionando o dobro de Na₂S₂O₅ rapidamente após uma breve homogeneização. Nesse caso, o hGH marcado com ¹³¹I foi calculado para conter até 0,5–1 átomo de iodo/molécula. Eles observaram que a partir de 18 MBq/µg houve uma perda progressiva da atividade imunológica do hormônio. Em outro estudo, realizado por Biscayart *et al.*, (1989), sobre a preparação do hGH radiomarcado com ¹²⁵I usando duas condições de marcação, foi observado que adicionando ¹²⁵I com atividade de 37 MBq em 5 µg de hGH, com adição de 0,22 µg de CLT e tempo de reação de 5 min, a incorporação de iodo à proteína não foi superior à 20%, mas ao aumentar a concentração do hormônio para 20 µg e CLT para 0,88 µg, foi obtido um rendimento de 80%. Evidenciando que

com um tempo maior de reação, é possível diminuir a concentração de CLT em uma reação com uma quantidade maior do hormônio e obter um elevado rendimento na marcação.

Na padronização da radiomarkação no nosso trabalho, observamos que a condição de marcação utilizando 5 µg pGH com adição de ^{123}I com atividade de 37 MBq e 1 µg CLT reagindo por 15 min, a atividade do radiomarcado foi tão baixa que não foi possível a detecção pelo equipamento de SPECT (Figura 12). Quando aumentamos a concentração da CLT para 100 µg com tempo de reação de 45 min, conseguimos obter a detecção do radiomarcado, que atingiu um rendimento de aproximadamente 50% com 10 µg do hormônio (Figura 13). O aumento do tempo de reação foi fundamental para a obtenção de um rendimento superior a 95%, utilizando 50 µg de pGH (Figura 15). Quando realizamos a caracterização do pGH não marcado analisando o perfil cromatográfico obtido por HPSEC, identificamos que 56,54% correspondia ao pico principal, ou seja, ao hormônio não degradado (Tabela 1). A integridade da molécula é importante para que os resíduos de tirosina estejam disponíveis e corretamente expostos para a integração ao radioisótopo e para que o hormônio tenha a sua atividade imunológica e biológica conservada (Berndt *et al.*, 2018; Harada *et al.*, 2020). A reação do pGH com 100 µg de CLT por 45 min reduziu essa porcentagem para 25%, enquanto a reação com 50 µg de CLT apresentou uma porcentagem mais próxima ao pGH que não reagiu com a CLT (44%). Considerando que 50 µg de CLT foi suficiente para a obtenção de um rendimento superior a 95%, determinamos essa condição de reação como a condição capaz de promover um ótimo rendimento na marcação, sem causar danos significativos às moléculas íntegras presentes na solução (Figura 16A). A atividade específica do ^{131}I calculada para o GH considerando a substituição de 1 átomo de iodo/molécula é de aproximadamente 5,55 MBq/µg (Freedlander., 1969). No nosso estudo, alcançamos o melhor rendimento na marcação com 0,74 MBq/µg, o que corresponde à substituição de 0,13 átomos de iodo/molécula, considerando o peso total da quantidade de proteína adicionada na solução. Isso pode ter relação com a disponibilidade de moléculas íntegras presentes na solução antes do início da reação (56,54%) e ao efeito de agregação em algumas dessas moléculas causadas pela CLT, o que pode ter impactado na disponibilidade dos resíduos de tirosina para a integração do isótopo radioativo.

Muitos autores estudaram os efeitos da iodação em várias proteínas e hormônios, chegando a várias conclusões (Hamlin & Arquilla., 1974; Sharp & Pierce.,

1981). Embora parecesse haver um consenso geral em relação à retenção da atividade imunológica do hormônio do crescimento humano e bovino moderadamente iodado (Hunter., 1965; Mattera & Dellacha., 1982), possíveis alterações em sua atividade somatotrópica foram mais difíceis de excluir devido à sensibilidade limitada dos bioensaios. Hughers et al (1982) estudaram as alterações devidas à iodação da lactoperoxidase usando um bioensaio sensível utilizando células Nb2 (Tanaka *et al.*, 1980), relacionado à atividade lactogênica e não somatotrópica, e encontraram perda de bioatividade. Goodman & Levy (1983), usaram dois bioensaios *in vitro* para mostrar que, em níveis moderados de iodação, o hGH manteve a potência total em relação à estimulação da oxidação da glicose e da lipólise. Mattera & Dellacha (1982), mostraram que o hormônio do crescimento bovino iodado, foi quase indistinguível em suas propriedades do hormônio não marcado, quando avaliada a atividade promotora de crescimento corporal, captação pelo fígado de rato *in vivo*, ligação a microsomas de fígado de coelho e interações antígeno-anticorpo primário. Em nosso grupo de pesquisa, Bartolini & Ribela (1986) mostraram que concentrações relativamente altas de CLT e Na₂S₂O₅, altos graus de iodação (até 2,7 átomos/molécula) e efeitos indiretos da radiação não alteraram significativamente a atividade biológica e imunológica da molécula de hGH ou seu raio molecular. Em nosso estudo, para diminuir os impactos causados pela oxidação ou efeitos da radiação, utilizamos uma quantidade reduzida de CLT (10 vezes menos), comparada ao método padronizado por Greenwood & Hunter (1963), uma atividade específica do radioisótopo calculada para conter menos que 1 átomo de iodo/molécula e usamos o produto radiomarcado imediatamente após a sua preparação.

A confirmação da ligação do ¹³¹I-pGH ao GHr, foi realizada através dos ensaios iniciais de biodistribuição, injetando uma dose do radiomarcado em animais selvagens que foram a seguir eutanasiados em diferentes tempos (2,5 e 10 min), para avaliar a taxa de captação nos tecidos. Como esperado, observamos uma presença maior do hormônio marcado nos tecidos dos animais eutanasiados 10 min após a injeção, comparado ao animal eutanasiado 2,5 min após, resultado do tempo em que o hormônio fica disponível no sangue para internalização nos tecidos através da ligação ao receptor, além do metabolismo (Vahl *et al.*, 1997; Flores-Morales *et al.*, 2006). Os tecidos que apresentaram maior diferença entre os grupos foram o fígado, músculo, estômago e bexiga (Figura 19). Curiosamente, no cérebro foi observado um aumento da presença do hormônio marcado no tempo de 2,5 min após a injeção em

comparação com o tempo de 10 min. Os estudos encontrados na literatura mostram que o GH é capaz de acessar rapidamente o LCR a partir da circulação e que as concentrações do hormônio no LCR e no soro estão diretamente correlacionadas (Coculescu *et al.*, 1979; Nicolini *et al.*, 1984). Isso indica que o GH que se difunde da circulação para o LCR, o faz por difusão simples, acompanhando a dinâmica do fluxo sanguíneo no transporte através dos ventrículos. Ao comparar a contagem detectada no sangue e no cérebro em nosso estudo (Figura 20A e B) também observamos uma correlação nos diferentes tempos. Mais estudos são necessários, aumentando o número de amostras e avaliando diferentes tempos de exposição. Nos testes envolvendo injeção intraperitoneal essa correlação não foi observada com clareza.

Para avaliar a importância do GHR no transporte de GH para o SNC, injetamos o ^{131}I -pGH em camundongos knockout para este receptor (GHR $-/-$) e em camundongos controle, com eutanásia no tempo de 45 min após a injeção. Na avaliação da biodistribuição, observamos uma pequena redução na contagem em tecidos como o músculo, nos animais knockout, comparado aos controles. Os níveis do radiomarcado circulante nos animais GHR $-/-$ foram significativamente maiores do que nos controles, possivelmente pela falta de absorção do hormônio pelos tecidos desses animais knockout. Quando avaliamos a contagem no cérebro total (Figura 22B), foi possível observar através do gráfico que houve uma diminuição dos níveis do radiomarcado nos animais GHR $-/-$ comparado aos controles. Ainda, essa redução foi marcadamente maior quando avaliamos separadamente o tecido do hipotálamo (Figura 22C). Apesar disso, essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Esse resultado mostra que o ^{131}I -pGH esteve presente no cérebro total e no tecido do hipotálamo dos animais GHR $-/-$, mas em menor grau comparado aos animais controle, indicando que o GHR pode ser capaz de alterar os níveis de GH presente no cérebro. Essa alteração pode ter duas explicações possíveis, e que ainda podem estar entrelaçadas. Em primeiro lugar, apesar de estar disponível no tecido por difusão passiva, ou seja, por um mecanismo independente do receptor, uma parte do GH que alcança o hipotálamo pode ser proveniente de um transporte ativo promovido pelo GHR. A literatura tem fornecido evidências de que receptores localizados em células especializadas da ME regulam o acesso de hormônios metabólicos como a grelina, leptina e insulina às outras regiões do hipotálamo e que a diminuição nos níveis destes hormônios é acompanhada pela deleção dos receptores nessa região (Jiang *et al.*, 2020; Porniece *et al.*, 2021; Spiezio *et al.*, 2018; Uriarte., 2021). Estudos

com a deleção de GHR em regiões estratégicas podem fornecer mais respostas sobre a atuação deste receptor na entrada do GH no tecido do hipotálamo. Outra possibilidade é que a presença elevada do ^{131}I -pGH nos animais controle comparados aos knockout, seja resultado do acúmulo do radiomarcado dentro dos neurônios, através de uma internalização mediada pelo receptor. Um estudo realizado com a transfecção de hGH em uma linha neuronal de rato, demonstrou que o armazenamento do hormônio dentro das células em vesículas sinápticas foi indistinguível das vesículas sinápticas catecolaminérgicas endógenas. Quando as células foram estimuladas por carbacol ou despolarização direta, elas liberaram norepinefrina e hGH com cinética paralela (Schweitzer & Kelly *et al.*, 1985). Isso significa que o GH dentro dos neurônios pode ser armazenado em vesículas sinápticas para ser liberado após estimulação. Assim, é possível que no nosso estudo o ^{131}I -pGH possa ter se difundido no tecido do hipotálamo de forma intercelular ou sendo conduzido pelo GHR, entrando nas células através da ligação ao receptor e se acumulando em vesículas sinápticas, refletindo no aumento do nível do radiomarcado no tecido do hipotálamo dos animais que expressam o receptor, comparado aos animais knockout. É importante ressaltar que neste experimento, injetamos 30 milhões de CPM (equivalente a 4,9 μg do hormônio), o que pode ter contribuído para um acúmulo aumentado dentro do tecido dos animais.

Comparamos a permeação do pGH radiomarcado no SNC dos animais selvagens, com a albumina radiomarcada (Figura 23). Desta forma, observamos que houve um aumento do pGH, mas não da albumina, no cérebro dos animais ao longo do tempo, indicando que a albumina não foi capaz de permear e se difundir no cérebro dos camundongos. Por causa da interrupção das alças de feedback nos camundongos knockout, esses animais possuem um aumento de 30 vezes do GH sérico (Zhou *et al.*, 1997). Para descartar a possibilidade de que um excesso de GH circulante poderia influenciar nos resultados do nosso estudo, injetamos uma quantidade de pGH radiomarcado com atividade específica de 1 milhão de CPM (equivalente a 0,16 μg do hormônio) em um grupo de animais selvagens e comparamos com os dados obtidos através das injeções de 30 milhões de CPM dos experimentos anteriores. Observamos que a cinética da permeação para o cérebro foi idêntica em ambos os grupos (Figura 24A), indicando que a passagem de GH para o cérebro foi independente da quantidade do hormônio presente na circulação, considerando as quantidades utilizadas nesse trabalho. Isso está de acordo com o

estudo realizado por Pan et al (2005) que demonstrou que o excesso de GH não mostrou modulação aguda do influxo sangue-cérebro. Quando avaliamos separadamente o tecido do hipotálamo, também observamos uma cinética semelhante (Figura 24B).

Nós comparamos a cinética da permeação do pGH da circulação periférica para o SNC de camundongos knockout para o GHr e controle em diferentes tempos de exposição. Não foi possível observar diferença entre os grupos, avaliando o cérebro total (Figura 25A). Quando avaliamos o hipotálamo separadamente, observamos que a curva da linha média foi muito semelhante entre os grupos (Figura 25B), sugerindo, portanto, um transporte independente do receptor. A dose reduzida de pGH (0,16 µg) injetada nos animais desse experimento, comparado ao experimento em que injetamos 4,9 µg do hormônio em animais knockout e controle, com eutanásia no tempo de 45 min após a injeção, pode ter refletido na diferença observada entre o resultado dos experimentos. Quando injetamos 4,9 µg de ¹²³I-pGH, observamos uma contagem marcadamente aumentada no tecido do hipotálamo dos animais controle comparado aos knockout, 45 min após a injeção (Figura 22C). Ao injetar 0,16 µg de ¹²³I-pGH, os animais knockout curiosamente apresentaram uma contagem um pouco maior no tecido do hipotálamo, comparado aos controles 45 min após a injeção (Figura 25B). Sendo assim, é possível que a expressão do GHr seja mais importante para o acúmulo de GH dentro de tecidos do cérebro, como o hipotálamo, do que na difusão do hormônio através do tecido. Isso não exclui a possibilidade de que o hormônio possa ser direcionado para núcleos hipotalâmicos distintos, sendo transportado entre os neurônios.

Que o GH atravessa a BHE e se difunde no parênquima cerebral independente do receptor, está cada vez mais evidente. O que permanece não esclarecido é o caminho percorrido pelo hormônio para alcançar os tecidos do cérebro e quais as regiões envolvidas no percurso de passagem. O GH possui um papel relevante na regulação central do metabolismo (Donato *et al.*, 2021). Estudos anteriores propuseram que a principal via para os hormônios metabólicos entrarem no cérebro seria através da vasculatura cerebral (Banks *et al.*, 1997; Banks *et al.*, 1999). No entanto, evidências recentes indicam que os CVO's, especialmente a ME, localizada no hipotálamo médio basal, contribui fortemente para o acesso de hormônios periféricos, como a leptina, grelina e insulina, para o SNC (Prevot *et al.*, 2018; Balland *et al.*, 2014; Schaeffer *et al.*, 2013; Uriarte *et al.*, 2019; Duquenne *et al.*,

2021; Kumar *et al.*, 2021). Para manter a homeostase, os neurônios hipotalâmicos no ARC devem detectar e integrar dinamicamente uma infinidade de sinais periféricos. As moléculas transmitidas pelo sangue devem, portanto, ser capazes de contornar a vasculatura hermeticamente fechada da BHE para acessar rapidamente seus neurônios alvos. Devemos lembrar que o ARC possui uma BHE intacta, nesse sentido o endotélio fenestrado dos microvasos da ME permite que algumas moléculas atravessem a barreira sangue-hipotálamo. Um estudo realizado por Langlet *et al.* (2013) demonstrou que a diminuição nos níveis de glicose no sangue durante o jejum altera a organização estrutural dessa barreira, resultando no melhor acesso de substratos metabólicos ao ARC. Neste estudo, a capacidade da leptina exógena, um hormônio peptídico de 16 kDa, de acessar os neurônios do ARH foi testada quantificando a fosforilação de STAT3 estimulada pela leptina em camundongos em jejum e alimentados. A leptina induziu um aumento de 30% na imunoreatividade para STAT3 fosforilado (pSTAT3) em camundongos privados de alimento quando comparado a camundongos alimentados. Schaeffer *et al.*, (2013), demonstrou que moléculas com peso molecular entre 20 e 40 kDa, são capazes de atravessar vasos fenestrados na ME, servindo como uma porta de entrada que dá acesso ao hipotálamo e à interface sangue-LCR. Com base nas recentes descobertas sobre a atuação do GH na regulação central do metabolismo e o peso molecular deste hormônio (22 kDa), existe a especulação de que esta pode ser uma região chave para o acesso do GH ao hipotálamo e ao LCR. Para avaliar se a plasticidade da BHE induzida em jejum pode alterar os níveis de GH exógeno no hipotálamo, o que apontaria a ME como uma importante região de passagem deste hormônio, a comparação entre animais injetados com GH em jejum e alimentados, ou a utilização de um inibidor seletivo da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) poderia ser realizado, quantificando a fosforilação de STAT5.

Considerando a possibilidade de que o GH pode ser capaz de atravessar da circulação periférica para o SNC por difusão passiva, extravasando os vasos fenestrados da ME e de outros CVO's, dando acesso direto aos ventrículos e conseqüentemente ao LCR, ainda restaria a dúvida se o GH disponível no LCR seria capaz de se difundir dos ventrículos para o parênquima cerebral dependendo dos receptores localizados no CP ou se seria capaz de se difundir no parênquima cerebral, atravessando o tecido que reveste os ventrículos de forma passiva e permeando o parênquima cerebral de forma intercelular. Os ventrículos são revestidos por células

ependimárias, um tipo de célula de suporte neuronal (neuroglia) que forma o revestimento epitelial dos ventrículos e do canal central da medula espinhal. As células ependimárias nos ventrículos são frouxamente unidas por locais especiais de adesão intercelular chamados desmossomos, que permitem que as células formem uma folha epitelial quase contínua sobre a superfície dos ventrículos e do canal espinhal. Como as junções entre as células ependimárias são frouxas, o LCR é capaz de se difundir dos ventrículos para o SNC. As células que cercam o CP são conectadas por junções apertadas, que impedem o vazamento de substâncias e fluídos dos vasos sanguíneos para o LCR (Rogers., 2018). O GH atua no CP estimulando a produção de LCR (Nyberg., 2000), mas se o GHr expresso no CP, além dessa função, pode contribuir para o transporte de GH do LCR para o parênquima cerebral, ainda não foi esclarecido. Em nosso estudo, utilizamos camundongos knockout global do GHr, ainda assim, fomos capazes de observar que o GH injetado periféricamente esteve presente no tecido do hipotálamo desses animais, o que dá indícios de que se o GH presente nesse tecido foi proveniente do LCR, essa difusão ocorreu de maneira independente do receptor. Estudos com métodos capazes de promover deleção do GHr apenas na região dos ventrículos, poderia esclarecer se o GH injetado intracerebroventricular poderia atravessar dos ventrículos para o parênquima cerebral de forma dependente dos receptores expressos no CP, ou se o GH é capaz de se difundir junto com o LCR permeando entre as células ependimárias.

A importância do GHr na difusão ou acúmulo do GH nos tecidos do SNC também pode estar relacionada com as diferentes vias de internalização do receptor. Os principais sistemas de sinalização ativados por JAK2 em resposta ao GH incluem o STAT5 e vias de quinase regulada por sinal extracelular (ERK) 1 e 2. Os receptores localizados na fração das caveolinas da membrana plasmática acoplam-se preferencialmente à ativação ERK, enquanto aqueles não localizados nesta fração acoplam-se preferencialmente à ativação STAT5 (Yang *et al.*, 2004). Dependendo do contexto celular, a ativação de ERK induzida por GH tem sido associada à proliferação celular e à expressão do gene c-fos. Em culturas de neuroesferas derivadas da zona subgranular do hipocampo, o sistema de sinalização envolvendo ERK tem efeitos proliferativos e antiapoptóticos do GH (Devesa *et al.*, 2014). Os estudos apontam que a caveolina participa do crescimento axonal de neurônios e previne a neurodegeneração de forma direta (Zeng *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). A proteína de membrana clatrina também é capaz de melhorar a neurogênese, mas os seus

efeitos parecem acontecer predominantemente de forma indireta (Vitaliano *et al.*, 2022; Milosevic *et al.*, 2018). Ambas as proteínas de membrana possuem papel intrínseco na neurotransmissão, um processo que transmite sinais de uma célula nervosa para a outra, mas enquanto a forma rápida é independente de clatrina, sendo atribuída muitas vezes à caveolina, a forma lenta é dependente de clatrina (Cambor-Perujo & Kononenko., 2022). Como mencionado anteriormente, nas células endoteliais cerebrais, os poços revestidos por clatrina estão envolvidos na maior parte da transcitose mediada por receptor, enquanto as caveolinas participam da transcitose mediada por adsorção (Mayor & Pagano., 2007). Como visto através da literatura e dos nossos resultados, é improvável que o GH dependa exclusivamente da transcitose através da BHE para alcançar o SNC. É possível que essas proteínas de membrana estejam relacionadas com as diferentes atuações do GH no SNC, como efeitos de neuroproteção e sinalização celular. Para os efeitos de neuroproteção, é mais conveniente que o GH esteja disponível nos tecidos do cérebro de forma rápida, assim como a difusão intercelular. Para efeitos de sinalização celular, onde o GH armazenado em vesículas sinápticas é transportado entre os neurônios, esse mecanismo de transporte pode acontecer de forma dependente da via de internalização. Mais estudos são necessários para compreender se as vias de internalização do GHr interferem no transporte do GH para o SNC, o que poderia ser realizado com a utilização de métodos alternativos como o agente disruptor de caveolas (metil- β -ciclodextrina) ou animais knockout para as diferentes proteínas de membrana. Assim poderíamos avaliar se o acúmulo que observamos em diferentes doses de GH no hipotálamo, foi dependente do tipo de internalização, além de avaliar através de métodos imunohistoquímicos, se o transporte do GH entre os neurônios para núcleos hipotalâmicos distintos e se os efeitos tróficos do GH estão relacionados com a localização do GHr em frações da membrana plasmática contendo as diferentes proteínas de membrana.

Com a finalidade de obter imagem da localização anatômica do GH no cérebro em um determinado tempo de exposição, realizamos um ensaio de SPECT-CT que se mostrou um recurso promissor. Em suma, obtivemos um resultado que revelou a presença do radiomarcado em diversas regiões do cérebro, com maior atividade em regiões como o hipocampo esquerdo, cerebelo e tronco cerebral (Figura 27 e Figura 28). Com relação à atuação do GH nessas regiões, este hormônio produzido localmente regula fisiologicamente o hipocampo, participando da

manutenção das populações celulares e regulando a neuroplasticidade que garante o desempenho cognitivo normal (Juarez-Aguilar *et al.*, 2022) O GH exógeno também é capaz de induzir a plasticidade sináptica e facilitar a transmissão sináptica no hipocampo (Caitlin *et al.*, 2013). Um estudo utilizando tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT), demonstrou que a administração de GH foi capaz de aumentar a atividade metabólica do hipocampo esquerdo em um paciente idoso com distúrbios cognitivos, normalizando o quadro do paciente (Devesa *et al.*, 2018). O GHr é amplamente expresso no cerebelo, especialmente nas células de Purkinje e nas células da camada granular. Em caso de degeneração cerebelar, o GH é capaz de atravessar a BHE, impedindo o progresso da neurodegeneração, além de restaurar as funções motoras (Lincoln *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2020). No tronco cerebral, várias áreas relacionadas à regulação da respiração, incluindo o núcleo do trato solitário, locus ceruleus e as células catecolaminérgicas na medula ventrolateral (região C1) contêm neurônios responsivos ao GH (Furigo *et al.*, 2017, Wasinski *et al.*, 2020, Wasinski *et al.*, 2021). Um estudo avaliando o efeito da ação central do GH na resposta ventilatória à hipóxia em camundongos demonstrou que a ausência de GHr em áreas envolvidas no controle da respiração é suficiente para reduzir a resposta ventilatória taquipneica à hipóxia. Neste caso, os achados deste estudo sugeriram um possível papel secundário da ação do GH (Silva *et al.*, 2022). Devemos considerar que o animal utilizado em nosso estudo, foi eutanasiado através da inalação de um anestésico em um recipiente fechado, o que pode ter influenciado na concentração de ^{123}I -pGH nestas regiões anatômicas. O fato da distribuição do ^{123}I -pGH ser observada predominantemente do lado direito do cérebro não tem uma justificativa fisiológica conhecida, pode ser resultado aleatório decorrente da metodologia utilizada. Outros estudos comparando diferentes métodos de eutanásia precisam ser realizados. Embora o resultado desse ensaio não contribua para o cerne da questão do presente trabalho, este recurso disponível pode ser explorado para responder outras perguntas. Ainda, um método de marcação do GH com flúor-18, permitirá a realização de uma tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET scan), que poderá fornecer imagens dinâmicas da biodistribuição do radiomarcado pelo corpo e entre os tecidos do animal. Adicionando o fator tempo, poderemos obter a localização do hormônio marcado nos momentos iniciais logo após a injeção, acompanhando de forma dinâmica a sua difusão nos tecidos do cérebro, isso possui potencial para

revelar as regiões anatômicas envolvidas no percurso de passagem do GH para o SNC.

8. CONCLUSÕES

Há décadas, muitos pesquisadores que estudam o GH têm levantado em algum momento a questão sobre o mecanismo de transporte do GH da circulação sistêmica para o SNC, sem obterem respostas claras. Na literatura, a hipótese de um sistema de transporte ativo foi testada através de um estudo de saturação, mas a participação do GHR na difusão do hormônio nos tecidos do cérebro ainda permanecia em aberto. No nosso estudo, usamos de forma inédita camundongos knockout para o GHR para avaliar a presença do hormônio radiomarcado no cérebro total e no hipotálamo desses animais. Com base nos dados obtidos, concluímos que a passagem do GH através da BHE é independente do receptor. Também confirmamos que o GH pode se difundir nos tecidos do cérebro, como o hipotálamo, sem a limitação de um transporte mediado pelo receptor. Isso possibilita uma nova concepção sobre o potencial de alcance que o GH tem para acessar os tecidos do cérebro, contribuindo para compreender um pouco mais sobre a ação fisiológica desse hormônio no SNC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, NJ.; RONNBACK, L & HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews of Neuroscience*. v. 7: p. 41-53, 2006.

ABBOTT, NJ.; PATABENDIGE, AA.; DOLMAN, DE.; YUSOF, SR & BEGLEY, DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, v. 37, n. 1, p. 13–25, 2010.

AMTORP, O. Transfer of I125-albumin from blood into brain and cerebrospinal fluid in newborn and juvenile rats. *Acta Physiol Scand*. v. 96, n. 3, p. 399-406, 1976.

ANDREWS, TM.; ANDREWS, WW & BAKER, C. An Investigation into the Removal of Enzymes from Paper Following Conservation Treatment. *Journal of the American Institute for Conservation*, v. 31, n. 3, p. 313–323, 1992.

BANKS, WA.; JASPAN, JB.; HUANG, W & KASTIN, AJ. Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides*, v.18, p. 1423–1429, 1997.

BANKS, WA.; KASTIN, AJ & PAN, W. Uptake and degradation of blood-borne insulin by the olfactory bulb. *Peptides*, v. 20, p. 373–378, 1999.

BANKS, WA. The blood-brain barrier as an endocrine tissue. *Nature Reviews of Endocrinology*, v. 15, n. 8, p. 444-455, 2019.

BALLAND, E.; DAM, J.; LANGLET, F.; CARON, E.; STECULORUM, S.; MESSINA, A.; RASIKA,S.; FALLUEL-MOREL, A.; ANOUAR, Y.; DEHOUCK, B.; TTRINQUET, E.; JOCKERS, R.; BOURET, SG & PREVOT, V. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metabolism*. v. 19, n. 2, p. 293–301, 2014.

BALTAZAE-LARA, R.; ZENIL, JM.; CARRANZA, M.; ÁVILA-MENDOZA, J.; MARTÍNEZ-MORENO, CG.; ARÁMBURA, C & LUNA, M. Growth Hormone (GH) Crosses the Blood-Brain Barrier (BBB) and Induces Neuroprotective Effects in the

Embryonic Chicken Cerebellum after a Hypoxic Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 19, p. 11546, 2022.

BRANDA, CS & DYMECKI, SM. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell*, v. 6, n. 1, p. 7-28, 2004.

BARTOLINI, P & RIBELA, MT. Influence of chloramine T iodination on the biological and immunological activity or the molecular radius of the human growth hormone molecule. *Journal of immunoassay*, v. 7, n. 3, p. 129–138, 1986.

BAUMANN, G.; SHAW, M.; AMBUN, K.; JAN, T .; DAVILA, N.; MERCADO , M.; STOLAR, M & MACCART. Heterogeneity of circulating growth hormone. *Nucl. Med. Biol*, v. 21, p. 369–379, 1994.

BELLINI, MH.; MATHOR, MB.; DE LUCA, M.; CANCEDDA, R & BARTOLINI, P. Ultrasensitive in vivo bioassay detects bioactive human growth hormone in transduced primary human keratinocytes. *Journal of endocrinological investigation*, v. 21, n. 1, p. 1–6, 1998.

BERRYMAN, DE.; LIST, EO.; KOHN, DT.; COSCHIGANO, KT.; SEELEY, RJ & KOPCHICK, JJ. Effect of growth hormone on susceptibility to diet-induced obesity. *Endocrinology*, v. 147, n. 6, p. 2801–2808, 2006.

BERNDT, N.; BERGMANN, R & BACHMANN, M. Radiolabeling and Analysis of Labeled Proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 1853, p. 281–285, 2018.

BIRGE, CA.; PEAKE, GT.; MARIZ, IK & DAUGHADAY, WH. Radioimmunoassayable growth hormone in the rat pituitary gland: effects of age, sex and hormonal state. *Endocrinology*, v. 81, n. 2, p. 195–204, 1967.

BISCAYAT, PL.; PALADINI, AC.; VITA, N & ROGUIN, LP. Preparation of ¹²⁵I-labeled human growth hormone of high quality binding properties endowed with long-term stability. *Journal of immunoassay*, v. 10, n. 1, p. 37-56, 1989.

BRASMJEVIC, I.; RASNJEVIC, I.; STEINBUSCH, HWM.; SCHMITZ, C & MARTÍNEZ-MARTINEZ, P. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. **Prog Neurobiol**, v. 87, 212-51, 2009.

BROWN, LM & CLEGG, DJ. Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, n. 1, p. 65–73, 2010.

BROWN, RS.; WYATT, AK.; HERBISON, RE.; KNOWLS, PJ.; LADYMAN, SR.; BINART, N.; BANKS, WA & GRATTAN, DR. Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 30, n. 2, p. 1002–1010, 2016.

BUCHMAN, M.; Bell, S & Kopchick, JJ. Growth Hormone Discovery and Structure. **Pediatric endocrinology reviews : PER**, 16 (Suppl 1), p. 2–10, 2018.

CABRAL, A.; CORNEJO, MP.; FERNANDEZ, G.; DE FRANCESCO, PN.; GARCIA-ROMERO, G.; URIARTE, M.; ZIGMAN, JM.; PORTIANSKY, E.; REYNALDO, M & PERELLO, M. Circulating ghrelin acts on GABA neurons of the area postrema and mediates gastric emptying in male mice. **Endocrinology**, v. 158, p. 1436–1449, 2017.

CAHILL, CM.; HOLDER, AT.; LAWTON, TL.; BUTCHER, GW & TAUSSIG, MJ. Recognition of porcine growth hormone by a panel of monoclonal antibodies. **Hybridoma**, v. 16, n. 4, p. 371–379, 1997.

CIOFI, P. The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse. **Neurosci. Lett**, n. 487, 187–190, 2011.

COCULESCU, M. Blood-brain barrier for human growth hormone and insulin-like growth factor-I. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, v. 12, n. 2, p. 113–124, 1999.

COCULESCU, M.; SIMIONESCU, L.; CONSTANTINOVICI, A .; LOGIN, SS.; SIMIONESCU, N.; DIMITRIU, V.; OPRESCU, M & GRIGORESCU, F. High level of human growth hormone (HGH) in cerebrospinal fluid patients with pituitary tumors. **Endocrinologie**, v. 17, n. 3, p. 205–211, 1979.

COSCHIGANO, KT.; HOLLAND, AN.; RIDERS, ME.; LIST, EO.; FLYVBJERG, A & KOPCHICK, JJ. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin and IGF-1 levels and increased lifespan. **Endocrinology**, v. 144, p. 3799–3810, 2003.

CONN, EE & STUMPF, PK. Manual de bioquímica. **Sib Paulo, Edgard BIQclwr**, p. 84, 1972.

DEVESA, J.; ALMWINGLÓ, C & DEVES, P. Multiple Effects of Growth Hormone in the Body: Is it Really the Hormone for Growth?. **Clinical medicine insights. Endocrinology and diabetes**, v. 9, p, 47–71, 2016.

DEVESA, J.; NUNEZ, I.; AGRA, C.; BEJARANO, A & DEVESA, P. Treatment with Growth Hormone (GH) Increased the Metabolic Activity of the Brain in an Elder Patient, Not GH-Deficient, Who Suffered Mild Cognitive Alterations and Had an ApoE 4/3 Genotype. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 8, p. 2294, 2018.

DONATO, JJr.; WASINSKI, F.; FURIGO, IC.; METZGER, M.; FRAZAO, R. Central Regulation of Metabolism by Growth Hormone. **Cells**, v. 11, n. 1, p. 129, 2021.

DUQUENNE, M.; FOLGUEIRA, C.; BOUROUH, C., *et al.* Leptin brain entry via a tanycytic LepR–EGFR shuttle controls lipid metabolism and pancreas function. **Nat Metab**, v. 3, p. 1071–1090, 2021.

DURAN-ORTIZ, S.; LIST, EO.; ILENO, Y.; YOUNG, J.; BASU, R.; BELL, S.; MCHUGH, T.; FUNK, K.; MATHES, S.; QIAN, Y.; KULKARNI, P.; YAKAR, S.; BERRYMAN, DE & KOPCHICK, JJ. Growth hormone receptor gene disruption in mature-adult mice improves male insulin sensitivity and extends female lifespan. **Aging Cell**, v. 20, n. 12, p.13506, 2021.

EICHELE, G.; BODENSCHATZ, E .; DITTE, Z .; GUNTHER, AK.; KAPOOR, S .; WANG, Y & WESTENDORF, C. Cilia-driven flows in the brain third ventricle. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, **Biological sciences***, v. 375, p. 1792, 2020.

EGECIOGLU, E.; BJURSELL, M.; LJUNGBERG, A.; DICKSON, SL.; KOPCHICK, JJ.; BERGSTRON, G.; SVERNSSON, L.; OSCARSSON, J.; TORNELL, J & BOHLOOLY, YM. Growth hormone receptor deficiency results in blunted ghrelin feeding response, obesity, and hypolipidemia in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 290, p. 317–325, 2006.

EVANS, HM. & LONG, JA. The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity, and oestrus cycles of the rat. *Anat. Res*, v. 21, p. 62–63, 1921.

FAN, Y.; MENON, RK.; COHEN, P.; HWANG, D.; CLEMENS, T.; DIGIROLAMO, DJ.; KOPCHICK, JJ.; LE ROITH, D.; TRUCCO, M & SPERLING. Liver-specific deletion of the growth hormone receptor reveals essential role of growth hormone signaling in hepatic lipid metabolism. *The Journal of biological chemistry*, v. 284, n. 30, p. 19937–19944, 2009.

FLORES-MORALES, A.; GREENHALDGH, CJ.; NORSTEDT, G & RICO-BAUTISTA, E. Negative regulation of growth hormone receptor signaling. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, v. 20, n. 2, p. 241–253, 2006.

FREDA, PU.; SHEN, W.; HEYMSFIELD, SB.; REYES-VIDAL, CM.; GEER, EB.; BRUCE, JN & GALLAGHER, D. Lower visceral and subcutaneous but higher intermuscular adipose tissue depots in patients with growth hormone and insulin-like growth factor I excess due to acromegaly. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 93, n. 6, p. 2334–2343, 2008.

FREEDLENDER, A. E. Practical and theoretical advantages for the use of I 1 1 5 in radioimmunoassay. In: MARGOULIES, M., ed. *Protein and polypeptide hormones:*

proceedings of the international symposium Liege, May 19-25. **Amsterdam, Excerpta Medica Foundation**, p.351-3. 1969.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, L.; GUERRA, B.; DÍAZ-CHICO, JC & FLORES-MORALES, A. Estrogens regulate the hepatic effects of growth hormone, a hormonal interplay with multiple fates. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, p. 66, 2013.

FEIL, R.; WAGNER, J.; METZGER, D & CHAMBON, P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 237, p. 752–757, 1997.

FRIEDRICH, N.; THUESEN, B .; JORGENSEN, T.; JUUL, A.; SPIELHAGEN, C .; WALLASCHOFKSI, H & LINNEBERG, A. The association between IGF-I and insulin resistance: a general population study in Danish adults. **Diabetes care**, v. 35, n. 4, p. 768–773, 2012.

FURIGO, IC.; METZGER, M.; TEIXEIRA, PD, SPARES, CR & DONATO, JJr. Distribution of growth hormone-responsive cells in the mouse brain. **Brain structure & function**, v. 222, n. 1, p. 341–363, 2017.

FURIGO, IC.; DE SOUZA, GO.; TEIXEIRA, P.; GUADAGNINI, D.; FRAZÃO, R.; LIST, EO.; KOPCHICK, JJ.; PRADA, PO & DONATO, JJr. Growth hormone enhances the recovery of hypoglycemia via ventromedial hypothalamic neurons. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 33, n. 11, p. 11909–11924, 2019a.

FURIGO, IC.; TEIXEIRA, P.; DE SOUZA, GO.; COUTO, G.; ROMERO, GG.; PERELLO, M.; FRAZÃO, R.; ELIAS, LL.; METZGER, M.; LIST, EO.; , JJ & DONATO, JJr. Growth hormone regulates neuroendocrine responses to weight loss via AgRP neurons. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 662, 2019b.

GAHETE, MD.; CORDOBA-CHACON J.; ANADUMAKA CV.; LIN Q.; BRUNING JC.; KAHN CR.; LUQUE RM & KINEMAN, RD. Elevated GH/IGF-I, due to somatotrope-

specific loss of both IGF-I and insulin receptors, alters glucose homeostasis and insulin sensitivity in a diet-dependent manner. *Endocrinology*. 152: 4825-483, 2011.

GANONG, WF. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 27 p. 422-7, 2000.

GAWDI, R.; SHUMWAY, KR.; EMMADY, PD. Physiology, Blood Brain Barrier. *StatPearls. StatPeals publishing*, 2022.

GOODMAN, HM & LEVY, LK. Preparation and biological reactivity of polyiodinated human growth hormone. *Endocrinology*, v. 113, n. 6, p. 2017–2023, 1983.

GROSS, PM & WEINDL, A. Peering through the windows of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 7, p. 663–672, 1987.

GHANAAT, F & TAYEK, J A. Growth hormone administration increases glucose production by preventing the expected decrease in glycogenolysis seen with fasting in healthy volunteers. *Metabolism: clinical and experimental*, v. 54, n. 5, p. 604–609, 2005.

HAINAN, L.; HUILIN, L.; KHAN, MA.; XIN, Z.; YUJIANG, Y.; HUI, Z & NAIQUAN, Y. The basic route of the nuclear translocation porcine growth hormone (GH)-growth hormone receptor (GHR) complex (pGH/GHR) in porcine hepatocytes. *General and comparative endocrinology*, v. 266, p. 101–109, 2018.

HALLABA, E & DROUET, J. 131 I-labelling of human serum albumin by the iodine monochloride and chloramine-T methods. *The International journal of applied radiation and isotopes*, v. 22, n. 1, p. 46–49, 1971.

HALLBERG, M & NYBERG, F. Growth Hormone Receptor in the Brain and their Potential as Therapeutic Targets in Central Nervous System Disorders. *The Open Endocrinology Journal*, v. 6, p. 27-33, 2012.

HAMLIN, JL & ARQUILL, ER. Monoiodoinsulin. Preparation, purification and characterization of a biologically active derivative substituted predominantly on tyrosine A-14. **J.Biol.Chem**, v. 249, p. 21-32, 1974.

HANNA, L.; KAWALEK, TJ.; BEALL, C & ELLACOTT, K. Changes in neuronal activity across the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus in response to low glucose: Evaluation using an extracellular multi-electrode array approach. **Journal of neuroendocrinology**, v. 32, n. 3, p. 12824, 2020.

HANCI, M.; KUDAY, C & OGUZOGLU, SA. The effects of synthetic growth hormone on spinal cord injury. **Journal of neurosurgical sciences**, v. 38, n. 1, p. 43–49, 1994.

HARADA, R.; MORITO, T & YANAI, K. Nihon yakurigaku zasshi. **Folia pharmacologica Japonica**, v. 155, n. 3, p. 159–163, 2020.

HESSELBARTH, N.; PETTINELLI, C.; GERICK, M.; BERGER, C.; KUNATH, A.; STUMVOLL, M.; BLUHER, M & KLOTING, N. Tamoxifen affects glucose and lipid metabolism parameters, causes browning of subcutaneous adipose tissue and transient body composition changes in C57BL/6NTac mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 464, n. 3, p. 724–729, 2015.

HOMMA, H.; KURACHI, H.; NISHIO, Y.; TAKEDA, T.; YAMAMOTO, T & ADACHI, K. Estrogen Suppresses Transcription of Lipoprotein Lipase Gene existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 15, p. 11404–11411, 2000.

HOYDA, TD.; SMITH, PM & Ferguson, AV. Gastrointestinal hormone actions in the central regulation of energy metabolism: potential sensory roles for the circumventricular organs. **International journal of obesity**, v. 33, n 1, p. 16–21, 2009.

HUGHES, JP.; TANAKA, T.; GOUT, PW.; BEER, CT.; NOBLE, RL & FRIESEN, HG. Effect of iodination on human growth hormone and prolactin: characterization by bioassay, radioimmunoassay, radioreceptorassay and electrophoresis. **Endocrinology**, v. 111, p, 827-832, 1982.

HUNTER, WM. Iodination of protein compounds. In: Andrews, G.A., Kinseley, R.M. and Wagner, H.M. eds. *Radioactive Pharmaceuticals. Proceedings of a Oak Ridge Symposium, Nov.1-4. A.E.C. Symposium Series, USAEC*, :245-264, 1965.

ILONDO, MM.; VANDERSCHUEREN-LODEWEYCHX, M.; COURTOY, PJ & MEYTS, DP. Cellular processing of growth hormone in IM-9 cells: evidence for exocytosis of internalized hormone. *Endocrinology*, v. 130, n. 4, p. 2037–2044, 1992.

INDRA, AK. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic acids research*, v. 27, p. 4324–4327, 1999.

JAHN, HM.; KASAKOW, CV.; HELFER, A.; MICHELY, J.; VERKHRASKY, A.; MAUER, HH.; SCHELLER, A & KIRCHHOFF, F. Refined protocols of tamoxifen injection for inducible DNA recombination in mouse astroglia. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 5913, 2018.

JEONG, JK.; DOW, SA & YOUNG, CN. Sensory Circumventricular Organs, Neuroendocrine Control, and Metabolic Regulation. *Metabolites*, v. 11, n. 8, p. 494, 2021.

JIANG, H.; GALLET, S.; KLEMM, P.; SCHOLL, P.; FOLZ-DONAHUE, K.; ALTMULLER, J.; ALBER, J.; HEILINGER, C.; KUKAT, C & LOYENS, A. MCH Neurons Regulate Permeability of the Median Eminence Barrier. *Neuron*, v. 107, p. 306–319, 2020.

JUNNILA, RK.; DURAN-ORTIZ, S.; SUER, O.; SUSTARSIC, EG.; BERRYMAN, DE & LIST, EO Disruption of the GH Receptor Gene in Adult Mice Increases Maximal Lifespan in Females. *Endocrinology*, v. 157, n. 12, p. 4502-13, 2016.

JUAREZ-AGUILAR, E.; OLIVARES-HERNANDEZ, JD.; REGALADO-SANTIAGO, C & GARCIA-GARCIA, F. The role of growth hormone in hippocampal function. ***Vitamins and hormones***, v. 118, p. 289–313, 2022.

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, N.; HARA, K.; UEKI, K & TOBE, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. ***The Journal of clinical investigation***, v. 116, n. 7, p. 1784–1792, 2006.

KAMALINIA, G.; KHODAGHOLI, F.; SHAERZADEH, F.; TAVSSOLIAN, F.; CHAHARBAND, F.; ATYABI, F.; SHARIFZADEH, M.; AMINI, M & DINARVAND, R. Cationic albumin-conjugated chelating agent as a novel brain drug delivery system in neurodegeneration. ***Chemical biology & drug design***, v. 86, n. 5, p. 1203–1214, 2015.

KHALFALLAH, Y.; SASSOLAS, G.; BORSON-CHAZOT, F.; VEGA, N & VIDAL, H. Expression of insulin target genes in skeletal muscle and adipose tissue in adult patients with growth hormone deficiency: effect of one year recombinant human growth hormone therapy. ***The Journal of endocrinology***, v. 171, n. 2, p. 285–292, 2001.

KALRA, SP.; DUBE, MG.; PU, S.; XU, B.; HORVANTH, TL.; KALRA, PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. ***Endocr Rev***, v. 20, p. 68-100, 1999.

KETTERER, B.; RANDLE, PJ & YOUNG, FG. The pituitary growth hormone and metabolic processes. *Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen ***Pharmakologie****, v. 49, p. 127–211, 1957.

KERKHOF, PV.; SSANCHSE, M.; KLUMPERMAN, J & STROUS, GJ. Growth hormone receptor ubiquitination coincides with recruitment to clathrin-coated membrane domains. ***The Journal of biological chemistry***, v. 276, n. 6, p. 3778–3784, 2001.

KOCH, L.; WUNDERLICH, FT.; SEIBLER, J.; KONNER, AC.; HAMPEL, B.; IRLBUSCH, S.; BRABANT, G.; KAHN, CR.; SCHWENK, F & BRUNING, JC. Central insulin action regulates peripheral glucose and fat metabolism in mice. ***The Journal of clinical investigation***, v. 118, n. 6, p. 2132–2147. 2008.

KROHN, K.; SHERMAN, L & WELCH, M. Studies on radioiodinated fibrinogen. I. Physicochemical properties of the IC1, chloramine-T, and electrolytic reaction products. ***Biochim. biophys. Acta***, v. 2, p. 404-13, 1972.

KHODR, CR.; CLARK, S.; BOKOV, AF.; RICHARDSIB, A.; STRONG, R.; HURLEY, DL & PHELPS, CJ. Early postnatal administration of growth hormone increases tuberoinfundibular dopaminergic neuron numbers in Ames dwarf mice. ***Endocrinology***, v. 151, n. 7, p. 3277–3285, 2010.

KUMAR, PM.; CREMER, AL.; KLEMM, P.; STEUERNAGEL, L.; SUNDARAM, S.; JAIS, A.; HAUSEN, AC.; TAO, J.; SECHER, A.; PEDERSEN, TA.; SCHWANINGER, M.; WUNDERLICJ, FT.; LOWEKK, BB.; BACKERS, H & BRUNING, JC. Insulin signalling in tanycytes gates hypothalamic insulin uptake and regulation of AgRP neuron activity. ***Nature metabolism***, v. 3, n. 12, p. 1662–1679, 2021.

LAPAGLIA, N.; STEINER, J.; KIRSTEINS, L.; EMANUELE, M & EMANUELE, N. Leptin alters the response of the growth hormone releasing factor- growth hormone–insulin-like growth factor-I axis to fasting. ***J Endocrinol***, v. 159, p. 79-83, 1998.

LI, CJ & DIXON, JS. Human pituitary growth hormone. 32. The primary structure of the hormone. ***Archives of biochemistry and biophysics***, v. 146, n. 1, p. 233-236, 1971.

LI, Y.; KNAPP, JR & KOPCHICK, JJ. Enlargement of interscapular brown adipose tissue in growth hormone antagonist transgenic and in growth hormone receptor gene-disrupted dwarf mice. ***Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)***, v. 228, n. 2, p. 207–215, 2003.

LIMA, JB.; DEBARBA, LK.; KHAN, M.; UBAH, C.; DIDYUK, IA.; KOCK, M & SADAGURSKI, M. Growth hormone receptor (GHR)-expressing neurons in the hypothalamic arcuate nucleus regulate glucose metabolism and energy homeostasis. *BioRxiv*, 2020.

LINCOLN, DT.; EL-HIFNAWI, E.; SINOWATZ, F & WATERS, MJ Immunohistochemical localization of growth hormone receptor binding protein in the mammalian cerebellum. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, v. 176, n. 5, p. 419–427, 1994.

LIST, EO.; BERRYMAN, DE.; FUNK, K.; JARA, A.; KELDER, B & WANG, F. Liver-specific GH receptor gene-disrupted (LiGHRKO) mice have decreased endocrine IGF-I, increased local IGF-I, and altered body size, body composition, and adipokine profiles. *Endocrinology*, v.155, n. 5, p. 1793-805, 2014.

LOBIE, PE.; SADIR, R.; GRAICHEN, R.; MERTANI, HC & MOREL, G. Caveolar internalization of growth hormone. *Experimental cell research*, v. 246, n. 1, p. 47–55, 1999.

LOCH-NECKEL, G & KOEPP, J. La barrera hematoencefalica y la administracion de medicamentos en el sistema nervioso central [The blood-brain barrier and drug delivery in the central nervous system]. *Revista de neurologia*, v. 51, n. 3, p. 165–174, 2010.

LONGO, KA.; BERRYMAN, DE.; KELDER, B.; CHAROENTHONGTRAKUL, S.; DISTEFANO, PS.; GEDDES, BJ & KOPCHICK, JJ. Daily energy balance in growth hormone receptor/binding protein (GHR $-/-$) gene-disrupted mice is achieved through an increase in dark-phase energy efficiency. *Growth Horm IGF Res*, v. 20, p. 73–79, 2010.

MATTERA, R & DELLACHA, JM. Biological and immunological characterization of iodinated bovine growth hormone. *International journal of peptide and protein research*, v. 19, n. 2, p. 181-6, 1982.

MATTERA, R.; TURNYN, D .; FERRINDEZ, HN & DELLACHA, JM. *Int. J. Peptide Protein Res. in press*, 1982.

MEINKE, G.; BOHM, A.; HAUBER, J.; PISABARRO, MT.; BUCHHOLZ, F. Cre Recombinase and Other Tyrosine Recombinases. *Chem Rev.*, v. 11, n. 20, p. 12785-12820, 2016.

MOLLER, N & JORGENSEN, JO. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocrine reviews*, v. 30, n. 2, p. 152–177, 2009.

MOLERO-CONEJO, E.; MORALES, LM.; FERNANDEZ, V.; RALEIGH, X.; CASANOVA, A.; CONNELL, L.; GOMNEZ, ME.; RYDER, E.; & CAMPOS, G. Serum insulin, leptin and growth hormone levels are associated with body mass index and obesity index in adolescents. *Arch Latinoam Nutr*, v. 56, p. 29-35, 2006.

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

NASS, R.; TOOGOOD, AA.; HELLMANN, P.; BISSONETTE, E.; GAYLINN, B.; CLARK, R & THORNER, MO. Intracerebroventricular administration of the rat growth hormone (GH) receptor antagonist G118R stimulates GH secretion: evidence for the existence of short loop negative feedback of GH. *Journal of neuroendocrinology*, v. 12, n. 12, p. 1194–1199, 2000a.

NASS, R .; GILRAIN, J.; ANDERSON, S.; GAYLINN, B.; DALKIN, A.; DAY, R.; PERUGGIA, M & THORNER, MO. High plasma growth hormone (GH) levels inhibit expression of GH secretagogue receptor messenger ribonucleic acid levels in the rat pituitary. *Endocrinology*, v. 141, n. 6, p. 2084–2089, 2000b.

NICOLINI, A.; BUONAGUIDI, R.; FERDEGHINI, M & CARPI, A. Relationship between the circulating levels of adenohipophyseal hormones in blood and in cerebrospinal fluid. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, v. 47, n. 7, p. 710–714, 1984.

NOGUEIRAS, R.; TSCHOP, MH & ZIGMAN, JM. Central nervous system regulation of energy metabolism: ghrelin versus leptin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1126, p. 14–19, 2008.

NYBERG, F & BURMAN, P. Growth hormone and its receptors in the central nervous system--location and functional significance. *Hormone research*, v. 45, n. 2, p. 18–22, 1996.

NYBERG, F. Growth hormone in the brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. *Front Neuroendocrinol*, n. 21, p. 330–348, 2000.

O'NEIL, KT.; HOESS, RH.; DEGRADO, WF. Design of DNA-binding peptides based on the leucine zipper motif. *Science*, v. 249, n. 4970, p. 774-778, 1990.

PANICI, JA.; WANG, F.; BONKOWSKI, MS.; SPONG, A.; BARTKE, A.; PAWLIKOWSKA, L.; KWOK, PY & MASTERNAK, MM. Is altered expression of hepatic insulin-related genes in growth hormone receptor knockout mice due to GH resistance or a difference in biological life spans? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v. 64, p. 1126–1133, 2009.

PARK, J.; Ha, DJ.; SEO, GH.; MAENG, S.; KANG, SM.; KIM, S & Lee, JE. Empty Sella Syndrome Associated with Growth Hormone Deficiency: the First Case Report of Weiss-Kruszka Syndrome. *Journal of Korean medical science*, v. 36, n. 18, p. 133, 2021.

PATEL, R.; PAGE, S & AL-AHMAD, AJ. Isogenic blood-brain barrier models based on patient-derived stem cells display inter-individual differences in cell maturation and functionality. *Journal of neurochemistry*, v. 142, n. 1, p. 74–88, 2017.

PAXINOS, G & WATSON, C. THE RAT BRAIN IN STEREOTAXIC COORDINATES. *Elsevier Inc. 7th Edition*, 2007.

PEDROSO, J.; DOS SANTOS, L.; FURIGO, IC.; SPAGNOL, AR.; WASINSKI, F.; LIST, EO.; KOPCHICK, JJ & DONATO, JJ. edroso, J., Dos Santos, L., Furigo, I. C., Spagnol, A. R., Wasinski, F., List, E. O., Kopchick, J. J., & Donato, J., Jr (). Deletion of growth hormone receptor in hypothalamic neurons affects the adaptation capacity to aerobic exercise. **Peptides**, v. 135, p. 170426, 2021.

PERRET-VIVANCO, C.; ABBATE, A.; ARDAIL, D.; RACCURT, M.; USSON, Y.; LOBIE, PE & MOREL, G. Growth hormone activity in mitochondria depends on GH receptor Box 1 and involves caveolar pathway targeting. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 3, p. 215-232, 2006.

PERONI, CN.; HAYASHIDA, CY.; NASCIMENTO, N.; LONGUINI, VC.; RODRIGO, TA.; BARTOLINI, P.; BOWERS, CY & TOLEDO, SPA. Growth hormone response to growth hormone-deficient Little Mice. **Clinics**, v. 67, n. 3, p. 265-272, 2012.

PORNIECE, KM.; CREMER, AL.; KLEMN, P.; STEUERNAGEL, L.; SUNDARAM, S.; JAIS, A.; HAUSEN, AC.; TAO, J.; SECHER, A.; PEDERSEN, TA.; SCHWANINGER, M.; WUNDERLICH, FT.; LOWELL, BB.; BACKERS, H & BRUNING, JC. Insulin signalling in tanycytes gates hypothalamic insulin uptake and regulation of AgRP neuron activity. **Nature metabolism**, v. 3, n.12, p. 1662–1679, 2021.

POSTEL-VINAY, MC & FINIDORI, J. Growth hormone receptor: structure and signal transduction. **European journal of endocrinology**, v. 133, n.6, p. 654–659, 1995.

PREVOT, V.; DEHOUCK, B.; SHARIF, A.; CIOFI, P.; GIACOBINI, P & CLASADONTE, J. The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. **Endocrine reviews**, v. 39, n. 3, p. 333–368, 2018.

QUARESMA, P.; TEIXEIRA, P.; FURIGO, IC.; WASINSKI, F.; COUTO, GC.; FRAZÃO, R.; LIST, EO.; KOPCHICK, JJ & DONATO, JJ. Growth hormone/STAT5 signaling in proopiomelanocortin neurons regulates glucoprivic hyperphagia. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 498, p. 110574, 2019.

QIU, H.; YANG, JK & CHEN, C. Influence of insulin on growth hormone secretion, level and growth hormone signalling. *Sheng li xue bao. Acta physiologica Sinica*, v. 69, n. 5, p. 541–556. 2017.

ROGERS, K. *ependymal cell*. *Encyclopedia Britannica*. (2018, December 5). <<https://www.britannica.com/science/ependymal-cell>>. Acesso em: 17 de Agosto de 2022.

SAHA, GB.; *Fundamental of Nuclear Pharmacy*. 5nd ed. **Springer-Verlag; New York**. 2004.

SCHERRMANN, JM. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. ***Vascular pharmacology***, v. 38, n. 6, p. 349–354, 2002.

SCHWIETZER, ES & KELLY, RB. Selective packaging of human growth hormone into synaptic vesicles in a rat neuronal (PC12) cell line. ***The Journal of cell biology***, v. 101, n. 2, p. 667–676, 1985.

SHARP, SB & PIERCE, JC. Doubly radioiodinated luteinizing hormone: preparation and characterization. ***Endocrinology***, v. 109, p. 1052-1060, 1981.

SILVA, TM.; WASINSKI, F.; FLOR, KC.; LIST, EO.; KOPCHICK, JJ.; TAKAKURA, AC.; DONATO, JJ & MOREIRA, TS. The effect of central growth hormone action on hypoxia ventilatory response in conscious mice. ***Brain research***, v. 1791, p. 147995, 2022.

SMITH, P & FERGUSON, A. Metabolic Signaling to the Central Nervous System: Routes Across the Blood Brain Barrier. ***Curr. Pharm***, v. 20, p. 1392–1399, 2014.

SPIEZIO, DIA.; SANDIN, ES.; DORE, R.; MULLER-FIELITZ, H.; STORCK, SE.; BERNAU, M.; MIER, W.; OSTER, H.; JOHREN, O.; PIETRZIK, CU.; LEHNERT, H & SCWANINGER, M. The LepR-mediated leptin transport across brain barriers controls food reward. ***Molecular metabolism***, v. 8, p. 13–22, 2018.

SCHAEFFER, M.; LANGLET, F.; LAFONT, C.; MOLINO, F.; HODSON, DJ.; ROUX, T.; LAMARQUE, L.; VERDIE, P.; BOURRIER, E.; DEHOUCK, B.; BANERES, JL.; MARTINEZ, J.; MERY, PF.; MARIE, J.; TTRINQUET, E.; FEHRENTZ, JA.; PREVOT, V & MOLLARD, P. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, v. 110, n. 4, p. 1512–1517, 2013.

SCHNITZER, JE & OH, P. Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. ***The Journal of biological chemistry***, v. 269, n. 8, p. 6072–6082, 1994.

SJOGREN, K.; BOHLOOLY-Y, M.; OLSSON, B.; COSCHIGANO, K.; TORNELL, J.; MOHAN, S.; ISAKSSON, OG.; BAUMANN, G, KOPCHICK, J OHLSSON, C. Disproportional skeletal growth and markedly decreased bone mineral content in growth hormone receptor -/- mice. ***Biochemical and biophysical research communications***, v. 267, n. 2, p. 603–608, 2000.

SILVA, TM.; WASINSKI, F.; FLOR, KC.; LIST, EO.; KOPCHICK, JJ.; TAKAKURA, AC.; DONATO, JJ & MOREIRA, TS. The effect of central growth hormone action on hypoxia ventilatory response in conscious mice. ***Brain research***, v. 1791, p. 147995, 2022.

TANAKA, T.; SHIU, RPC.; GOUT, PW.; BEER, CT.; NOBLE, RL & FRIESEM, HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. ***J. Clin. Endocrinol. Metab.*** v. 51, p. 1058-1063, 1980.

TEIXEIRA, P.; COUTO, GC.; FURIGO, IC.; LIST, EO.; KOPCHICK, JJ & DONATO, JJ. Central growth hormone action regulates metabolism during pregnancy. ***American journal of physiology. Endocrinology and metabolism***, v. 317, n. 5, p. 925–940, 2019.

MAYOR, S & PAGANO, RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. ***Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*** v. 8, p. 603–612, 2007.

MEINKE, G.; BOHM, A.; HAUBER, J.; PISABARRO, MT.; BUCHHOLZ, F. Cre Recombinase and Other Tyrosine Recombinases. **Chem Ver**, v. 116, n. 20, p. 12785-12820, 2016.

MENEZES, A.; SUZUKI, MF.; OLIVEIRA, JE.; RIBELA, M.; FURIGO, IC.; DONATO JJr; BARTOLINI, P & SOARES, C. (). Expression, purification and characterization of the authentic form of human growth hormone receptor antagonist G120R-hGH obtained in Escherichia coli periplasmic space. **Protein expression and purification**, v. 131, p. 91–100, 2017.

MORITA, S.; FURUBE, E.; MANNARI, T.; OKUDA, H.; TATSUMI, K.; WANAKA, A & MIYATA, S. Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. **Cell and tissue research**, v. 363, n. 2, p. 497–511, 2016.

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

NISHAD, R.; MUKHI, D.; RAM K.; ANI, KM & PASUPULATI. Growth Hormone and Metabolic Homeostasis. **EMJ Diabet**, v. 6, n. 1, p. 78-87, 2018.

NORMAN, N & TURTER, AR. Radioimmunoassay studies with human growth hormone and • pituitary lipid mobilizing factor. **Acta endocr. (Copenh)**, v. 6, n. 3, p. 316-38, Jun, 1968

NYBERG, F & HALLBERG, M. Growth hormone and cognitive function. Nature reviews. **Endocrinology**, v. 9, n. 6, p. 357–365, 2013.

ROTH, J.; GLICK, SM.; YALOW, RS & BERSONSA. Hypoglycemia: a potent stimulus to secretion of growth hormone. **Science**, v.140, p. 987 – 998, 1963.

SAUER, B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. **Methods**, v. 14, n. 4, p. 381-392, 1998.

SAUER, B & HENDERSON, N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 85, n.14, p. 5166-5170, 1988.

SCHAEFFER, M.; LANGLET, F.; LAFONT, C.; MOLINO, F.; HODSON, DJ.; ROUX, T.; LAMARQUE, L.; VERDI'E.; BOURRIER, E.; DEHOUCK, B.; BAN'ERES, JL.; MARTINEZ, J.; M'ERV, PF.; MARIE, J.; TRINQUET, E.; FEHRENTZ, JA.; PR'EVOT, V & MOLLARD, P. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am*, v. 110, p. 1512–1517, 2013.

SHARMA, VM.; VESTERGAARD, ET.; JESSE, N.; KOLIND-THOMSEN, P.; NELLEMAN, B.; NIELSEN, TS.; VENDELBO, MH.; MOLLER, N.; SHARMA, R.; LEE, KY.; KOPCHICK, JJ.; JORGENSEN, J & PURI, V. Growth hormone acts along the PPAR γ -FSP27 axis to stimulate lipolysis in human adipocytes. American journal of physiology. *Endocrinology and metabolism*, v. 316, n. 1, p. 34–42, 2019.

STERNBERG, N.; AUSTIN, S.; HAMILTON, D & YARMOLINSKY, M. Analysis of bacteriophage P1 immunity by using lambda-P1 recombinants constructed in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 75, n. 11, p. 5594- 5598, 1978.

STEYN, FJ.; TOLLE, V.; Chen, C & EPELBAUM, J. Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion. *Comprehensive Physiology*, v. 6, n .2, p. 687–735, 2016.

TAJES, M.; RAMOS-FERNANDEZ, E.; WENG-JIANG, X.; BOSCH-MORATÓ, M.; GUIVERNAU, B .; ERASO-PICHOT, A.; SALVADOR, B.; FERNANDEZ-BUSQUETA, X.; ROQUER, J & MUNOZ, FJ. The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Molecular membrane biology*, v. 31, n. 5, p. 152–167, 2014.

TARA, M.; SOUZA, SC.; ARONOVITZ, M.; OBIN, MS.; FRIED, SK & GREENBERG, AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning evidence of genomic and

non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. ***Journal of Biological Chemistry***, v. 280, n. 43, p. 35983–35991, 2005.

TERAN, E.; CHESNER, J & RAPAPORT, R. Growth and growth hormone: An overview. ***Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society***, v. 28, p. 3–5, 2016.

TORODOV, MI.; PAETZOLD, JC.; SCHOPPE, O.; TETTEH, G.; SHIT, S.; EFREMOV, V.; TORODOV-VOLGYI, K.; DURING, M.; DICHGANS, M.; PIRAUD, M.; MENZE, B & ERTURK, A. Machine learning analysis of whole mouse brain vasculature. ***Nature methods***, v. 17, n. 4, p. 442–449, 2020.

TUGGLE, CK & TRENKLE, A Control of growth hormone synthesis. ***Domest. Anim. Endocrinol***, v. 13, p. 1–33, 1996.

URIARTE, M.; FRANCESCO, DePN.; FERNANDEZ, G.; CABRAL, A.; CASTROGIOVANNI, D.; LALONDE, T.; LUYT, LG.; TREJO, S & PERELLO, M. Evidence Supporting a Role for the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Transporting Circulating Ghrelin into the Brain. ***Molecular neurobiology***, v. 56, n. 6, p. 4120–4134, 2019.

URIARTE, M.; FRANCESCO, DePN.; FERNANDEZ, G.; CASTROGIOVANNI, D.; D'AARCANGELO, M.; MBERNON, M.; CANTEL, S.; DENOYELLE, S.; FEHRENTZ, JA.; PRAETORIUS, J.; PREVOT, V & PERELLO, M. Circulating ghrelin crosses the blood-cerebrospinal fluid barrier via growth hormone secretagogue receptor dependent and independent mechanisms. ***Molecular and cellular endocrinology***, v. 538, p. 111449, 2021.

VAHL, N.; MOLLER, N.; LAURITZEN, T.; CHRISTIANSEN, JS & JORGENSEN, JO. Metabolic effects and pharmacokinetics of a growth hormone pulse in healthy adults: relation to age, sex, and body composition. ***The Journal of clinical endocrinology and metabolism***, v. 82, n. 11, p. 3612–3618, 1997.

VENKEN, K.; MOVERARE-SKRTIC, S.; KOPCHICK, JJ.; COSCHIGANO, KT.; OHLSSON, C.; BOONEN, S.; BOUILLON, R & VANDERSCHUEREN, D. Impact of androgens, growth hormone, and IGF-I on bone and muscle in male mice during puberty. ***J Bone Miner Res***, v. 22, p. 72–82, 2007.

WADE, GN & HELLER, HW. Tamoxifen mimics the effects of estradiol on food intake, body weight, and body composition in rats. ***American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology***, v. 264, n. 6, p. 1219–R1223, 1993.

WASINSKI, F.; PEDROSO, J.; DOS SANTOS, WO. .; FURIGO, IC. .; GARCIA-GALIANO, D.; ELIAS, CF.; LIST, EO.;KOPCHICK, JJ.; SZAWKA, RE & DONATO, JJr. Tyrosine Hydroxylase Neurons Regulate Growth Hormone Secretion via Short-Loop Negative Feedback. ***The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience***, v. 40, n. 22, p. 4309–4322, 2020.

WASINSKI, F.; BARRIELE, F.; PEDROSO, J.; QUARESMA, P.; DOS SANTOS, WO.; LIST, EO.; KOPCHICK, JJ.; PERELLÓ, M & DONATO, JJ. Ghrelin-induced Food Intake, but not GH Secretion, Requires the Expression of the GH Receptor in the Brain of Male Mice. ***Endocrinology***, v. 162, n. 7, p. 97, 2021.

WASINSKI, F.; CHAVES, FM.; PEDROSO, J.; MANSANO, NS.; CAMPOREZ, JP.; GUSMÃO, DO.; LIST, EO.; KOPCHICK, JJ.; FRAZÃO, R.; SZAWKA, RE & DONATO, JJ. Growth hormone receptor in dopaminergic neurones regulates stress-induced prolactin release in male mice. ***Journal of neuroendocrinology***, v. 33, n. 3, p. 12957, 2021.

WASINSKI, F.; FURIGO, IC.; TEIXEIRA, PDS.; RAMOS-LOBO, AM.; PERONI, CN.; BARTOLINI, P.; LIST, EO.; KOPCHICK, JJ & DONATO, JJ. Growth Hormone Receptor Deletion Reduces the Density of Axonal Projections from Hypothalamic Arcuate Nucleus Neurons. ***Neuroscience***, v. 10, n. 434, p. 136-147, 2020.

WATERS MJ & BROOKS AJ. JAK2 activation by growth hormone and other cytokines. *Biochem J*, v. 466, n. 1, p. 1 – 11, 2015.

WASS, JA & REDDY, R. Growth hormone and memory. *The Journal of endocrinology*, v. 207, n. 2, p. 125–126, 2010.

WEINDL, A & SOFRONIEW, MV. Relation of neuropeptides to mammalian circumventricular organs. *Adv Biochem Psychopharmacol*, v. 28, p. 303–320, 1981.

WINKLER, B.; STEELE, R.; ALTSZULER, N & DEBODO, RC. EFFECT OF GROWTH HORMONE ON FREE FATTY ACID METABOLISM. *The American journal of physiology*, v. 206, p. 174–178, 1964.

WINKLER, T.; SHARMA, HS.; STALBERG, E.; BADGAIYAN, RD.; WESTEMAN, J, & NYBERG, F. Growth hormone attenuates alterations in spinal cord evoked potentials and cell injury following trauma to the rat spinal cord. An experimental study using topical application of rat growth hormone. *Amino acids*, v. 19, n. 1, p. 363–371, 2000.

WONG, AO.; ZHOU, H.; JIANG, Y & KO, WK. Feedback regulation of growth hormone synthesis and secretion in fish and the emerging concept of intrapituitary feedback loop. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, v. 144, p. 284–305, 2006.

WU, S.; LIU, K.; CHENG, W.; SU,S, LIN, Y.; LIN, T.; CHENG, Y.; CHANG, J.; WU, Y & LIU, C. Growth hormone rescue cerebellar degeneration in SCA3 transgenic mice. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 529, n. 2, p. 467–473, 2020.

VAIDYANATHAN, G & ZALUTSKY, MR. The Radiopharmaceutical Chemistry of the Radioisotopes of Iodine. In: Lewis, J., Windhorst, A., Zeglis, B. *Radiopharmaceutical Chemistry. Springer, Cham*, v. 978, n. 3, p.122, 2019.

VIJAYAKUMARI, A.; YAKAR, S & LEROITH, D. The intricate role of growth hormone in metabolism. *Frontiers in endocrinology*, v. 2, p. 32, 2011.

YAMADA, A.; TRABOULSI, A.; DITTERT, L & HUSSAIN, AA. Chloramine-T in radiolabeling techniques. III. Radioiodination of biomolecules containing thioether groups. *Analytical biochemistry*, v. 277, n. 2, p. 232–235, 2000.

YIN, W & GORE, AC. The hypothalamic median eminence and its role in reproductive aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1204, p. 113–122, 2010.

VANDER, WCM.; SAENZ, C.; YAO, J.; CORREIA, SS & GOOSENS, KA. Restoration of hippocampal growth hormone reverses stress-induced hippocampal impairment. *Frontiers in behavioral neuroscience*, v. 7, p. 66, 2013.

VRTACNIK, P.; OSTANEK, B.; MENCEJ-BEDRAC, S.; MARC, J. The many faces of estrogen signaling. *Biochemia Medica*, v. 24, n. 3, p. 329–342, 2014.

ZHAO, TL.; LIANG, G.; LI, RL.; XIE, X.; SLEEMAN, MW.; MURPHY, AJ.; VALENZUELA, DM.; YANCOPOULOS, GD.; GOLDSTEIN, JL & BROWN, MS. Ghrelin Oacyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 107, p. 7467- 7472, 2010.

ZHAO, L.; WANG, B.; GOMEZ, NA.; DE AVILA, JM.; ZHU, MJ & DU, M. Even a low dose of tamoxifen profoundly induces adipose tissue browning in female mice. *Int J Obes (Lond)*, v. 44, n. 1, p. 226-234, 2020.

ZHOU, Y.; XU, BC.; MAHESHWARI, HG.; HE, L.; REED, M.; LOZYKOWSKI, M.; OKADA, S.; CATALDO, L.; COSCHIGAMO, K.; WAGNER, TE.; BAUMANN, G. & KOPCHICK, JJ. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 94, p. 13215–13220, 1997.

ZHOU, H.; KO, WK.; HO, WK., STOJILKOVIC, SS & Wong, A. O. Novel aspects of growth hormone (GH) autoregulation: GH-induced GH gene expression in grass carp pituitary cells through autocrine/paracrine mechanisms. *Endocrinology*, v. 145, n. 10, p. 4615–4628, 2004.

