FACULDADE PROMOVE DE TECNOLOGIA - FPT
THIAGO NOGUEIRA TOLENTINO BARBOSA

OPTOGENÉTICA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA A OBESIDADE: UM ESTUDO DE NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS

BELO HORIZONTE (MG)
2016

THIAGO NOGUEIRA TOLENTINO BARBOSA

OPTOGENÉTICA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA A OBESIDADE: UM ESTUDO DE NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS

Dissertação apresentada à Faculdade Promove de Tecnologia - FPT, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Tecnologia da Informação Aplicada à Biologia Computacional, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luiz Alexandre V. Magno

Orientador

BELO HORIZONTE (MG)

2016

THIAGO NOGUEIRA TOLENTINO BARBOSA

OPTOGENÉTICA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA A OBESIDADE: UM ESTUDO DE NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS

Dissertação apresentada à Faculdade Promove de Tecnologia - FPT, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Tecnologia da Informação Aplicada à Biologia Computacional, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luiz Alexandre V. Magno - FIT

Orientador

Prof. Dr. Vitor Bortolo de Rezende –

INSTITUTO HERMES PARDINI

Prof.ª Dr.ª Fabiana Alves – FIT

BELO HORIZONTE (MG)

2016

Ao meu Pai, Mãe, Avós e minha esposa Juliana

pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai por todos os conselhos e ensinamentos.
À minha mãe por todos os valores que me foram passados.
À minha avó Ruth, por todo o exemplo de força, superação, honestidade
e educação que foi me ensinado.
À minha tia Sheila por sempre ter me apoiado.
À minha esposa Juliana por sempre estar ao meu lado.
Ao orientador Prof. Dr. Luiz Alexandre V. Magno pelas valiosas considerações e orientações.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS i
LISTA DE TABELAS ii
RESUMO iii
ABSTRACT iv
1. INTRODUÇÃO 11
1.1 Obesidade 11
1.2 Hipotálamo 13
1.3 Controle do comportamento alimentar pelo hipotálamo 15
1.3.1. Neurocircuitos hipotalâmicos que regulam o apetite 17
1.3.2. Núcleo arqueado (ARC) 20
1.3.3. Núcleo paraventricular (PVN) 22
1.3.4. Núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) 23
1.3.5. Núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) 23
1.3.6. Área hipotalâmica lateral (LHA) 23
1.4 Intervenção terapêutica na obesidade: presente e futuro 23
1.5 Optogenética 26
1.5.1. Construção gênica para o método Optogenético 28
1.5.2. Experimentos Optogenéticos 30
1.6 Simuladores 31
1.7 Ferramenta online para simulação 32
1.7.1 Banco de Dados 32
1.7.2 Sistema Gerenciador de Banco de dados 33
1.7.3 MySQL 33
1.7.4 Linguagem de Programação 33
1.7.5 PHP Hypertext Preprocessor - PHP 33
1.7.6 HyperText Markup Language - HTML 34
1.7.7 Cascading Style Sheet - CSS 34
1.7.8 JavaScript 34
2. OBJETIVOS 35
2.1 Objetivo Geral 35

2.2 Objetivos Específicos 35
3. MATERIAIS E MÉTODOS 36
3.1 Revisão da literatura sobre o controle do comportamento alimentar pelo hipotálamo 36
3.2 Revisão da literatura sobre o método optogenético 37
3.3 Construção de ferramenta online para simulação da técnica de optogenética ...41
4. RESULTADOS 43
4.1 Estratégias de intervenção 43
4.2 Excitação com optogenética 44
4.3 Inibição com optogenética 46
4.4 Resultados Esperados 48
4.4.1. Estratégia 1 - Estimulação dos neurônios POMC/CART 48
4.4.2. Estratégia 2 - Inibição do neurônio NPY/AGRP 50
4.4.3. Estratégia 3 - Utilização da estratégia 1 e 2 em conjunto 51
4.5 Simulador Online 53
5. DISCUSSÃO 58
5.1 Estratégia 1 - Estimulação do neurônio POMC/CART 58
5.2 Estratégia 2 - Inibição do neurônio NPY/AGRP 60
5.3 Estratégia 3 - Utilização da estratégia 1 e 2 em conjunto 60
5.4 Impacto das estratégias 61
5.5 Simulador 64
6. CONCLUSÃO 66
REFERÊNCIAS 68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução de indicadores de peso feita por sexo, na população brasileira adulta, entre os anos de 2006 e 2014..... 11
Figura 2 – Localização do Hipotálamo através do plano mediano e plano transverso..... 13
Figura 3 - Hipotálamo - Zonas Nucleares..... 13
Figura 4 – Núcleos do hipotálamo..... 14
Figura 5 – Sistema simplificado de recepção, integração e saída de sinal. 16
Figura 6 – Hipotálamo: Centro de fome e Centro de saciedade..... 17
Figura 7 – Esquema do circuito hipotalâmico de saciedade..... 18
Figura 8 – Neurocircuito hipotalâmico envolvido na regulação da fome e saciedade. 19
Figura 9 - Mecanismos conhecidos de sinalização alimentar..... 22
Figura 10 - Camundongo ob/ob desprovidos de receptores de leptina à esquerda e camundongo sem a mutação a direita..... 25
Figura 11 – Estimulação Ótica. 31
Figura 12 – Construção gênica, utilizada no método Optogenético 28
Figura 13 – S*tep Function Opsins (SFO)*. 44
Figura 14 – Cinética e atributos espectrais de variantes bacteriorodopsina, halordopsinas e canalrodopsina. 48
Figura 15 – Página Inicial. 54
Figura 16 – Técnica da optogenética. 54
Figura 17 – Descrição do simulador. 55
Figura 18 – Área de Colaboração. 55
Figura 19 – Simulador. 56
Figura 20 – Tela de Resultados. 57
Figura 21 – Continuação da Tela de Resultados. 57
Figura 22 – Visão esquemática de receptores orexígenos e anorexígenos no hipotálamo. 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Neuropeptídios e Hormônios que influenciam os centros da fome e da saciedade do Hipotálamo 20
Tabela 2 – Características das Populações de neurônios utilizadas nas simulações. 37
Tabela 3 – Características dos Promotores selecionados para compor o banco de dados..... 38
Tabela 4 – Características das opsinas escolhidas para a simulação. 39
Tabela 5 – Características dos genes de Proteina Fluorescente levados em consideração para a simulação. 39
Tabela 6 – Características dos tipos de Vírus selecionados. 40

RESUMO

BARBOSA, T.N.T. **Optogenética como estratégia terapêutica para a obesidade: um estudo de núcleos hipotalâmicos.** 2016. Dissertação (Mestrado) – FACULDADE PROMOVE DE TECNOLOGIA – FPT. Belo Horizonte-MG, 2016.

A obesidade tem como característica o acumulo excessivo de gordura corporal, sendo considerada um dos principais problemas de saúde pública que a humanidade enfrentará no século XXI. Nesse contexto, o uso de novas técnicas para o tratamento de doenças está cada dia mais comum. Uma técnica que vem sendo estudada, e pode ser utilizada no tratamento de doenças, é a optogenética, que consiste na inserção (transfecção) de genes, derivados de algas e bactérias, em células alvos de organismos de outra espécie, para um possível controle de atividades de circuitos neurais específicos, com alta precisão. Este trabalho tem por objetivo discutir estratégias teóricas de estimulação/inibição optogenética para tratar a obesidade e simular o procedimento, através de um simulador digital. Isso se dará a partir de estudos secundários, provenientes de revisão da literatura nas principais bases de dados e bibliotecas especializadas. Ainda como propósito desse trabalho, pretende-se otimizar as pesquisas sobre optogenética, para que seja possível, apresentar resultados sobre a utilização de métodos para o tratamento da obesidade em seres vivos, e disponibilizar uma ferramenta *online* que permita uma simulação de estratégias optogenéticas e efeitos biológicos teóricos. O presente estudo aborda ainda a disseminação de informação sobre os problemas de saúde pública, e como a tecnologia da informação pode ser capaz de ajudar no combate a distúrbios alimentares. Espera-se, ainda, que seja fortalecida a utilização da tecnologia da informação no combate a problemas de saúde pública.

Palavras-chave: “Obesidade”, “Optogenética”, “Simuladores”, ”Hipotálamo”, “Opsinas” e “Núcleos Hipotalâmicos”.

ABSTRACT

BARBOSA, T.N.T. **Optogenética como estratégia terapêutica para a obesidade: um estudo de núcleos hipotalâmicos.** 2016. Dissertação (Mestrado) – FACULDADE PROMOVE DE TECNOLOGIA – FPT. Belo Horizonte-MG, 2016.

Obesity is a chronic disease characterized by body fat, which is one of the most serious health problems that humanity is to face in the 21st century. In this context, the use of new techniques in disease treatment has become more common. Optogenetics is a technique that has been studied and may be used in disease treatment; such technique consists of insertion (transfection) of genes, derivatives of algae and bacteria in target cells of organisms of other species so as to potentially control neural circuit activities with high precision. This paper aims to discuss theoretical strategies of stimulation/inhibition optogenetics in order to treat obesity and simulate the procedure, through digital simulator based on secondary studies arising from revision literature in the main databases and specialized libraries. Another purpose of this paper is to optimize the researches about optogenetics in order to present results concerning the use of methods for obesity treatment and make available an online tool to simulate the optogenetics strategies and theoretical biological effects. This study covers the dissemination of public health problems and how information technology may fight against eating disorders. It is still expected that the use of information technology in tackling health problems may be strengthened.

Keywords: “Obesity”, “optogenetics”, “simulators”, “hypothalamus”, “opsins” and “hypothalamic nuclei”.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Segundo a Organização Mundial da Saúde (1993), a obesidade tem como característica o acumulo excessivo de gordura corporal, sendo considerada um dos principais problemas de saúde pública que a humanidade enfrentará no século XXI. Assim como outros distúrbios alimentares, tais como anorexia nervosa e a bulimia nervosa, a obesidade é um dos componentes de síndromes metabólicas e comportamentais, cujas características têm sido estudadas nos últimos anos em virtude da crescente prevalência na sociedade contemporânea.

Um estudo feito pela Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) em 2014, divulgado pelo Ministério da Saúde em 2015, e disponibilizado pelo site “globo.com”, revela que um elevado índice de brasileiros estão acima do peso no país (52,5%) (Figura 1, a seguir) e destes, 17,9% são obesos, reforçando o quão alarmante é este problema de saúde para a população.

Figura 1 – Evolução de indicadores de peso feita por sexo, na população brasileira adulta, entre os anos de 2006 e 2014.

Disponível em: <http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2015/04/excesso-de-peso-atinge-525-dos-brasileiros-segundo-pesquisa-vigitel.html > Acesso em: 02 de março de 2016.

A obesidade está presente em todas as regiões do Brasil, podendo ocasionar uma série de problemas à saúde, como a hipertensão, o diabetes, e a dislipidemia. (SANTOS, 2007).

Existem vários fatores que estão relacionados a obesidade, os quais são complexos e podem envolver mecanismos biológicos, ambientais e neuropsicológicos. Alguns mecanismos cerebrais envolvidos no controle da saciedade e as mudanças na disponibilidade dos alimentos são sugeridos como principais responsáveis pelo excesso no consumo de alimentos (BERTHOUD, 2007).

O organismo humano apresenta diversas etapas durante o seu desenvolvimento, sendo o resultado de diferentes interações entre o legado genético de seus pais e familiares, o seu ambiente socioeconômico, cultural, individual e familiar, determinando por exemplo, as características peculiares de saúde e nutrição que distinguem uma pessoa de outra (CZEPIELEWSKI, 2001).

Como resultado de diversas dessas interações, tem se a obesidade se destacando nos aspectos genéticos, ambientais e comportamentais. Como exemplo, tem se, que os filhos de pais obesos apresentam um grande risco de obesidade, e em paralelo, algumas mudanças sociais podem estimular o aumento de peso em um grupo de pessoas (FREIRE, 2005).

Apesar da relevância dessas interações, o ganho de peso está relacionado ao aumento do ganho calórico e através da ingestão de alimentos e uma redução de gasto energético. Outro ponto relevante, é o aumento de ingesta calórica que está relacionado diretamente com o aumento da quantidade de alimentos ingeridos ou de alterações na sua qualidade, resultando em ganho de peso. “Já o gasto energético, pode estar relacionado a questões genéticas e comportamentais, ou ainda ser dependente de distúrbios endócrinos, incluindo doenças nas quais a obesidade é decorrente de distúrbios neuro-hormonais” (CZEPIELEWSKI, 2001), por exemplo, hipotireoidismo, síndrome de *Cushing*.

1.2 Hipotálamo

O hipotálamo “é uma estrutura cerebral localizada sob o tálamo em uma subdivisão encefálica conhecida por diencéfalo” (LENT, 2010). Na figura 2, “é apresentado o hipotálamo (em azul) e algumas estruturas vizinhas a ele, que podem ser localizados no plano mediano (A) ou na base do encéfalo com o tronco encefálico seccionado (B)” (LENT, 2010). O hipotálamo “ocupa um volume relativamente pequeno, mas possui um grande número de agrupamentos neuronais distintos” (LENT, 2010). Anatomicamente, o hipotálamo pode ser dividido em zonas, regiões e núcleos. As zonas são compostas por periventricular, mediais e laterais como mostra LENT (2010) (Figura 3).

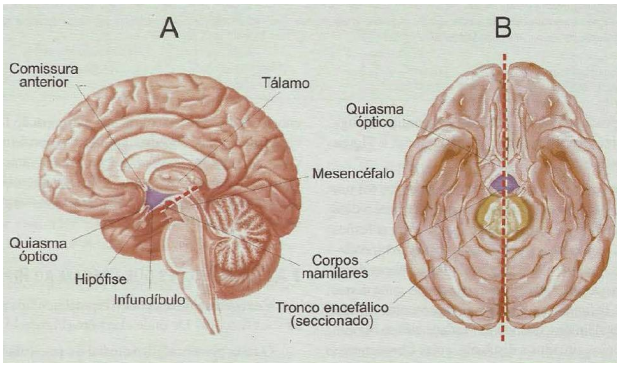

Figura 2 – Localização do Hipotálamo através do plano mediano e plano transverso. O plano mediano de corte do encéfalo é apontado pela linha tracejada em B, e o plano transverso de corte do tronco encefálico é mostrado pela linha tracejada em A.

Fonte: LENT (2010).

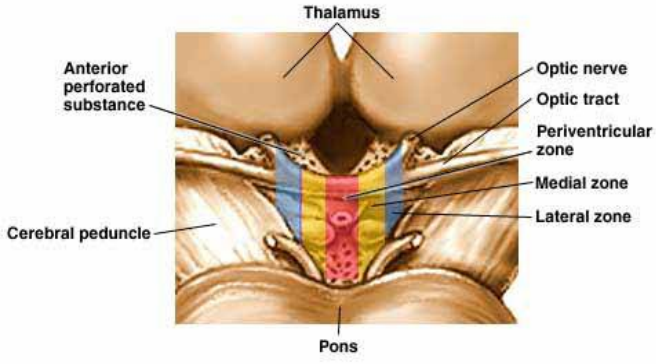

Figura 3 – Hipotálamo – Zonas Nucleares.

Disponível em: <http://www.brainviews.com/abFiles/DrwNuczones.htm> Acesso em: 11 de outubro de 2015.

Em relação às regiões, quatro são as mais citadas: anterior, pré-óptica, tuberal e posterior. “Essas regiões, por sua vez, são constituídas por numerosos núcleos cuja identificação é complicada até mesmo para os histologistas experientes” (LENT, 2010).

Ainda segundo LENT (2010) “A multiplicidade das conexões que o hipotálamo estabelece com outras regiões faz com que ele participe, inevitavelmente, de inúmeras funções”. Os núcleos podem ser agrupados com base em suas localizações nas zonas e regiões do hipotálamo. Aqui, será dado destaque aos núcleos que, segundo estudos relatados por LENT (2010), estão relacionados com funções reguladoras do apetite e saciedade, o que servirá de base para a compreensão das estratégias teóricas de intervenção terapêutica na obesidade. São eles: Núcleo Arqueado (ARC), Núcleo Ventromedial (VMN), Núcleo Ventrolateral (VLN).

A Figura 4, a seguir, demonstra o conjunto complexo de núcleos que o hipotálamo possui, e suas relações com as zonas. As características desses núcleos serão discutidas nos tópicos a seguir.

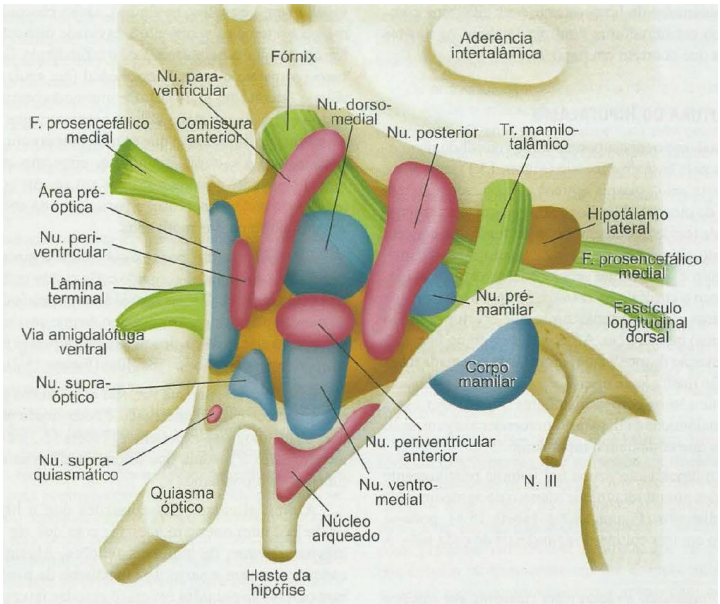

Figura 4 – Núcleos do hipotálamo. Os núcleos em vermelho fazem parte da zona periventricular, aqueles em azul constituem a zona medial, e a grande área em marrom é a zona lateral.

Fonte: LENT (2010).

1.3 Controle do comportamento alimentar pelo hipotálamo

Conforme Damiani et al., (2010), “o hipotálamo é um dos sítios funcionais da integração nutricional, recebendo informações que se originam em órgãos periféricos a partir de metabólitos, hormônios e outros peptídeos circulantes”. O hipotálamo é “referido como o *“guardião do portão”* da sinalização do apetite pois recebe *inputs* do cérebro e da periferia” (LANDEIRO; QUARANTINI, 2011).

Dessa forma, o controle hipotalâmico do apetite é um mecanismo complexo e está ligado não somente ao cérebro, mas a sistemas e sinais periféricos do trato gastrointestinal e depósitos de gordura que atuam via circuitos neuroendócrinos, autonômicos (HEISLER et al., 2007).

Conforme Dougherty, (2012), “muitas evidências sugerem que o desequilíbrio dos mecanismos de saciedade e apetite, característico de obesos, pode ser explicado a partir de alterações de vias neuronais que controlam a homeostase calórica”. Uma delas é a hipótese “*depletion-repletion*” (DOUGHERTY, 2012).

Essa hipótese é baseada na ideia de que cada indivíduo possui um ponto de ajustamento calórico específico, compatível com seu gasto energético, e a todo instante, diversos “sinais” são enviados ao cérebro sobre o estado calórico atual. Estas podem ser consideradas como pontos desejados, a ingestão alimentar e o gasto energético são modificados para chegar a estes pontos. (DOUGHERTY, 2012).

Por exemplo, “cobaias expostas a um período de restrição ou imposição alimentar (gavagem) passarão a expressar uma alimentação hipercompensatória (hiperfagia[1]) ou hipofágica[2], respectivamente, quando retornados à alimentação” (DOUGHERTY, 2012).

Acredita-se que o ponto de ajuste calórico do indivíduo obeso esteja aumentado desnecessariamente, sendo interessante a descoberta de estratégias

[1] Aumento anormal do apetite ou ingestão excessiva de alimentos.

que sejam capazes de reverter essa condição para evitar o sobrepeso.

O hipotálamo funciona como um sistema de processamento de sinais biológicos contendo: “recepção de sinal – integração – saída do sinal” (DAMIANI et al., 2010). Isso é demonstrado na figura 5, na qual é apresentado, “um sistema de recepção de sinal (input) proveniente dos vários sensores periféricos, a integração do sinal, analisando as ações adequadas àquele “input” e comando para alguma ação frente aos sinais recebidos” (DAMIANI et al., 2010).

Pesquisas relatadas por Dougherty, (2012), demostram que lesões bilaterais da região do hipotálamo ventromedial (VMH) produzem uma condição de hiperfagia, sendo que os animais, que sofreram essas lesões tornaram-se extremamente obesos. Por outro lado, as lesões bilaterais do hipotálamo ventrolateral (VLH) produziram uma condição anoréxica.

O pressuposto desses experimentos foi o de que há centros de alimentação e saciedade específicos: o centro de alimentação foi o VLH e o centro da saciedade foi o VMH (Figura 6).

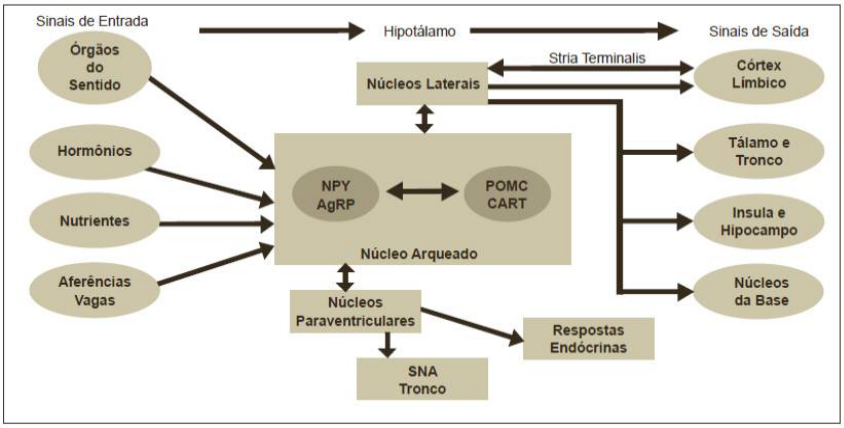

Figura 5 – Sistema simplificado de recepção, integração e saída de sinal.
Fonte: Damiani et al., (2010).

[2] Redução da ingestão de alimentos.

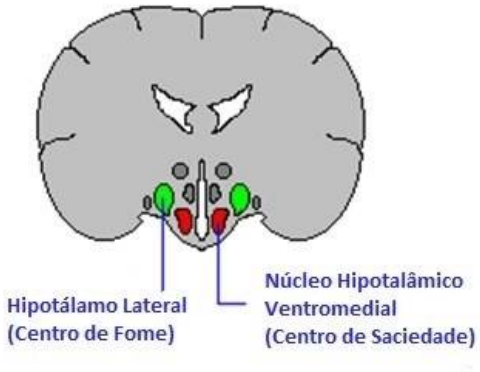

Figura 6 – Hipotálamo: Centro de fome e Centro de saciedade.
Disponível em: <http://www.diabesity.eu/honours.htm> Acesso em: 20 de dezembro de 2015.

Embora a hipótese de que há centros de alimentação e saciedade específicos tenha se mostrado útil, os neurocircuitos relacionados com a saciedade, na verdade, são mais complexos, daí a importância de se estudar núcleos e não regiões. Repetições mais recentes dos estudos de lesões de regiões anteriores mostraram que, de fato, animais com lesões no VMH não comem continuamente sem limite, nem os animais com lesões no VLH necessariamente morrem de fome, e em vez disso, os animais lesionados no VMH comem excessivamente até chegarem a ponto de ajustamento calórico específico, e ao atingirem este ponto, eles reduzem a sua ingesta calórica para manter este novo ponto de ajuste. Da mesma forma, uma vez que os animais com VLH lesionado cheguem a um novo nível com peso corporal menor, eles voltam a comer o suficiente para manter este novo peso inferior (DOUGHERTY, 2012).

Logo, a saciedade e alimentação são processos de equilíbrio entre grandes grupos de vias neuroquímicas, que finalmente governam o tom relativo entre os sinais de saciedade e apetite.

1.3.1. Neurocircuitos hipotalâmicos que regulam o apetite

A principal maneira conhecida de entrada de sinais que regulam o apetite no hipotálamo ocorre a partir do nervo vago, através de sinapses no núcleo do trato solitário (NTS) e área postrema, bem como entradas a partir dos núcleos da rafe

(DOUGHERTY, 2012). Essas entradas ascendem no feixe medial do prosencéfalo em direção ao núcleo paraventricular (PVN) e a área hipotalâmica lateral (LHA). Esse sinal chega ao núcleo arqueado (ARC), que projeta para a LHA, núcleo ventromedial (VMH), bem como para o PVN e núcleo dorsomedial (DMH), e então o núcleo PVN retorna entradas para o ARC, bem como para o VMH e LHA. “Não há interconexões diretas entre o VMH e LHA, sendo necessária a participação do DMH” (DOUGHERTY, 2012) (Figura 7).

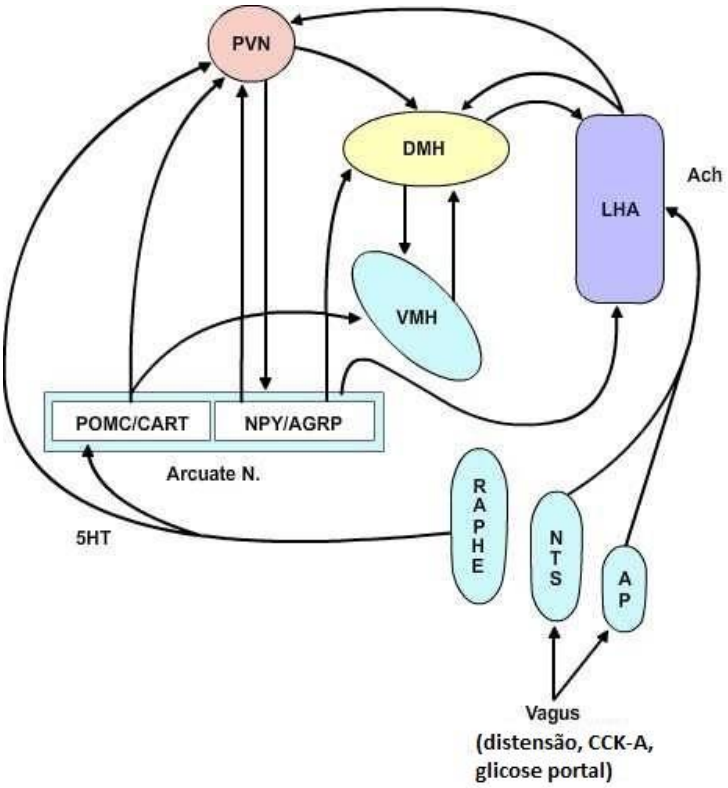

Figura 7 – Esquema do circuito hipotalâmico de saciedade.
Fonte: Dougherty (2012).

Vários peptídeos estão envolvidos na regulação desse neurocircuito hipotalâmico que regulam o apetite/saciedade e massa corporal. Alguns deles são apresentados na Figura 8, que mostra o neurocircuito hipotalâmico envolvido na regulação da fome e saciedade. Esses neuropetídeos podem se originar tanto localmente quanto a partir de órgãos fora do SNC. Eles podem ser classificados, com base em seus efeitos comportamentais, em: **orexígenos**, que promovem a alimentação e aumento da massa corporal (Tabela 1), ou como peptídeos

anorexígenos, que causam saciedade (Tabela 1).

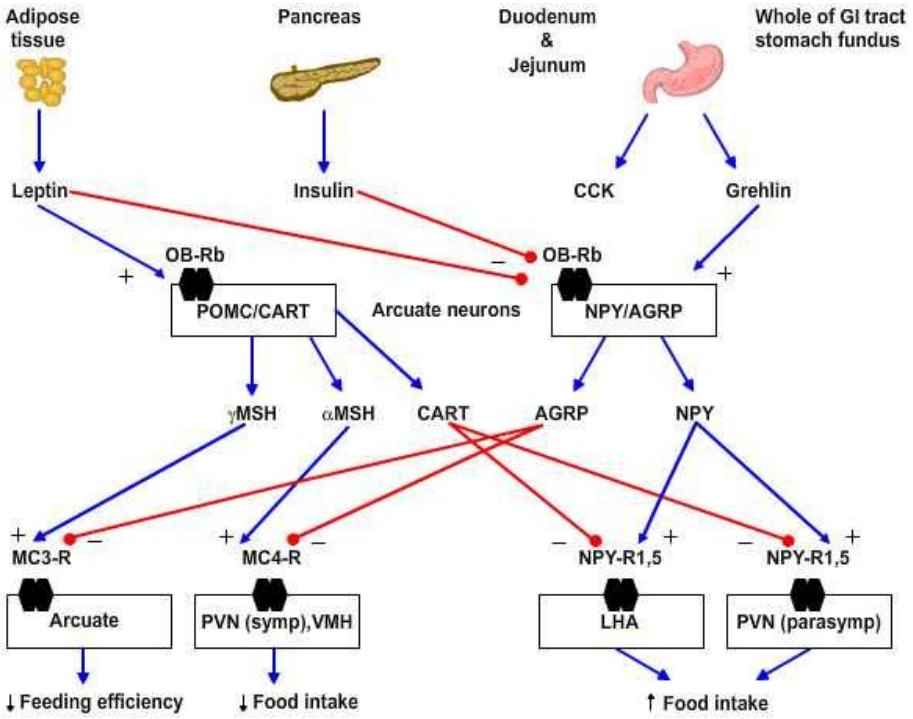

Figura 8 – Neurocircuito hipotalâmico envolvido na regulação da fome e saciedade.
Fonte: Dougherty (2012).

Peptídeos orexígenos incluem o neuropeptídeo Y (NPY), *agouti-related protein* (AGRP), a grelina, hormônio concentrador de melanina (MCH), orexina e galanina. Os neurônios que expressam o NPY também expressam receptores de insulina e leptina, assim eles também respondem aos sinais humorais derivados de plasma. AGRP é um antagonista de peptídeos anorexígenos, pois ele bloqueia os receptores MC3 e MC4 dos hormônios γ-MSH e α-MSH, respectivamente (DOUGHERTY, 2012).

Os principais peptídeos anorexígenos são o hormônio estimulante de melanócitos (α-MSH), leptina, insulina, somatostatina, hormônio liberador de corticotrofina (CRH), colecistocinina (CCK), o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), os peptídeos do tipo glucagon 1 e 2 (GLP-1, GLP-2) e o peptídeo de liberação da prolactina (PrlRP).

A expressão desses peptídeos reduz na privação de alimento e, quando

diminuídos, aumenta o ganho de peso (DOUGHERTY, 2012). Por exemplo, o CRH e POMC estão aumentados no PVN e ARC, respectivamente, em animais submetidos a gavagem (DOUGHERTY, 2012).

Tabela 1 – Neuropeptídios e Hormônios que influenciam os centros da fome e da saciedade do Hipotálamo

Peptídeo	Função
Neuropeptídeo Y (NPY)	Aumento da Ingestão de Alimentos (Orexígeno)
Peptídeo relacionado ao gene agouti (AGRP)	Aumento da Ingestão de Alimentos (Orexígeno)
Grelina	Aumento da Ingestão de Alimentos (Orexígeno)
Hormônio concentrador de Melanina	Aumento da Ingestão de Alimentos (Orexígeno)
Orexina	Aumento da Ingestão de Alimentos (Orexígeno)
Galanina	Aumento da Ingestão de Alimentos (Orexígeno)
Melanócitos (α-MSH)	Redução da Ingestão de Alimentos (Anorexígeno)
Leptina	Redução da Ingestão de Alimentos (Anorexígeno)
Pró-opiomelanocortina (POMC)	Redução da Ingestão de Alimentos (Anorexígeno)
Insulina	Redução da Ingestão de Alimentos (Anorexígeno)
Somatostatina	Redução da Ingestão de Alimentos (Anorexígeno)
Hormônio liberador de Corticotrofina (CRH)	Redução da Ingestão de Alimentos (Anorexígeno)
Colecistocinina (CCK)	Redução da Ingestão de Alimentos (Anorexígeno)
O transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART)	Redução da Ingestão de Alimentos (Anorexígeno)
Peptídeos do tipo glucagon 1 e 2 (GLP-1, GLP-2)	Redução da Ingestão de Alimentos (Anorexígeno)
Peptídeo de liberação da prolactina (PrlRP)	Redução da Ingestão de Alimentos (Anorexígeno)

Fonte: Adaptado Guyton; Hall (2006)

1.3.2. Núcleo arqueado (ARC)

A maioria dos neurônios que expressam o NPY está localizada no ARC, o qual vem sendo considerado elemento chave para a regulação do apetite (HEISLER, 2007; WARD, 2008). “Em ratos, lesões no ARC resultaram em

obesidade e hiperfagia" (HEISLER, 2007; WARD, 2008). Esse núcleo possui várias populações de neurônios, incluindo neurônios neuroendócrinos, de projeção central e outros. Os neurônios neuroendócrinos do ARC são dopaminérgicos ou liberadores de GRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), exercem ação sobre a hipófise, regulando a liberação de prolactina e GH (hormônio do crescimento), e não estão estritamente relacionados com o comportamento alimentar.

O núcleo arqueado possui neurônios capazes de sintetizar diferentes neuropeptídeos, sendo alguns deles inibidores do apetite, ou seja, anorexígenos, e outros orexígenos (LENT, 2010).

Os neuropetídeos liberados pelos neurônios orexígenos do ARC são o **NPY**, **AGRP** e **GABA**, os quais estão localizados na parte ventromedial do ARC, projetando-se para o LH e PVN. Por este motivo, essa subpopulação neuronal é denominada NPY/AGRP/GABA ou apenas **NPY/AGRP**. "Esses neurônios são inibidos pela leptina, insulina, peptídeo YY e por MSH, logo o seu silenciamento constitui um importante alvo da ação anorexigênica" (DAMIANI et al., 2010).

Os neurônios de projeção central do ARC com ação anorexigênica liberam **MSH** e **CART** e são conhecidos como **POMC/CART**.

O POMC é precursor de vários peptídeos, como por exemplo o α-MSH ou *melanotan* II (MTII), os quais atuam em receptores melanocortina (especialmente o tipo 4 – MC4R) induzindo então a sensação de saciedade (DAMIANI et al., 2010).

Os neurônios POMC/CART têm projeções generalizadas para muitas áreas do cérebro, incluindo muitos núcleos hipotalâmicos. Esses neurônios são ativados por leptina e insulina. Interessantemente, neurônios POMC/CART são diretamente inervados e inibidos pelos neurônios NPY/AGRP, o que produz efeito orexigênico (RODRIGUES et al., 2003).

Conforme Damiani et al., (2010), "os neurônios NPY/AgRP de um lado e POMC/CART de outro, funcionariam como um sistema de "acelerador – freio" para a

ingesta alimentar". Além do efeito difuso de NPY e AgRP sobre outras subpopulações neuronais no hipotálamo, os neurônios NPY/AgRP também secretam GABA, o que acaba por impedir os neurônios anorexígenos do ARC de secretar POMC e CART, e consequente produção de α-MSH. "Na ausência de inibição, os neurônios POMC/CART favorecem a saciedade" (Figura 9).

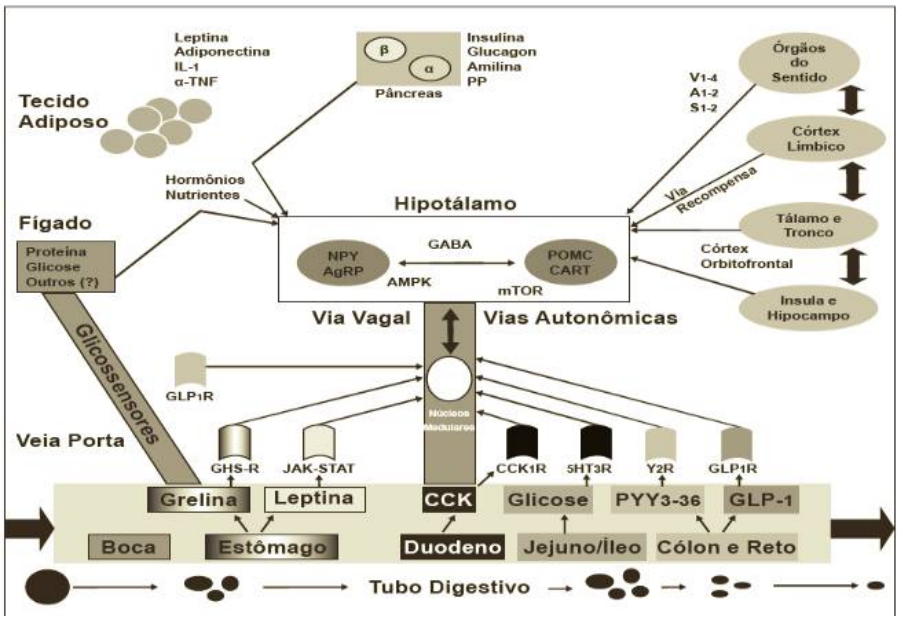

Figura 9 - Mecanismos conhecidos de sinalização alimentar. Os núcleos hipotalâmicos estão interconectados: AMPK tem função orexígena (estimuladora do núcleo NPY/AgRP), sendo inibido pela ação da insulina, glicose e leptina. Já o mTOR constitui-se num sensor do estado metabólico do organismo, sendo um estimulador anorexígeno (estimuladores do núcleo POMC/CART). AMPK – quinase ativada por AMP cíclico; NPY – neuropeptídeo Y; AgRP – proteína relacionada ao Agouti; POMC – próopio melanocortina; CART – transcritos relacionados a cocaína e anfetamina.

Fonte: Damiani et al., 2010.

1.3.3. Núcleo paraventricular (PVN)

O PVN é adjacente à parte superior do terceiro ventrículo no hipotálamo anterior, sendo o principal local de liberação de CRH e TRH. Inúmeras vias neuronais envolvidas no equilíbrio energético convergem no PVN, incluindo as principais projeções de neurônios NPY/AgRP do ARC, MSH, derivados de α-MSH e galantina. Assim, o PVN desempenha um papel na integração de sinais nutricionais com a tireoide e do eixo hipotalâmico-pituitário (NEARY; BLOOM; STEPHEN, 2004).

1.3.4. Núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH)

Conforme Crossman, Neary (2011), “o VMH, como a área hipotalâmica lateral, está relacionado ao controle da ingestão de líquidos e alimentos”. “Esse núcleo é igualado ao centro da saciedade fisiologicamente definido, e as lesões neste local causam aumento anormal da ingestão alimentar” (CROSSMAN, NEARY, 2011). “A estimulação do VMH causa total saciedade, ou seja, o animal recusa-se a comer mesmo na presença de alimentos apetitosos” (MACHADO, 2000).

1.3.5. Núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH)

Segundo Crossman, Neary (2011), na parte dorsal do hipotálamo, situam-se o DMH e o núcleo mamilar medial, sendo que este último localiza-se no corpo mamilar (CROSSMAN, NEARY, 2011). “O DMH liga-se ao córtex pré-frontal e sistema límbico” (MACHADO, 2000). “Lesões ou estimulações do VMH e núcleos anteriores do tálamo já foram correlacionadas com alterações da reatividade emocional em humanos e roedores” (MACHADO, 2000).

1.3.6. Área hipotalâmica lateral (LHA)

Essa região se situa medial e anteriormente às estruturas do subtálamo. “É atravessada longitudinalmente por muitas fibras, inclusive o feixe poscefálico medial” (CROSSMAN, NEARY, 2011). “A área hipotalâmica lateral é importante no controle da alimentação e da sede e, em parte, é equivalente ao centro de alimentação fisiologicamente definido” (CROSSMAN, NEARY, 2011). “A estimulação da LHA é um potente indutor do apetite” (MACHADO, 2000).

A ingestão alimentar é modulada também pelas estruturas límbico-corticais do cérebro, como a amígdala e o córtex pré-frontal, que estabelecem mecanismos de feedback com a LHA e estão relacionados à atribuição de valor hedônico ao alimento, como sabor, aparência, textura e etc. (HEISLER et al., 2007).

1.4 Intervenção terapêutica na obesidade: presente e futuro

A primeira linha de tratamento da obesidade “envolve necessariamente a reeducação alimentar e o aumento da atividade física” (GOMES, 2004). No entanto, a maioria das pessoas apresentam dificuldade em perder peso, apesar da disponibilidade de ampla variedade de escolhas de dietas e programas de exercícios (FRANDSEN et al., 1998). “Dependendo da situação de cada indivíduo, pode ser indicado o tratamento psiquiátrico. Nos casos de obesidade secundária a outras doenças, o tratamento deve inicialmente ser dirigido para a causa do distúrbio” (SANTOS A, 2007).

Os atuais tratamentos de segunda linha disponíveis, são medicamentos e cirurgia. O único tratamento da obesidade em uso clínico que demonstrou uma perda significativa de peso a longo prazo é a cirurgia de *bypass* gastrointestinal (FRANDSEN et al., 1998). No entanto, devido às suas complicações, este procedimento é restrito a doentes com obesidade mórbida.

Dentre os medicamentos em uso clínico para tratar obesidade, a fenfluramina[3], d-fenfluramina e, mais recentemente, a sibutramina e o orlistat são aprovados pela *Food and Drug Administration,* embora apenas os dois últimos sejam recomendados para uso a longo prazo (HINES, 2004).

Todos estes medicamentos têm sido eficazes na redução e controle do peso corporal do indivíduo, porém sua desvantagem tem sido seus perfis de efeitos colaterais (hipertensão pulmonar primária, no caso de fenfluramina e aumento da pressão sanguínea e da frequência cardíaca no caso de sibutramina) (MANCINI; HALPERN, 2002).

O foco atual da indústria farmacêutica no desenvolvimento de agentes antiobesidade tem sido a exploração da utilidade clínica de peptídeos anorexígenos com ação orientada para conhecidas vias de sinalização do hipotálamo, como por exemplo a administração de leptina. “Essa proteína anorexígena de 16 KDa, produzida principalmente pelo tecido adiposo subcutâneo, se liga aos seus receptores Ob-Rb em neurônios NPY/AgRP” (DAMIANI et al., 2010). A ativação

[3] Inibidor de apetite usado para tratamento de curto prazo da obesidade.

desses receptores diminui a atividade de neurônios NPY/AgRP e, por conseguinte, suprimem o apetite. “Logo, a ação da leptina é dependente da ativação de receptores específicos presentes nos órgãos alvos. Existem dois tipos de receptores para a leptina” (EDUARDA; ROMERO; ZANESCO, 2006), “o ObRb, de cadeia longa (maior quantidade de aminoácidos e com maior expressão no hipotálamo), e os receptores ObRa de cadeia curta (menor quantidade de aminoácidos), encontrados em outros órgãos como o pâncreas” (EDUARDA; ROMERO; ZANESCO, 2006).

Segundo Eduarda; Romero; Zanesco (2006), “além do efeito inibidor sobre neurônios NPY/AgRP, a leptina também reduz o apetite a partir do aumento da secreção de outros neuropeptídeos anorexígenos como α-MSH, CRH e CART”. Assim, altos níveis de leptina reduzem a ingestão alimentar enquanto baixos níveis induzem o apetite. Isso é comprovado em camundongos obesos (ob/ob), que são camundongos mutantes que comem excessivamente e se tornam profundamente obesos, também são desprovidos de leptina (Figura 10, a seguir) e apresentam alto ganho de peso e distúrbios metabólicos adjacentes em virtude da deficiência da sinalização desse neuropeptídeo, ou seja, de sinais inibidores do apetite (EDUARDA; ROMERO; ZANESCO, 2006).

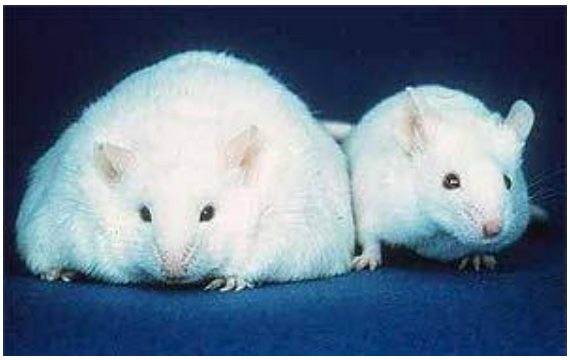

Figura 10 – Camundongo ob/ob desprovidos de receptores de leptina à esquerda e camundongo sem a mutação a direita.
Disponível em: <http://medicinageriatrica.com.br.> Acesso em: 19 de agosto de 2015.

Em humanos, a terapia com leptina e outros peptídeos anorexigênicos tem sido testada em obesos (GALE; CASTRACANE; MANTZOROS, 2004), uma abordagem que tem sido repetidamente prejudicada por problemas de segurança. Apesar de plausíveis, essas terapias de reposição hormonal exigem

poliquimioterapia crônica para induzir perda de peso eficaz e manutenção a longo prazo (KORNER, J. ARONNE, 2004). Isso implica que administração de peptídeos não resolve os problemas relacionados aos efeitos indesejáveis visto que, assim como os medicamentos clássicos, os neuropeptídeos podem, por exemplo, agir em diferentes regiões cerebrais não relacionadas à regulação do apetite.

Nesse contexto, o futuro parece reservar melhores opções para tratar a obesidade. Por exemplo, é possível que o desenvolvimento de novas estratégias de modulação neuronal possa limitar a ação terapêutica a sítios de interesse e abrir, dessa forma, um novo espectro para o desenvolvimento de estratégias de intervenção terapêutica na obesidade. Aqui será abordada a técnica da optogenética, pois essa técnica apresenta capacidade de controlar a modulação neuronal a **nível celular**, em **tempo** e **sítios** determinados especificamente. O que se discutirá em seguida, será o potencial dessa técnica como estratégia terapêutica da obesidade através da modulação de núcleos hipotalâmicos controladores do comportamento alimentar.

1.5 Optogenética

“Optogenética, como o termo passou a ser usado, refere-se à integração da óptica e da genética para alcançar ganho ou perda de função de eventos bem definidos dentro de células específicas de tecidos vivos” (YIZHAR et al., 2011). “O termo optogenética (do inglês *optogenetics*) se refere a uma técnica de transfecção de células com proteínas (**opsinas**) responsivas à luz, fazendo com que a atividade dessas células seja controlada através de dispositivos ópticos” (KRUEGER et al., 2012). Utilizando optogenética, é possível controlar a atividade de circuitos neurais específicos com alta precisão já que a expressão da opsina de interesse é dirigida por promotores que determinam o subtipo celular modulado. Em sua maioria, as opsinas utilizadas na optogenética são canais iônicos que, em resposta a um comprimento de onda específico, permitem o influxo de íons e mudanças no potencial da membrana do neurônio (MÖGLICH, 2010).

A inserção (transfecção) de genes, derivados de algas e bactérias, em células alvo (tipicamente neurônios), é realizada através de microinjeção de um vírus, o qual

carrega a construção gênica e, por esse motivo, o vírus é considerado vetor. A região do cérebro a ser alvo da técnica é obtida através de posicionamento estereotáxico (YIZHAR et al. 2011). Após alguns dias pós-injeção, os genes transfectados codificam uma proteína (como canais iônicos e bombas de prótons) sensível à luz, também chamado de opsina, que se instala na superfície da célula. Assim, as células (neurônios ou glia) transfectadas do animal hospedeiro adquirem uma nova propriedade: tornam-se fotossensíveis (YIZHAR et al. 2011).

Para que a luz tenha acesso aos canais iônicos transfectados, é necessário implantar uma fibra óptica apontada para a região contendo as células transfectadas (YIZHAR et al. 2011). Diversos métodos estão sendo utilizados e testados para se aprimorararem as emissões dos feixes de luz e a leitura dos sinais. Esses métodos geralmente fazem uso de lasers ou LEDs e permitem levar a luz a qualquer área de interesse, mesmo que essa esteja em algum local profundo do cérebro. Pela fibra óptica, passa uma luz de comprimento de onda específico que, ao atingir a opsina acaba ativando-a.

A opsina pode ser um canal iônico e então permitir o influxo de cátions (Na^+, Ca^{++}), como é o caso do canalrodopsina 2 (ChR2), que ocorrerá uma mudança do gradiente eletroquímico dentro dos neurônios resultando no disparo de um potencial de ação. Em outras palavras, a luz induzirá a ativação do neurônio, desencadeando um efeito biológico subjacente. De outro modo, se a opsina for um canal iônico que permita o influxo de ânions do tipo cloreto (Cl-), como nas halorodopsinas (NpHR), o neurônio entrará em um estado de hiperpolarização[4] (KRUEGER et al., 2012).

Nessa condição, os neurônios são considerados inibidos pois é muito difícil que as substâncias endógenas possam reverter este estado para que aconteça um potencial de ação (KRUEGER et al., 2012). Além da observação direta do efeito biológico ou comportamental da estimulação óptica, cientistas também realizam registros eletrofisiológicos que permitem saber exatamente o padrão de disparos neuronais.

[4] Fenômeno ou estado caracterizado pelo aumento na diferença de potencial entre o meio externo e o interno de uma membrana biológica.

1.5.1. Construção gênica para o método Optogenético

O delineamento do material necessário para o desenvolvimento do método optogenético, envolve a confecção de uma construção gênica, a qual é composta de promotor, gene da opsina e gene da proteína fluorescente, conforme figura abaixo:

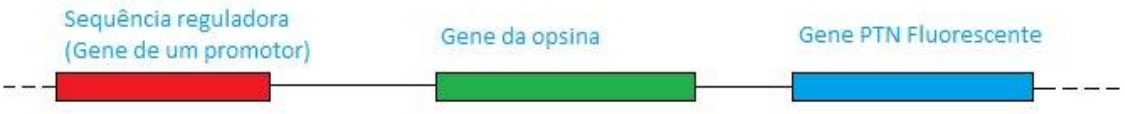

Figura 11 – Construção gênica, utilizada no método Optogenético.
Fonte: Próprio Autor.

- Promotor

Os promotores são sequências de DNA, normalmente localizados antes (*upstream*) do sítio inicial de transcrição, que são reconhecidas por fatores de transcrição para ocorrer ligação do complexo RNA polimerase (INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA UFRJ, 2015). Só após a ligação do complexo RNA polimerase, ocorre a transcrição do gene. Interessantemente, a disponibilidade do promotor em uma célula pode determinar se o gene adjacente será transcrito ou não (MCINNES et al., 2002).

Ao longo de muitos anos de estudo, observou-se que alguns promotores apresentavam especificidade celular, ou seja, determinavam a expressão seletiva de um gene em uma célula específica (MCINNES et al., 2002). Usando técnicas de engenharia genética, essa propriedade pode ser aproveitada para determinar precisamente o tipo celular que expressará a opsina de interesse, mesmo havendo dezenas de outras células no sítio da injeção viral.

- Opsina

Estimulação optogenética gera ganho ou perda da função com precisão em escala de milissegundos, o que é essencial para manter o ritmo experimental com a

dinâmica dos acontecimentos neurais tais como potenciais de ação e correntes sinápticas. Essa função depende do desempenho de opsinas microbianas (YIZHAR et al., 2011a).

As opsinas podem ser classificadas em três tipos: bacteriorodopsina (BR), halordopsinas (HR), e canalrodopsina (ChR). As primeiras são produtos proteicos de genes de opsinas microbianas e são denominadas rodopsinas, quando ligados à retina. “A segunda classe de opsina são as halordopsinas, que são canais de cloretos ativados por luz, descobertos pela primeira vez em arqueobactérias” (MATSUNO-YAGI, A. MUKOHATA, 1977). Em seguida, “a terceira classe de opsina microbiana (canalrodopsina ou CHR) na qual sua ativação causa influxo celular de Na²” (NAGEL et al., 2002).

- Proteína Fluorescente

A proteína verde fluorescente (GFP), foi descoberta no início dos anos 60, anunciando então, uma nova era na biologia celular. Este acontecimento permitiu aos investigadores a possibilidade de aplicação de métodos de clonagem molecular, fundindo uma porção fluoróforo[5] em uma grande variedade de alvos de proteínas e de enzimas, com o intuito de controlar os processos celulares em sistemas vivos usando microscopia ótica e metodologia relacionada (PISTON et al. 2011).

A GFP, e das suas formas mutadas, como por exemplo: azul, ciano e amarelas, podem ser fusionadas ao gene da opsina resultando em opsinas que podem fluorescer em células vivas após a transfecção. Dessa forma, permite a validação da expressão da opsina no neurônio hospedeiro sem necessidade de produzir anticorpos específicos para uma dada opsina (PISTON et al. 2011).

- Vírus

Os vírus podem ser formados por DNA ou o RNA, ou seja, por apenas um

[5] Componente de uma molécula que faz com que esta seja fluorescente.

tipo de ácido nucleico, sendo protegidos por cápsula proteica. Alguns vírus podem possuir também um envelope formado por membrana lipoproteica, que é semelhante à das células (LOPES, 2002).

É importante ressaltar que os vírus não têm capacidade de sintetizar proteínas, só adquirindo manifestações vitais quando penetram em células vivas para liberar seu conteúdo gênico para ser transcrito e traduzido em proteínas (LOPES, 2002).

1.5.2. Experimentos Optogenéticos

Boyden et al., (2005) descreveram, pela primeira vez, o uso de um canal iônico dependente de luz, canalrodopsina-2 (ChR2), demonstrando que pulsos de luz azul (470 nm) eram capazes de induzir pulsos de potenciais de ação correspondentes, em células expressando ChR2. A transfecção por via viral, de ChR2 em células retinianas, de modelos animais com degeneração, foi capaz de restaurar a habilidade dos neurônios de transmitir informação luminosa ao córtex visual, de maneira segura e por longo-prazo (BI et al., 2006), ou seja, a transfecção de ChR2 permite que pulsos de luz azul (470 nm) sejam capazes de desencadear potenciais de ação nos neurônios, devido ao influxo de Na^+, ativando-os (MANCUSO et al., 2011) (Figura 11, a seguir).

Aparentemente, a expressão de longo-prazo da ChR2 parece não alterar a fisiologia basal ou produzir toxicidade nos neurônios transfectados, então, permitindo expressão neuronal de ChR2 opticamente controlável e fisiologicamente relevante (FENO et al, 2011). “Pode-se codificar neurônios com a ChR2 (que responde com a despolarização) e/ou com a NpHR (que responde com a hiperpolarização)” (KRUEGER et al., 2012). A transfecção de NpHR permite que pulsos de luz amarelo/laranja (589 nm) sejam capazes de hiperpolarizar os neurônios devido ao influxo de Cl^-, inibindo-os, assim, o potencial de ação sináptico pode ser modulado por um sinal luminoso (MANCUSO et al., 2011).

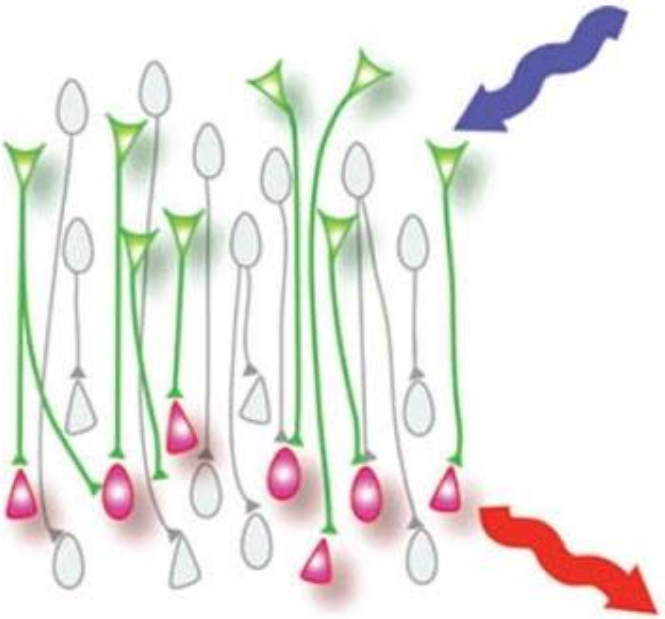

Figura 12 – Estimulação Ótica - Em verde: neurônios expressando a opsina ChR2 fusionada ao gene da proteína verde fluorescente (GFP). Em cinza: neurônios não transfectados. Observar que a estimulação óptica (seta azul) apenas estimula (seta vermelha) os neurônios em verde, ou seja, que expressam ChR2.
Fonte: Mancuso et al., 2011.

De acordo com a revisão feita até o momento, pode se entender que a utilização de uma proteína fotossensível para ligar e desligar genes é um método que pode ser aplicado a qualquer célula do corpo passível de ser iluminada, e assim ter sua fisiologia controlada. Isso exemplifica que o uso da optogenética está limitado apenas pela criatividade dos pesquisadores, sendo assim a possibilidade de utilização da optogenética no hipotálamo a fim de conseguir controlar o apetite, poderia ser viável, por exemplo, através da transfecção de opsina em neurônios onde agem um peptídeo anorexigênico da periferia, pois estes não agem diretamente nos centros da saciedade, mas sim inibindo os centros do apetite.

Por exemplo, ele pode estimular neurônios que secretam melanocortina em um núcleo A, que age em um núcleo B, inibindo a liberação de um peptídeo orexigênico, dessa forma prevalecendo o tônus anorexígeno.

1.6 Simuladores

Para Bruyne (1977), a simulação é entendida como "a construção e a

manipulação de um modelo operatório representando todo, ou parte de, um sistema ou processos que o caracterizam". Kleiboer (1997) define simulação como um "modelo refletindo as características centrais de um sistema, processo ou ambiente, real ou proposto".

A criação de um simulador para utilização de técnicas de optogenética pode reduzir os riscos de implementações, testes e dar suporte a decisões complexas, por vezes envolvendo investimentos elevados. Em uma simulação de optogenética, pode ser trabalhado, por exemplo, o provável efeito decorrente da (i) escolha de diferentes promotores, (ii) definição de opsinas de interesse (ativação ou inibição), (iii) e escolha do tipo de vírus (adenovírus, lentivírus) e seus respectivos sorotipos. Espera-se que a disponibilidade de um banco de dados conciso, atualizado e coerente com a literatura da área possibilite a implementação de protocolos cujo resultados possam vir com maior rapidez.

O teste de viabilidade de um marca-passo cardíaco por meio de controle optogenético feito por (ARRENBERG et al., 2010), pode ser considerado um exemplo de aplicação de simulações optogenéticas. Nestas simulações foram testadas a alteração gênica de NpHR e ChR2 em células do miocárdio de peixes-zebra. Os pesquisadores conseguiram simular a taquicardia, bradicardia, bloqueio atrioventricular e parada cardíaca, tornando promissora a futura aplicação de optogenética em marca-passo cardíaco (KRUEGER et al., 2012).

1.7 Ferramenta online para simulação

1.7.1 Banco de Dados

Bancos de Dados, para (BIO, 2008), “pode ser entendido como uma coleção de arquivos estruturados, não redundantes e inter-relacionados, que proporciona uma fonte única dados para uma variedade de aplicações”. Esses dados não são armazenados de uma forma aleatória, mas sim de uma forma estruturada e relacionada (ELMASRI, R. NAVATHE, 2011).

1.7.2 Sistema Gerenciador de Banco de dados

Para Elmasri, R. Navathe (2011), “Um sistema gerenciador de bancos de dados (SGBD – Database Management System) é uma coleção de programas que permite aos usuários criar e manter um banco de dados”.

Ainda segundo Elmasri, R. Navathe (2011), “o SGBD é um sistema de software de uso geral que facilita o processo de definição, construção, manipulação e compartilhamento de bancos de dados entre diversos usuários e aplicações”.

1.7.3 MySQL

Segundo Welling, L. Thomson (2009), MySQL, “é um sistema de gerenciamento de banco de dados relacional (Relational Database Management System - RDBMS) muito rápido e robusto. Um banco de dados permite armazenar, pesquisar, classificar e recuperar dados eficientemente”.

1.7.4 Linguagem de Programação

Os dispositivos eletrônicos necessitam de uma forma de comunicação no sentido de “mostrar” a eles o que devem fazer. Para os computadores é necessária uma linguagem de programação, que permitirá a um programador desenvolver um conjunto de instruções para manipulá-lo. Existem muitas linguagens de programação e cada uma com suas peculiaridades (O’BRIEN, 2004). Pode se concluir que uma linguagem de programação é uma forma de comunicação entre pessoas e computadores (ANDRADE, 2015).

1.7.5 PHP Hypertext Preprocessor - PHP

Segundo Bento (2013), “PHP é uma ferramenta que possibilita o pré-processamento de páginas HTML. Dessa forma, PHP consegue alterar o conteúdo de uma página, antes de enviá-la para o navegador. Além disso, PHP também permite capturar entradas de dados do usuário, como formulários e outras formas de

interação”.

1.7.6 HyperText Markup Language - HTML

O HTML é usado para o desenvolvimento de qualquer interface que venha a ser utilizada na internet ou intranet, e sendo interpretada pelos navegadores. Para Silva (2008), “HTML é a sigla em inglês para *HyperText Markup Language*, que, em português, significa linguagem para marcação de hipertexto”.

Silva (2008), classifica “hipertexto como todo o conteúdo inserido em um documento para a web e que tem como principal característica a possibilidade de se interligar a outros documentos da web”.

1.7.7 Cascading Style Sheet - CSS

Conforme a Web Design e Aplicações (2015), “CSS é a linguagem para descrever a apresentação de páginas da Web, incluindo cores, layout e fontes.” O CSS tem como objetivo devolver ao HTML o seu propósito principal. Para Silva (2012), “CSS é a abreviação para o termo em inglês *Cascading Style Sheet*, traduzido para o português como folhas de estilo em cascata”.

1.7.8 JavaScript

O JavaScript conforme Silva, (2010), “foi criada pela Netscape em parceria com a Sun Microsystems, com a finalidade de fornecer um meio de adicionar interatividade a uma página web”. Ainda conforme Silva, (2010),

O JavaScript tem o seu funcionamento dependente de funcionalidades hospedadas no navegador do cliente, pois existe um interpretador JavaScript existente no navegador do usuário (SILVA, 2010).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram subdivididos em objetivo geral e objetivos específicos, para que haja uma melhor demonstração do que se pretende obter com o desenvolvimento desta pesquisa.

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um simulador online de optogenética para auxiliar na discursão de estratégias teoricas de estimulação optogenética para tratar a obesidade, simulando os efeitos esperados do procedimento sobre o controle do apetite apartir de um banco de dados.

2.2 Objetivos Específicos

- Revisar os neurocircuitos hipotalâmicos relevantes para análises;
- Revisar métodos optogenéticos;
- Delinear estratégias de intervenção (escolha de promotores, definição de opsinas, e escolha do vírus);
- Descrever os resultados esperados das estratégias selecionadas;
- Desenvolver um simulador online para auxiliar estratégias de estimulação optogenética, usando o hipotálamo como protótipo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do trabalho, a metodologia foi estabelecida seguindo algumas fases que envolveram:

a) Revisão da literatura a respeito do controle hipotalâmico sobre o comportamento alimentar;
b) Seleção dos neurocircuitos hipotalâmicos que regulam o apetite como candidatos à intervenção optogenética;
c) Revisão da literatura sobre o método optogenético;
d) Modelagem teórica da intervenção optogenética nos neurocircuitos candidatos: efeitos esperados (liberação de neuropeptídeos e efeito comportamental);
e) Construção, interface e características esperadas do simulador online: *toolbox* e simulação de efeito.

3.1 Revisão da literatura sobre o controle do comportamento alimentar pelo hipotálamo

A revisão do tema proposto foi elaborada a partir da utilização do banco de dados PUBMED com critérios de inclusão e exclusão de artigos completos, que em sua grande maioria, se encontram em inglês, contendo as palavras-chave "obesity", "optogenetics", "optical stimulation of neural tissue", "photoreceptors," "simulators", "hypothalamus", "neuron", "brain circuits", “food behavior”, e "hypothalamic nuclei".

O banco de dados do simulador foi construído a partir dos estudos que mais se aproximavam do objetivo proposto. O referencial teórico utilizado na discussão do valor terapêutico da optogenética na obesidade foi baseado no núcleo arqueado (ARC), a partir de simulações envolvendo populações POMC/CART e NPY/AGRP. As características dessas populações de neurônios foram relacionadas conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Características das Populações de neurônios utilizadas nas simulações.

População	Receptores	Estimulação	Inibição	Populações Aferentes	Populações Eferentes	Efeitos
POMC/ CART	OB-Rb, NPY Y1, NPY Y5, MC3/4[a], Receptores Orexigenos	Leptina, TRH[b]/ CART (PVN), BDNF[c] (VMH), CHR[d] (PVN)	NPY/AGRP (ARC), MCA/ CART(LH)	GAL(LH), NPY/AGRP (ARC)	NPY/AGRP (ARC), MCH[f] /CART (LH), CHR(PVN), TRH/CART (PVN)	Anorexígeno
NPY/ AGRP	OB-Rb, MC3/4, Receptores Orexígenos	Grelina	Leptina, OXT/CART (PVN), TRH/CART (PVN), CRH (PVN), BDNF (PVN), BDNF(VMH), PONC/CART (ARC), GALP (ARC)	GAL[e] (LH), MCH/CART (ARC), PONC/ CART (ARC)	OXT[g]/ CART(PVN), TRH/CART (PVN), CRH(PVN), BDNF(PVN), BDNF (VMH), PONC/CAR T(ARC), GALP[h](ARC)	Orexígenos

a: Receptor de Melanocortina do tipo 3 e 4; b: hormônio liberador de tireotrofina; c: Fator neurotrófico derivado do cérebro; d: hormônio liberador de corticotrofina; e: Galanina; f: Hormônio Concentrador de Melanina; g: Ocitocina; h: Peptídeo ligante de galanina.
Fonte: Próprio Autor.

3.2 Revisão da literatura sobre o método optogenético

Após a seleção da região alvo, ocorreu a montagem do banco de dados para confecção das construções gênicas do método optogenético, conforme dados abaixo:

- Promotor

Como foram escolhidas as populações POMC/CART e NPY/AGRP para as simulações, procurou-se trabalhar com sequências específicas de promotores. Os promotores mais adequados para o trabalho são os NPY ou POMC, pois regulam genes que são expressos exatamente nas populações escolhidas. Estes promotores

foram relacionados, juntamente com promotores genéricos, os quais possuem probabilidade de regular genes que podem ser expressos nas populações escolhidas. Os promotores selecionados foram descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Características dos Promotores selecionados para compor o banco de dados.

ID	Nome	Tamanho (kb)	Célula Específica do Promotor
1	CaMKIIα[a]	1,3	Neurônios excitatórios em córtex, amygdala
2	SynI[b]	0,5	Panneuronal para as células inibitórias em baixos títulos
3	EF1a[c]	1,2	Apenas no neurônio específico LV
4	CMV[d]	0,6	Sem especificação
5	GFAP[e]	2,2	Astrócitos
6	TPH-2[f]	2	Neurônios serotoninérgicos
7	Thy1 (AAV5)[g]	5	Panneuronal
8	MBP (AAV8)[h]	1,35	Oligodendrócitos
9	SST (AAV2)[i]	2	Neurônios somatostatina
10	POMC[j]	1-3	Neurônios POMC
11	NPY[k]	1-3	Neurônios NPY

a: Promotor que regula Quinases dependentes de calmodulina (CaMK), que são uma família de cinases de serina, treonina que medeiam muitos dos efeitos mensageiros de Ca2+; b: Promotor que regula uma fosfoproteína específica dos neurônios que reveste a superfície citoplasmática de pequenas vesículas sinápticas; c: Promotor constitutivo de origem humana, que pode ser usado para conduzir a expressão ectópica de genes em vários contextos; d: É um promotor constitutivo de mamífero; e: Este promotor regula um gene que codifica uma das principais proteínas de filamento intermediário de astrócitos; f: Regula genes que são expressos principalmente nos neurônios serotoninérgicos do cérebro, com a expressão mais elevada no núcleo da rafe do mesencéfalo; g: Regula um gene de proteína codificado. Pode desempenhar uma interação ligando a célula na sinaptogénese e outros eventos no cérebro; h: Regula um dos principais constituintes da bainha de mielina de oligodendrócitos e células de Schwann no sistema nervoso; i: Regula um gene de proteína codificado. A somatostatina é um polipeptídio cíclico endógeno com duas formas biologicamente ativas; j: Promotor que regula um gene que codifica um polipeptídio precursor do hormônio que sofre um extenso processamento de pós-tradução através de clivagem por enzimas de subtilisina, conhecidos como prohormona convertases. Mutações neste gene estão associadas com a obesidade de início precoce, a insuficiência suprarenal, e a pigmentação capilar vermelho; k: Promotor que regula um gene que codifica um neuropeptídio, que é largamente expresso no sistema nervoso central e possui influência em diversos processos fisiológicos, incluindo a excitabilidade cortical, resposta ao stress, a ingestão de alimento, ritmos circadianos e da função cardiovascular;
Fonte: Adaptado Weizmann, (2015).

- Opsina

Atualmente, novas opsinas estão disponíveis, as quais resultaram de mutações pontuais dos genes selvagens. De maneira geral, essas opsinas possuem propriedades variáveis de absorção de luz e cinética óptica[6]. As características das opsinas escolhidas para a simulação (Tabela 4):

[6] Cinética óptica – Velocidade da reação química após a absorção da luz.

Tabela 4 – Características das opsinas escolhidas para a simulação.

Opsina:	Espécie:	Classe:	Mecanismo:	Comprimento de Onda:	Cinética de Inibição:	Efeito:
ChR2(H134R)[a]	Channelrhodopsin-2	Excitação óptica	Canal de cátions	470 nm	10 ms	Estimulação
ChR2(T159C)[b]	Channelrhodopsin-2	Excitação óptica	Canal de cátions	470 nm	26 ms	Estimulação
eArch3.0[c]	*Halorubrum sodomense*	Inibição óptica	Bomba de prótons	566 nm	9 ms	Inibição
eNpHR3.0[d]	*Natronomonas pharaonis*	Inibição óptica	Bomba de cloreto	590 nm	4,2 ms	Inibição
hChR2(C128A -step function opsins (SFOs)[e]	Channelrhodopsin-2	Excitação óptica	Canal de cátions	470 nm activation / 590 nm deactivation	42 s (C128A)	Estimulação

a: ChR2(H134R): canalrodopsina-2; b: ChR2(T159C): canalrodopsina-2; c: eArch 3.0: archeorodopsinsa; d: eNpHR3.0: halorodopsina; e: hChR2(C128A) step function opsins (SFOs): canalrodopsina-2
Fonte: Adaptado Yizhar et al. (2011).

- Proteína Fluorescente

A escolha do gene da proteína fluorescente é importante para demarcar visualmente o sítio de expressão da opsina. As características dos genes de proteína fluorescente levados em consideração estão descritas na Tabela 5:

Tabela 5 – Características dos genes de Proteina Fluorescente levados em consideração para a simulação.

Gene da PTN Fluorescente:	Excitação Máxima:	Emissão Máxima:	Coeficiente de Extinção (k):	Estrutura:	Brilho (% para EGFP):
EGFP[a]	484 nm	507 nm	56.000	Monômero	100
ECFP[b]	439 nm	476 nm	32.500	Monômero	39
mCherry[c]	587 nm	610 nm	72.000	Monômero	47
EYFP[d]	514 nm	527 nm	83.400	Monômero	151

a: Variante mutada mais popular da GFP, que está comercialmente disponível em uma ampla gama de vetores. ; b: Variantes azul ciano de proteína fluorescente verde, são resultados de uma modificação direta do resíduo de tirosina na posição 66 (Tyr66); c: As proteínas fluorescentes vermelhas são compatíveis com microscópios confocais e widefield, e possuem uma maior variedade de animais que são significativamente mais transparentes à luz vermelha; d: Proteína fluorescente amarela (EYFP), é uma das proteínas fluorescentes mais brilhantes e amplamente utilizada. O brilho e espectro de emissão de fluorescência da proteína fluorescente amarela se combinam para torna-la uma excelente candidata para experiências de imagiologia em microscopia de fluorescência.
Fonte: Adaptado Piston et al. (2011).

As principais proteínas fluorescentes, que podem ser facilmente aplicadas na manipulação da atividade de neurônios hipotalâmicos usando optogenética, são GFP ou EGFP (verde) e mCherry (vermelha). Além de possuírem alto coeficiente de brilho e não produzirem alterações na fisiologia neuronal, elas possuem diferentes espectros de fluorescência. Assim, as duas podem ser utilizadas ao mesmo tempo, numa única microinjeção viral, para permitir a expressão de duas construções optogenéticas diferentes, conforme esquema abaixo:

(i) PROMOTOR + GENE OPSINA + EGFP
(ii) PROMOTOR + GENE OPSINA + mCherry

- Vírus

Os vírus são vetores utilizados para transportar a construção optogenética (promotor + gene da opsina + gene da proteína fluorescente) para dentro do neurônio de interesse. A solução contendo vírus + construção optogenética é injetada em locais específicos do cérebro de cobaias através de um procedimento chamado de cirurgia estereotáxica. Para simular o processo de microinjeção, foram selecionados dois tipos de vírus que conforme revisão, são utilizados em experimentos de optogenética, conforme Tabela 6:

Tabela 6 – Características dos tipos de Vírus selecionados.

Vírus:	Tamanho da partícula viral (rAAV):	Tamanho máximo da construção:	Expressão:	Espalhamento:	Duração:
Adenoassociados (AAV)	20 nm	~ 4,7 kb	A taxa de expressão depende do promotor utilizado.	Por serem menores que lentivírus, os AAVs atingem uma maior superfície	A expressão AAV é bastante estável chegando a durar mais de 6 meses.
LentiVírus (LENT)	> 100 nm	~ 10,2 kb (mais que o dobro da capacidade de AAVs)	A taxa de início depende do promotor utilizado.	Por serem maiores que os AAVs, os lentivírus atingem uma menor superfície	Permanente.

Fonte: Adaptado Roehe, P. (2015).

3.3 Construção de ferramenta online para simulação da técnica de optogenética

Para o desenvolvimento de uma ferramenta online para a simulação do resultado esperado da técnica de optogenética para uma possível intervenção terapêutica na obesidade, foi realizado um estudo fundamentado em teorias e definições sobre banco de dados, Sistema Gerenciador de Banco de dados, MySQL, e as linguagens de programação PHP, HTML, CSS e JavaScript. Este desenvolvimento foi baseado em três fases: a fase de levantamento de requisitos (Fase 1), a fase de implementação e implantação (Fase 2) e a fase (Fase 3).

- Fase 1: Levantamento de Requisitos.

A fase de levantamento de requisitos levantou os objetivos do sistema e buscou as informações disponíveis para que houvesse um melhor planejamento da ferramenta. As informações coletadas foram consideradas aptas ao objetivo da pesquisa, a partir das revisões bibliográficas efetuadas neste trabalho.

- Fase 2: Implementação e Implantação.

A fase de implementação, iniciou se com a modelagem do banco de dados MySQL. A escolha pelo MySQL, se deu pelo fato de ser um dos mais populares bancos de dados open source do mundo, e possuir consistência, alta performance, confiabilidade e ser de fácil uso. O banco de dados organiza suas informações em tabelas, que por sua vez, reúnem conjuntos de registros contendo as informações necessárias para a construção do método optogenético. A alimentação destes registros foi feita de maneira prévia, conforme revisão da literatura.

A etapa seguinte constituiu na programação do simulador, na qual foi utilizado o HTML como principal linguagem de desenvolvimento, justificando se, por ser usado para o desenvolvimento de qualquer interface que venha a ser utilizada na internet ou intranet, e sendo interpretada pelos navegadores, conforme descrito na fundamentação teórica. Posteriormente foi feita a integração do CSS ao HTML para

a especificação de estilo do documento, evitando assim, código repetido, e possibilitando a facilidade de manutenção.

Ainda se tratando de linguagens de programação, foram utilizados o PHP e o JavaScript durante o desenvolvimento da ferramenta, para que fosse possível uma maior integração com o Banco de dados MySQL, resultando assim em uma performance maior, e a possibilidade de instalação em vários Sistemas Operacionais como Windows, Linux, Unix, IBM iSeries, SGI IRIX, RISC OS, Netware Novell, e Mac OS X, conseguindo então uma portabilidade favorável.

Ao fim do desenvolvimento ocorreu a hospedagem da ferramenta em um servidor mantido pelo serviço de hospedagem UOL, para disponibilização online

- Fase 3: Testes.

Após a conclusão da fase de implementação, foram feitos tipos de testes que para avaliação da ferramenta como por exemplo: os testes visuais, onde foi solicitado a usuários com conhecimentos diversos que façam um tour pelo sistema e forneçam um feedback com considerações sobre a facilidade de aprendizado e memorização do sistema; os testes de navegação, que foram feitos a partir da máquina servidora por diversos navegadores e sistemas operacionais para validação da consistência, flexibilidade e responsividade da ferramenta, e por fim foram feitos os testes de tempo de carregamento de página, que foram feitos a partir de diferentes tipos de banda de internet para validação do desempenho do sistema.

4. RESULTADOS

4.1 Estratégias de intervenção

Com base na revisão bibliográfica efetuada, foram traçadas três estratégias principais de intervenção na obesidade a partir do ARC, são elas:

- Estimulação do neurônio POMC/CART;
- Inibição do neurônio NPY/AGRP;
- Utilização das duas estratégias em conjunto.

Para a execução destas estratégias, foi necessária a consolidação teórica do valor terapêutico de diferentes formatos de construção optogenética, o que incluiu a validação de promotores, opsinas e genes fluorescentes. Logo, arranjos mais promissores com potencial de serem incluídos no método optogenético foram considerados para posterior simulação dos resultados esperados.

A revisão da literatura revelou que ainda é escassa a quantidade de promotores com validação experimental para possibilitar expressão do gene de interesse (GOI) dentro de diferentes subtipos neuronais em núcleos hipotalâmicos. De fato, é um grande desafio identificar um tipo de promotor que induza expressão da opsina em mesmas intensidades em apenas neurônios NPY/AgRP ou POMC/CART. Esses neurônios possuem atividade fortemente influenciada pelas oscilações homeostáticas, o que tornaria difícil manter a expressão constante e regular da opsina. Por outro lado, a utilização de um promotor direcionado por mecanismos celulares mais generalizados provocaria perda de especificidade neuronal. Diante dessa dificuldade, a análise obtida por esse estudo recomenda a utilização do mesmo promotor que regula a expressão do gene NPY ou POMC. A especificidade espacial em relação aos outros núcleos deve ser controlada através da microinjeção estereotáxica e controle do espalhamento viral.

A seleção de opsinas ocorreu com o propósito de validar aquelas que são mais propícias à estimulação ou inibição de neurônios. Vale ressaltar que o impacto

destas opsinas nas populações escolhidas terá resultado teórico, pois uma mudança de opsina não necessariamente significará a alteração de ativação para inibição, mas resultará no tempo de ação da opsina, que terá sua ativação mais intensa, dependendo da opsina escolhida. As características dessas opsinas serão distribuídas entre os tópicos de excitação e inibição com optogenética. Quanto aos genes fluorescentes, foram escolhidas variações de genes para melhor visualização do resultado. A troca de genes fluorescentes não alterará o efeito biológico esperado da construção.

4.2 Excitação com optogenética

Para as construções com o objetivo de excitação das populações foram utilizados exemplos de mutações de canalrodopsina-2 e uma variante do tipo *step function opsins (SFO)*, sendo esta última, uma versão mais lenta de ChR2 que podem induzir os neurônios a estados de excitação prolongada sob luz azul, podendo ser revertido sob exposição de luz verde (Figura 13, a seguir). A revisão revelou que neurônios expressando ChR2 respondem ao estímulo luminoso com a abertura dos canais de cátions da membrana, o que causa sua despolarização e, portanto, ativação. “O ChR2 tem sua ativação maximizada pela luz azul, cujo comprimento de onda (λ) é 470 nm, tendo uma constante de desativação de ~12 ms” (ZHANG et al., 2010).

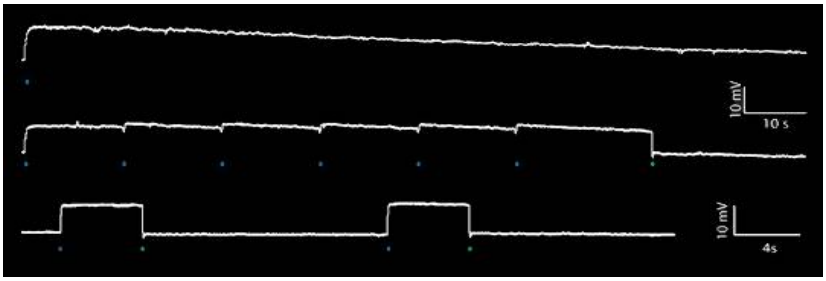

Figura 13 – *Step Function Opsins (SFO).* Único pulso de luz azul causa despolarização de neurônios que permanece estável até que um segundo pulso de luz verde seja aplicado à região cerebral e cause polarização (inibição da ativação).
Disponível em: <http://web.stanford.edu/group/dlab/optogenetics/sequence_info.html> Acesso em: 30 de outubro de 2015.

As variantes escolhidas para a simulação da excitação das populações serão apresentadas abaixo:

- ChR2 (H134R)

ChR2 (H134R) é um exemplo canalrodopsina-2 que “possui um aumento na sensibilidade à luz, e tem o seu fechamento após a emissão de luz, mais lento em comparação com ChR2” (LIN, 2012). Essa terá como consequência o aumento da fotocorrente[7], deixando a cinética mais lenta e fazendo com que a ChR2 (H134R) fique menos precisa do que ChR2. Estudos ainda revelam que, a ChR2 (H134R) possui a mesma permeabilidade iônica e a recuperação da sensibilidade como a ChR2 (LIN, 2012).

A utilização de ChR2 (H123R) é uma ferramenta padrão atualmente utilizada para induzir a estimulação de alta frequência, podendo chegar à condução de estimulação de até 200 Hz (MATTIS et al., 2012). Esta opsina é um canal de cátions que trabalha com uma ativação a 470 nm, sendo necessário 10ms para fechamento após desligamento da luz (Figura 14, pág.46).

- ChR2 (T159C)

ChR2(T159C) é outro exemplo de canalrodopsina-2. Essa mutação, assim como a ChR2 (H134R), resulta em um aumento de fotocorrente, deixando a cinética mais lenta. Estudos confirmaram que as amplitudes de corrente da ChR2(T159C), podem chegar a até 10 vezes mais que a ChR2 (BERNDT et al., 2010). Estudos recentes relatam que, em neurônios piramidais, ChR2 (T159C) exibiram consistentemente uma menor latência, ao longo de diferentes condições de estimulação (MATTIS et al., 2012). A principal diferença existente entre a ChR2(T159C) e a ChR2 (H134R) fica a cargo do tempo necessário para fechamento da opsina após desligamento da luz que chega a 26ms (Figura 14, pág.46).

- hChR2 (C128A)

hChR2(C128A) é uma variante do tipo *step function opsins (SFO)*. A inserção de C128A em ChR2 aumentará a sensibilidade à luz, porém como consequência

[7] Corrente fotelétrica.

ocorrerá um retardo da cinética, reduzindo as fotocorrentes. A taxa de encerramento do canal pode ser acelerada com a luz laranja. No primeiro estudo publicado sobre a ChR2/C128A como opsinas 'biestáveis', essas variantes foram usadas para induzir despolarização prolongada (LIN, 2012) .

Com a estabilização de variantes SFOs, neurônios específicos podem, em princípio, reforçar a despolarização em estado de repouso, na qual haveria a remoção da fonte de luz e o início de experimentos comportamentais ou fisiológicos e a completa ausência de luz ou de outros itens de hardware (YIZHAR et al., 2011).

Segundo Mattis et al. (2012), essas seriam as ferramentas mais adequadas para o recrutamento de volumes maiores de tecido, devido à extrema sensibilidade à luz. SFOs também são especialmente úteis para investigar o impacto de elevação do índice de disparo de uma população de neurônios definida, tais como as épocas de atividade persistente, observadas em sequências corticais e subcorticais de despolarizações (MATTIS et al., 2012).

Por se tratar de uma opsina SFO, este exemplo necessita, para sua ativação, de 470 nm, e, para a desativação, 590 nm, além de serem necessários 42s para fechamento após desligamento da luz (Figura 14, pág. 46).

4.3 Inibição com optogenética

Ao longo dos últimos dois anos, as halordopsinas foram ajustadas pela adição de uma série de sinais de tráfico para melhorar a sua abordagem na membrana citoplasmática.

A *Natromonas pharaonis halorhodopsin* (NpHR), foi a primeira ferramenta de hiperpolarização vista como eficaz em neurônios, este exemplar de opsina é uma uma bomba de cloreto ativada por luz amarela que está sendo usada agora em preparações, variando entre pedaços de cérebro de mamíferos (MATTIS et al., 2012). As bombas de prótons: Arch40 (de *Halorubrum sodomense*), ArchT41 (de *Halorubrum estirpe* TP009), eBR33 (de *Halobacterium*) e Mac40 (de *Leptosphaeria maculans*) atingiram recentemente a inibição neuronal (MATTIS et al., 2012).

Para as construções com o objetivo de inibição das populações, foram utilizados um exemplo de halordopsina que é a eNpHR3.0 e uma archeorhodopsinsa, a eArch3.0:

- eNpHR3.0

eNpHR3.0 é uma “halorodopsina que pode ser usada para conduzir a inibição pela luz amarela ou vermelha (com comprimentos de onda até 680 nm), tendo fotocorrentes maiores do que eNpHR 2.0” (MATTIS et al., 2012). Em investigação recente de precisão temporal de fotocorrentes de hiperpolarização, ao quantificar na cinética (τon) e cinética off (τoff) com início e o fim do pulso de luz de 1-s, todas as bombas (cloreto e prótons) ativaram rapidamente, porém as bombas de prótons foram ativadas significativamente mais rápidas do que eNpHR3.0 (MATTIS et al., 2012). A eNpHR3.0 é caracterizada por ser uma bomba de cloreto que necessita, para sua ativação, 590 nm e são necessários 4,2ms para fechamento após desligamento da luz (Figura 14, a seguir).

- eArch3.0

Enquanto NpHR é uma bomba de cloreto, a eArch3.0 é uma bomba de prótons (YIZHAR et al., 2011) que necessita, para sua ativação, 566 nm e são necessários 9ms para fechamento após desligamento da luz (Figura 14, a seguir). A eArch3.0 gera cerca de duas vezes mais fotocorrentes do que a eNpHR3.0. Segundo Mattis et al., (2012), “eArch3.0 reduz acentuadamente a marca intracelular e a localização da membrana com a rotulagem de processos celulares”.

A principal diferença entre eNpHR3.0 e eArch3.0 é que a eNpHR3.0 transcola para o citoplasma, enquanto a eArch3.0 explode prótons no espaço extracelular. Em outras palavras, eNpHR3.0 tem ação intracelular e a eArch3.0 tende para alcalinizar o citoplasma (YIZHAR et al., 2011). Em termos de perda de sensibilidade, a eArch3.0 tem um melhor desempenho sobre a eNpHR3.0 durante iluminação prolongada com a mesma potência óptica. A utilização de eNpHR3.0 pode afetar significativamente a transmissão sináptica durante e após a iluminação prolongada

do tecido (YIZHAR et al., 2011).

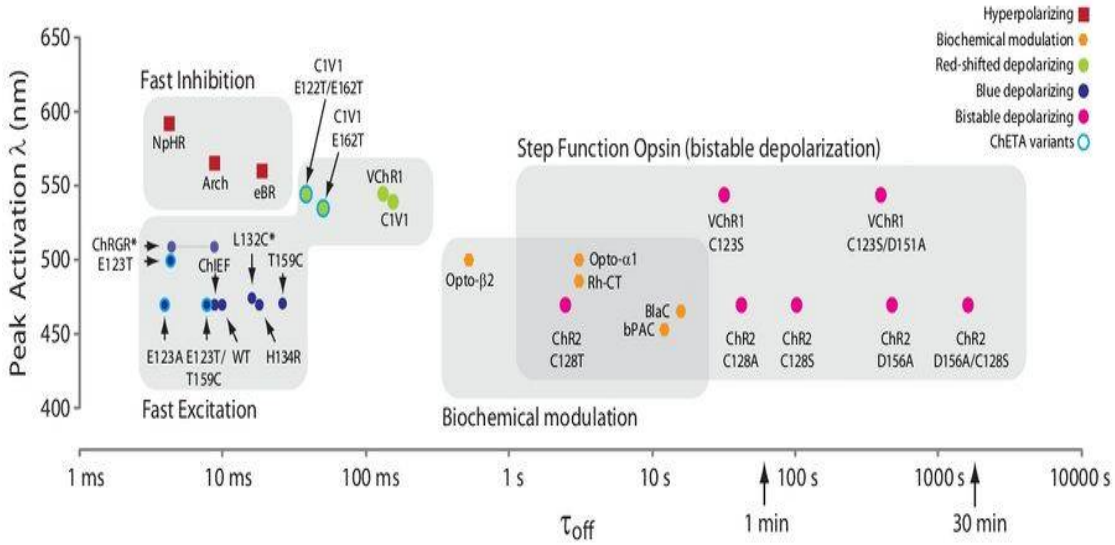

Figura 14 – Cinética e atributos espectrais de variantes bacteriorodopsina, halordopsinas e canalrodopsina.
Fonte: Yizhar et al., (2011).

4.4 Resultados Esperados

As três estratégias que foram utilizadas para a intervenção na obesidade, foram traçadas conforme revisão da literatura, na qual foi especulado que uma estimulação da população POMC/CART, o qual possui um efeito anorexígeno, ou a inibição da população NPY/AGRP, que possui um efeito orexígeno, poderiam conseguir um resultado satisfatório, com o objetivo proposto. A possibilidade de estimulação do neurônio POMC/CART e inibição o neurônio NPY/AGRP ao mesmo tempo pode ser uma estratégia viável, com uma flexibilidade de controle da resposta ao tratamento maior.

4.4.1. Estratégia 1 - Estimulação dos neurônios POMC/CART

A ativação de neurônios POMC/CART produz um efeito anorexígeno. Logo, espera-se que a expressão de ChR2 nesta estratégia hipotética possibilite uma maior secreção dos neuropeptídeos POMC e CART a fim de diminuir o apetite de indivíduos obesos. Nessa construção, o nível e sítio de expressão da opsina pode ser validada através de detecção de fluorescência verde. A expressão de ChR2

especificamente em neurônios POMC/CART e não em NPY/AgRP seria garantida através do promotor de POMC. Embora seja plausível se utilizar Lentivírus ou AVV, recomenda-se este último uma vez que o tamanho da construção não excede a capacidade de empacotamento dos adenovírus associados.

Construção: AAV- POMC-ChR2(H134R)-EGFP

OPSINA – A opsina ChR2(H134R) tem por particularidade um efeito excitatório, sendo necessária para sua ativação, como toda ChR2, uma onda de luz azul de 470 nm. O efeito excitatório esperado parece ser levemente maior que o uso da forma de ChR2 nativa, devido a uma menor taxa de dessensibilização e menor velocidade de fechamento do canal (NAGEL et al., 2005) (LIN et al., 2009).

FLUORESCÊNCIA – A fluorescência dessa construção seria determinada pela EGFP, de fluorescência verde com uma emissão máxima de 507 nm.

Construção: AAV- POMC- ChR2(T159C)- ECFP

OPSINA – Nesta construção, a opsina utilizada é a ChR2(T159C). Espera-se um efeito mais pronunciado pois essa opsina tem por particularidade um aumento da amplitude de fotocorrente (BERNDT et al., 2010).

FLUORESCÊNCIA – A fluorescência dessa construção seria determinada pela ECFP, de fluorescência azul com uma emissão máxima de 476 nm.

Construção: AAV- POMC- hChR2(C128A)- EGFP

OPSINA – hChR2(C128A) é uma opsina SFO (*step function opsin*s). Diferentemente das outras opsinas, em que a ativação é inibida assim que a luz é desligada, as SFOs são ativadas por apenas um único pulso luminoso azul (470 nm) de curta duração. Após o pulso, a SFO permanece ativada e só é desativada após um pulso de luz verde (542 nm). Logo, as SFOs “podem induzir estados de excitação **prolongada**, de maneira **estável**, sem a necessidade de fornecimento luminoso contínuo e, provavelmente, sem causar efeitos térmicos potencialmente danosos para os neurônios” (LIN, 2012). Por se tratar de uma opsina do tipo SFO, a sua utilização se justifica pela necessidade de efeitos mais pronunciados, devido à

possibilidade de efeitos prolongados sem o temor de efeito adverso da geração de energia térmica da luz.
FLUORESCÊNCIA – A fluorescência dessa construção seria determinada pela EGFP, de fluorescência verde com uma emissão máxima 507 nm.

4.4.2. Estratégia 2 - Inibição do neurônio NPY/AGRP

A ativação de neurônios NPY/AGRP produz um efeito orexígeno. Logo, espera-se que a expressão de NpHr nesta estratégia hipotética possibilite uma inibição dos neurônios NPY/AGRP afim de diminuir o apetite de indivíduos obesos. Nesta construção, o nível e sítio de expressão da opsina pode ser validada através de detecção de fluorescência vermelha ou amarela. A expressão de NpHr especificamente em neurônios NPY/AGRP e não em POMC/CART seria garantida através do promotor de NPY. Embora seja plausível se utilizar Lentivírus ou AVV, recomenda-se este último uma vez que o tamanho da construção não excede a capacidade de empacotamento dos adenovírus associados.

Construção: AAV- NPY- eNpHR3.0- mCherry
OPSINA – eNpHR3.0 teria por particularidade um efeito esperado inibitório, sendo necessária, para sua ativação, uma onda de luz vermelha de 590 nm. Espera-se dessa construção um resultado inibitório positivo, pois segundo Mattis et al., (2012), “eNpHR3.0 possui maior resposta à luz vermelha, permitindo o controle de tecidos mais profundos”.
FLUORESCÊNCIA – A fluorescência dessa construção seria determinada pela mCherry, de fluorescência vermelha com uma emissão máxima a 610 nm.

Construção: AAV- NPY- eArch 3.0- EYFP

OPSINA – Nesta construção em que utiliza-se a opsina eArch 3.0, tería também um efeito hipoteticamente inibitório, sendo necessária para a ativação a opsina uma onda de luz laranja de 566 nm. Espera-se um resultado satisfatório dessa construção, pois, conforme estudos recentes, “eArch3.0 é expresso muito mais fortemente baseado na fluorescência EYFP” (MATTIS et al., 2012).

FLUORESCÊNCIA – A fluorescência dessa construção seria determinada pela EYFP, de fluorescência amarela com uma emissão com uma emissão máxima de 527nm.

4.4.3. Estratégia 3 - Utilização da estratégia 1 e 2 em conjunto

Como discutido, a ativação de neurônios POMC/CART e a inibição de neurônios NPY/AgRP produzem um efeito anorexígeno. Logo, espera-se que a expressão de ChR2 em POMC/CART e NpHR em NPY/AgRP nessa estratégia hipotética possibilite uma maior secreção dos neuropeptídeos POMC e CART e diminuição dos neuropeptídeos NPY e AgRP a fim de causar saciedade em obesos. Nestas construções, o nível e o sítio de expressão da opsina pode ser validada através de detecção de fluorescência verde e vermelho, dependendo da opsina. Como foi dito, a expressão de ChR2 especificamente em neurônios POMC/CART e não em NPY/AgRP só seria garantida através do promotor de POMC e a expressão de NpHR especificamente em neurônios NPY/AgRP e não em POMC/CART só seria garantida através do promotor de NPY. Embora seja plausível se utilizar Lentivírus ou AVV, recomenda-se este último, uma vez que o tamanho da construção não excede a capacidade de empacotamento dos adenovírus associados.

Construção: AAV- NPY -eNpHR3.0- mCherry

Construção: AAV- POMC-ChR2(H134R)-EGFP

OPSINA – opsina inibitória eNpHR3.0 no neurônio NPY/AGRP, e a opsina excitatória ChR2(H134R) no neurônio POMC/CART. Nessas construções, espera-se um efeito anorexígeno, porém seriam necessários um pulso de luz de vermelha de 590 nm, para a ativação da eNpHR3.0, e um pulso de luz de azul de 470 nm, para a ativação da ChR2(H134R). Nessas circunstâncias, seria possível que as duas opsinas fossem ativadas de forma simultânea, provocando então um efeito anorexígeno “duplo”, que dure aproximadamente 4,2ms, após o desligamento da luz, pois este é o tempo de que a eNpHR3.0 necessita para o seu fechamento após o desligamento da cinética. Após esse tempo, o efeito anorexígeno deverá continuar somente no neurônio POMC, ao fato de que o tempo de fechamento da opsina ChR2(H134R) ser maior.

FLUORESCÊNCIA – A fluorescência na primeira construção seria determinada pela mCherry, de fluorescência vermelha com uma emissão máxima a 610 nm, enquanto na segunda construção seria determinada pela EGFP, de fluorescência verde com uma emissão máxima 507nm.

Construção: AAV- NPY- eNpHR3.0- mCherry
Construção: AAV- POMC- ChR2(T159C)- EGFP

OPSINA – opsina inibitória eNpHR3.0 no neurônio NPY/AGRP, e a opsina excitatória ChR2(T159C) no neurônio POMC/CART. Nessas construções, é esperado um efeito anorexígeno, no entanto seriam necessários um pulso de luz de vermelha de 590 nm, para a ativação da eNpHR3.0, e um pulso de luz de azul de 470 nm, para a ativação da ChR2(T159C). Em condições assim, seria possível que as duas opsinas fossem ativadas de forma simultânea, provocando então um efeito anorexígeno “duplo”, que se mantenha por cerca de 4,2ms, após o desligamento da luz, pois esse é o tempo de que a eNpHR3.0 necessita para o seu fechamento após o desligamento da cinética. Após esse tempo, o efeito anorexígeno deverá continuar somente no neurônio POMC, devido ao fato de que o tempo de fechamento da opsina ChR2(T159C) é um pouco mais demorado.
FLUORESCÊNCIA – A fluorescência na primeira construção seria determinada pela mCherry, de fluorescência vermelha com uma emissão máxima a 610 nm, enquanto na segunda construção seria determinada pela EGFP, de fluorescência verde com uma emissão máxima 507 nm.

Construção: AAV- NPY- eArch3.0- EYFP
Construção: AAV- POMC- ChR2(H134R)- ECFP

OPSINA – opsina inibitória eArch3.0 no neurônio NPY/AGRP, e a opsina excitatória ChR2(H134R) no neurônio POMC/CART. Nessas construções, espera-se um efeito anorexígeno, porém seriam necessários um pulso de luz de laranja de 566 nm, para a ativação da eArch3.0, e um pulso de luz de azul de 470 nm, para a ativação da ChR2(H134R). Nessas circunstâncias, seria possível que as duas opsinas fossem ativadas de forma simultânea, provocando então um efeito anorexígeno “duplo”, que

dure aproximadamente 9ms, após o desligamento da luz, pois este é o tempo de que a eArch3.0 necessita para o seu fechamento após o desligamento da cinética. Após este tempo o efeito anorexígeno deverá continuar somente no neurônio POMC, ao fato de que o tempo de fechamento da opsina ChR2(H134R) ser maior.
FLUORESCÊNCIA – A fluorescência na primeira construção seria determinada pela EYFP, de fluorescência amarela com uma emissão com uma emissão máxima de 527 nm, enquanto na segunda construção seria determinada pela ECFP, de fluorescência azul com uma emissão máxima de 476 nm.

Construção AAV- NPY- eArch3.0- EYFP
Construção: AAV- POMC- ChR2(T159C)- ECFP

OPSINA – opsina inibitória eArch3.0 no neurônio NPY/AGRP, e a opsina excitatória ChR2(T159C) no neurônio POMC/CART. Nessas construções, é esperado um efeito anorexígeno, no entanto seriam necessários um pulso de luz de laranja de 566 nm, para a ativação da eArch3.0, e um pulso de luz de azul de 470 nm, para a ativação da ChR2(T159C). Em condições assim, seria possível que as duas opsinas fossem ativadas de forma simultânea, provocando então um efeito anorexígeno “duplo”, que se mantenha por cerca de 9ms, após o desligamento da luz, pois esse é o tempo de que a eArch3.0 necessita para o seu fechamento após o desligamento da cinética. Após esse tempo, o efeito anorexígeno deverá continuar somente no neurônio POMC, devido ao fato de que o tempo de fechamento da opsina ChR2(T159C) é um pouco mais demorado.
FLUORESCÊNCIA – A fluorescência na primeira construção seria determinada pela EYFP, de fluorescência amarela com uma emissão máxima a 527 nm, enquanto na segunda construção seria determinada pela ECFP, de fluorescência azul com uma emissão máxima 476 nm.

4.5 Simulador Online

O simulador foi construído utilizando as linguagens de programação PHP, HTML, CSS e JavaScript, tendo como gerenciador de banco de dados o MySQL. Está hospedado pelo serviço de hospedagem da UOL e pode ser acessado pelo

endereço http://optosimulacao.com.br. A página inicial é apresentada conforme figura 15, há informações sobre a técnica de optogenética (Figura 16), e uma descrição sobre o simulador (Figura 17).

Figura 15 – Página inicial.

Figura 16 – Técnica da optogenética.

Figura 17 – Descrição do simulador.

Ainda dentro da página inicial é possível acessar a área de colaboração, conforme figura 18, na qual o usuário pode enviar contribuições através de um formulário para acrescentar nas simulações e nos possíveis resultados.

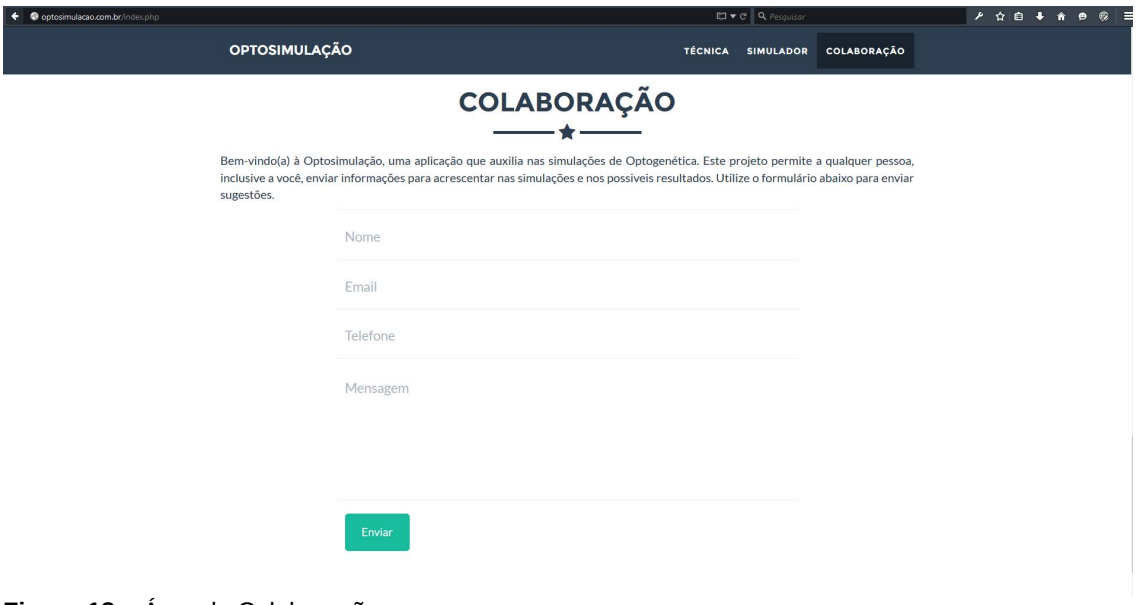

Figura 18 – Área de Colaboração.

A simulação da técnica foi dividida em 12 etapas (filtros) no simulador (Figura 19), sendo a primeira, a escolha do organismo, seguida de: escolha do sistema nervoso, órgão, região, estrutura, área, núcleos, população, promotor, opsinas, fluorescentes e vírus. O conteúdo desses filtros foi selecionado conforme a revisão bibliográfica, e então, foi feita a alimentação no banco de dados.

Na execução do processo de simulação, será verificado que, em algumas dessas etapas, existem opções pré-definidas devido ao objetivo do trabalho. Como exemplo dessas opções, temos a escolha do organismo, sistema nervoso, órgão, região, estrutura, área e núcleos, que estarão disponíveis para cada etapa: Camundongo, Sistema Nervoso Central, Encéfalo, Região Subcortical, Hipotálamo, Tuberal e Núcleo Arqueado, respectivamente. As opções disponíveis da população, promotor, opsinas, fluorescentes e vírus (Tabelas 2 a 6).

Figura 19 – Simulador.

Os resultados da simulação serão apresentados mostrando a população escolhida, a construção montada, as sequências do promotor, opsina e fluoróforo escolhido (Figura 20), o método optogenético e o efeito esperado da simulação (Figura 21).

Figura 20 – Tela de Resultados.

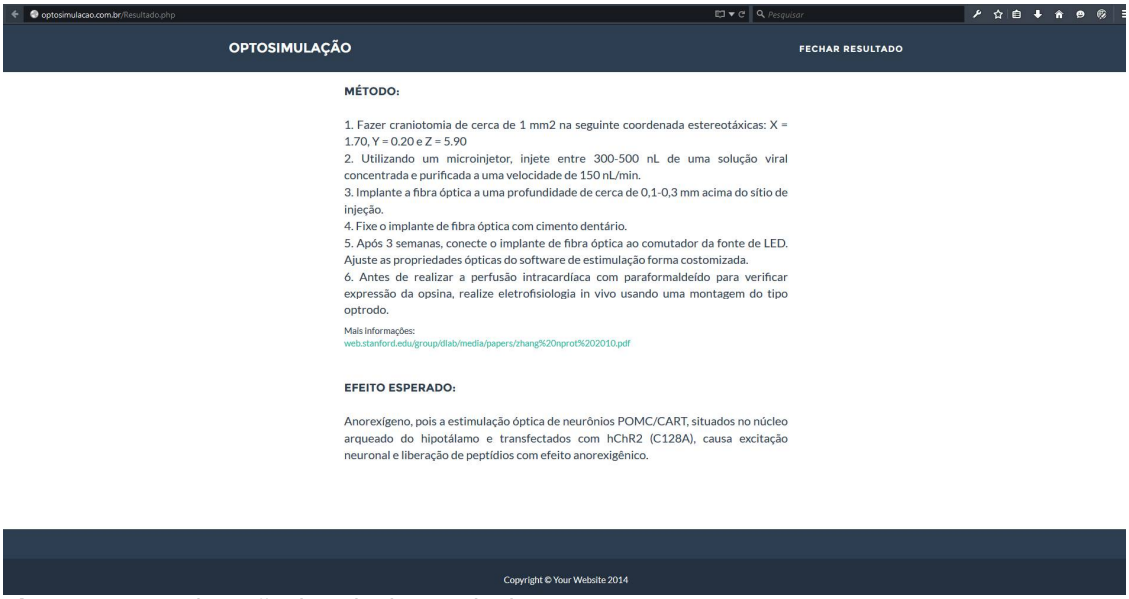

Figura 21 – Continuação da Tela de Resultados.

5. DISCUSSÃO

5.1 Estratégia 1 - Estimulação do neurônio POMC/CART

Para que a estimulação dos neurônios POMC/CART fosse conseguida, sugere-se a inserção de um promotor específico nas construções. Nesse caso, sugere-se a utilização do mesmo promotor que regula a expressão do gene *POMC*, aqui denotado como promotor POMC. De maneira geral, devem ser empregadas opsinas, que, quando estimuladas pelo comprimento de onda específico, produzam despolarização neuronal. Para visualização da expressão da opsina, foram sugeridos genes de proteínas fluorescentes com melhor performance documentada na literatura.

Com a utilização da opsina ChR2(H134R), ocorrerá um aumento na sensibilidade à luz, aumentando a sua fotocorrente e consequentemente deixando a cinética mais lenta. É possível verificar, que após uma sessão de luz, a opsina terá a sua ação estendida por até 10ms, tempo necessário para o seu fechamento após fim da estimulação óptica, fenômeno conhecido como “off kinetics”. Com a utilização de ChR2(T159C), assim como a ChR2 (H134R), ocorrerá um aumento de fotocorrente, deixando a cinética mais lenta. Porém, após o fim da estimulação óptica, haverá um tempo maior da abertura do canal de cátions, até o seu fechamento, podendo chegar até 26ms. Essas informações estão diretamente ligadas à intensidade de ação das opsinas sobre o neurônio, pois com a estimulação do neurônio POMC/CART, ocorrerá uma produção e posterior liberação de neuropeptídios anorexígenos como POMC e CART, que poderão levar a um potencial aumento do gasto energético e à probabilidade de perda de peso. Além dos neuropeptídios POMC e CART, haverá também a produção do hormônio anorexígeno estimulante de α-melanócitos (MSH) e da ativação dos receptores da melanocortina 3 e 4 (MC3/4R) (Figura 22, pág. 58) em neurônios de segunda ordem (KUMAR et al., 2010), que também contribuirão com o potencial aumento do gasto energético.

A utilização da opsina hChR2(C128A) que é uma variante do tipo *step*

function opsins (SFO), poderá causar uma maior intensidade de ação da opsina no neurônio, pois, após uma sessão de luz para sua ativação, o canal de cátions ficará aberto, até que ocorra uma outra sessão com frequência de luz distinta da anterior para sua desativação. Esse particular exemplo de opsina pode ser manipulado de acordo com a necessidade do indivíduo, porém, é interessante ressaltar, que a estimulação prolongada de um neurônio, deverá ser controlada de forma gradativa, pois apesar de os estudos mostrarem que as SFOs provavelmente não causarão efeitos térmicos potencialmente danosos para os neurônios (LIN, 2012), recomenda-se o monitoramento de temperatura com o intuito de prevenir o aquecimento, durante as sessões.

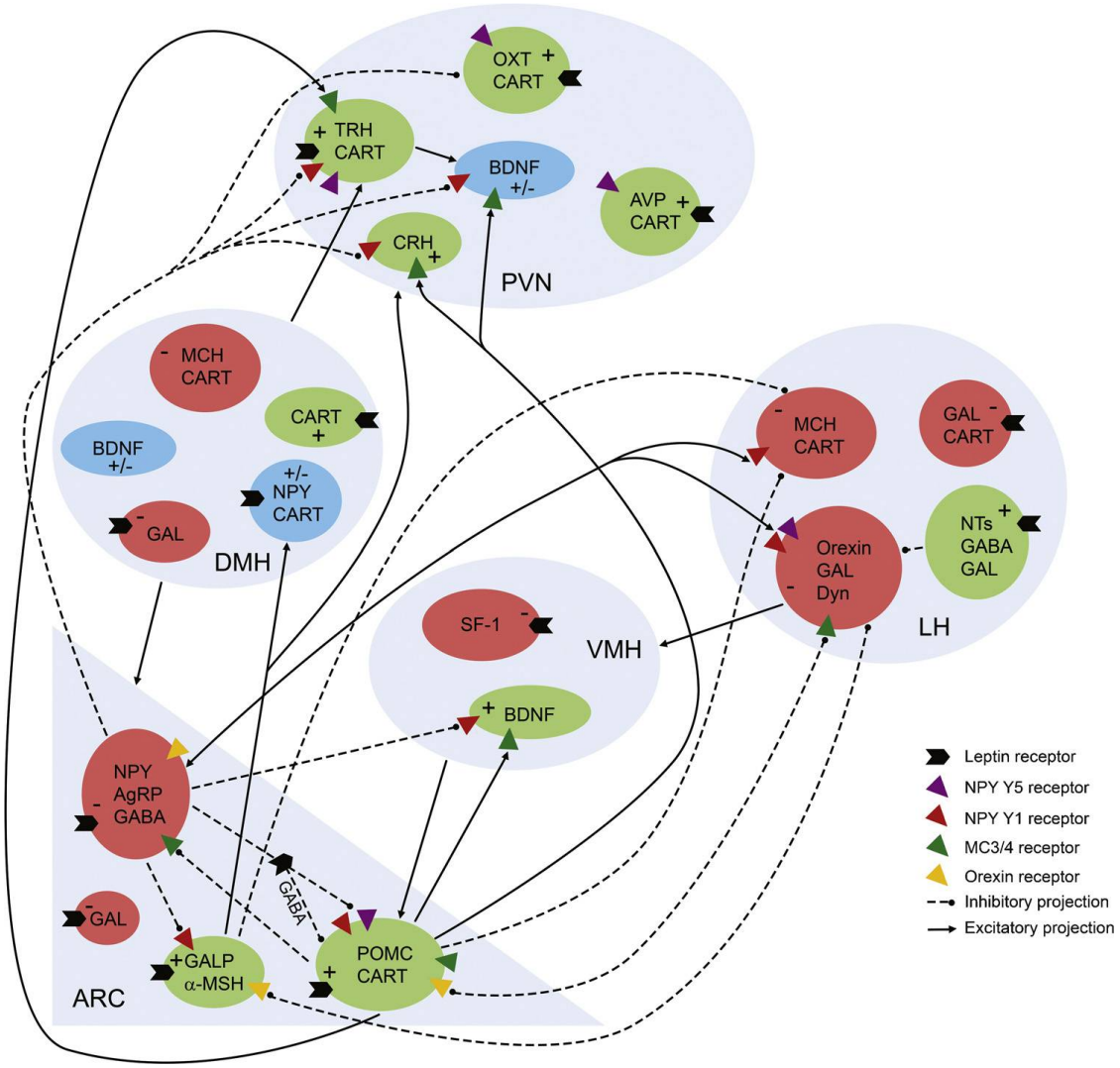

Figura 22 – Visão esquemática de receptores orexígenos e anorexígenos no hipotálamo.
Fonte: Van Swieten et al., (2014).

5.2 Estratégia 2 - Inibição do neurônio NPY/AGRP

Ao contrário da estratégia anterior, para atingir um efeito anorexígeno no indivíduo, é possível inibir os neurônios NPY/AGRP. Nesse caso, as construções devem usar um promotor específico NPY e opsinas que, quando estimuladas por um comprimento de onda específico de luz, inibam os neurônios transfectados. Para que ocorresse a visualização os neurônios transfectados, foram escolhidos genes fluorescentes que responderão às emissões de luz.

As construções com a opsina eArch3.0, conforme a literatura, possuem um melhor desempenho sobre as construções com eNpHR3.0, durante iluminação prolongada com a mesma potência óptica, pois a perda de sensibilidade à luz da eArch3.0, é mais lenta. Outro ponto interessante em comparação dessas duas opsinas fica a cargo do tempo de cinética após o desligamento da luz, pois a eArch3.0 fica mais tempo com o canal aberto (9ms) do que a eNpHR3.0 (4,2ms).

Com a utilização de opsinas com efeito de inibição, será esperado um efeito inibitório do neurônio NPY/AGRP. Espera-se que esse efeito iniba a ativação dos receptores Y1/5 nos neurônios secundários, por exemplo, na área hipotalâmica Lateral (Figura 22, pág. 58), cuja estimulação faz com que o animal aumente o apetite (MACHADO, 2000). Outro efeito esperado é a redução na ingestão de alimentos (efeito anorexígeno), tendo como objetivo uma perda de peso do indivíduo. Como a estimulação das opsinas utilizadas nessa estratégia, produz um resultado inibitório, os efeitos orexígenos tradicionalmente esperados pelo neurônio passaram a não existir, prevalecendo um efeito anorexígeno. Portanto também é possível que, com a utilização dessa estratégia, tenhamos uma intervenção satisfatória no combate à obesidade.

5.3 Estratégia 3 - Utilização da estratégia 1 e 2 em conjunto

Como foi abordado anteriormente, a possibilidade de estimular o neurônio POMC/CART, que possui características anorexígenas, e inibir o neurônio NPY/AGRP, que possui característica orexígena, ao mesmo tempo pode ser uma estratégia viável, a fim de conseguir resultados mais pronunciados na intervenção

terapêutica da obesidade. Para essa estratégia, é possível utilizar vírus carregando duas construções ao mesmo tempo: uma contendo promotor NPY–Opsina Inibitória e outra, promotor POMC–Opsina Excitatória. É importante frisar que essas construções devem conter diferentes proteínas fluorescentes para que o rastreamento de sua expressão seja feito de maneira diferencial. A utilização de promotores genéricos nessas situações poderia causar expressão de ambas construções tanto em POMC/CART, quanto em NPY/AGRP, o que provocaria estimulação e inibição da mesma população neuronal conforme o comprimento de onda empregado, podendo então não apresentar qualquer tipo de resultado no indivíduo, ou, apresentar efeitos contrários ao esperado, como, por exemplo, um aumento do apetite de maneira irregular.

Outro ponto que é importante ressaltar é que a utilização de opsinas do tipo SFO nessa estratégia pode não ser apropriada, devido a necessidade de outro pulso de luz para desativar a opsina. Essa ação poderia causar um maior aquecimento nas populações neuronais. A utilização dessa estratégia pode garantir um prolongamento maior do efeito anorexígeno, sendo então um tratamento hipotético da obesidade utilizando a optogenética.

É possível que a utilização das construções optogenéticas propostas alcance a estratégia terapêutica da saciedade, ou, pelo menos, uma considerável diminuição do apetite. É preciso salientar que esse efeito também pode ser obtido através da ação sobre outras subpopulações hipotalâmicas, embora o efeito de subpopulações fora do ARC sobre o apetite ainda seja de conhecimento limitado.

5.4 Impacto das estratégias

Através das revisões e estratégias hipotéticas, sugere-se que a utilização da técnica da optogenética como método terapêutico para tratamento da obesidade poderá ser útil, porém algumas considerações devem ser feitas quanto a esses trabalhos. Uma dessas considerações se deve ao fato de quão invasiva pode ser a cirurgia para o indivíduo, que pode causar danos estéticos e desconfortos com a utilização dos implantes.

Além disso seriam necessários equipamentos que fariam as emissões de luz nos períodos programados. Esses equipamentos deverão conter uma bateria, e, para que o tratamento possa ser feito de forma regular, seria necessária a implantação desses equipamentos no indivíduo para a execução dos pulsos de luz, o que tornaria ainda mais desconfortável a utilização.

Uma alternativa para esse problema poderia ser a liberação da luz através de marca-passos. Já existem trabalhos sendo feitos nesse sentido, como por exemplo o trabalho de Arrenberg et al. (2010), abordado anteriormente.

Outra alternativa que é a utilização de dispositivos sem fio, um estudo feito por Rossi et al., (2015), diz que “para reduzir o constrangimento imposto por meio de técnicas convencionais de optogenética sobre o comportamento livre”, foi desenvolvido “um estimulador LED cronicamente implantável que pode atingir qualquer região do cérebro”. Rossi et al., (2015) ainda diz que, “uma vez que a fonte de luz está localizado no interior do cérebro, esse sistema faz com que seja possível acionar remotamente os padrões complexos de estimulação em ratos, sem o incômodo de fibras ópticas que ligam o rato a um laser”.

Portanto é possível que, com a utilização dessas alternativas, possam ser programados os momentos exatos da liberação da luz, tornando então, a utilização dos equipamentos mais fácil de se administrar.

Outra forma de tratamento pode ser traçada, por exemplo, ao se utilizar a optogenética em conjunto com a leptina. A leptina é uma proteína composta por 167 aminoácidos produzida principalmente no tecido adiposo que também é responsável pelo controle do apetite no nível do hipotálamo.

A parte do tratamento que envolve a leptina deverá ser feita através de reposição hormonal, caso o indivíduo esteja com excesso de gordura. Caso o indivíduo esteja perdendo peso, o tratamento deverá se fazer com medicamentos para inibição da leptina. Isso se explica, pois, a leptina cria um ponto de referência usado para manter o peso do indivíduo, considerada então a responsável por regular

essa marcação, estimulando o apetite quando o indivíduo elimina gordura, porém se excede esse ponto, o hormônio é produzido para suprimir o apetite.

Os receptores de leptina estão presentes tanto no neurônio POMC/CART quanto no NPY/AGRP. Interessantemente, esses receptores, estimulam neurônios POMC/CART e inibem os NPY/AGRP, justificando seus efeitos anorexígenos (EDUARDA; ROMERO; ZANESCO, 2006).

Segundo Eduarda; Romero; Zanesco, (2006), “a liberação da leptina ocorre durante a noite e às primeiras horas da manhã, tendo sua meia-vida plasmática uma duração de 30 minutos”. Diante disso, é possível que a estimulação optogenética do neurônio POMC/CART pela noite, poderia intensificar os resultados anorexígenos. Nessas condições, a estratégia optogenética de inibição de neurônios NPY/AGRP também seria interessante. Para a utilização dessa estratégia, recomenda-se que os estudos clínicos tenham total monitoramento da dieta dos indivíduos para evitar complicações decorridas de má alimentação.

Uma terceira situação seria como monitorar se o cérebro estaria aquecendo com o tratamento, e, em reposta a isso, poderia ser implantado junto com a fibra óptica, um termômetro para monitoramento do aquecimento do cérebro. Um exemplo de pesquisa envolvendo fibra óptica e monitoramento de temperatura é o trabalho feito por Fedotov, Belousov, Zheltikov, (2015), no qual utilizaram conhecimentos de termometria nas aplicações com fibra óptica, com intuito de controlar a temperatura das células nos experimentos com fibra óptica.

Como todo tratamento, é necessário um acompanhamento do indivíduo. É importante que no seu início ocorra um acompanhamento mais intensivo, talvez semanal, pois é possível que os efeitos do tratamento sejam tão intensos a ponto de causar perda total do apetite, e serem nocivos ao indivíduo, principalmente levando em conta os diferentes perfis cinéticos das opsinas.

Em caso de comportamento bem-sucedido, o que só a comprovação experimental poderia avaliar, recomenda-se a observação em espaços maiores a fim

de medir o resultado dos trabalhos. Uma última situação que deve ser abordada seria o impacto social, de utilização da técnica, pois, por mais benéfico e promissor que o tratamento possa parecer, há sempre uma dúvida quanto à aceitação da população com a ideia de “manipulação” do cérebro como tratamento de doenças, o que em alguns casos pode até ser pertinente, pois até que ponto uma nova tecnologia pode ser benéfica? Este tipo de questionamento também pode ser aplicado a algo mais difundido, como o uso de medicamentos, que, em alguns casos, encontra-se “a ocorrência de interações medicamentosas, algumas responsáveis por agravos na condição de saúde de seus usuários” (SILVA et al., 2004).

5.5 Simulador

Para a construção deste simulador, foram utilizadas técnicas de programação, adquiridas na academia. As linguagens de programação utilizadas contribuem para uma melhor interação com usuário, pois este, mesmo sem nenhum prévio conhecimento do simulador, consegue atingir seus objetivos com facilidade. O intuito de deixar o ambiente interativo parte de alguns dos princípios da usabilidade[8], como por exemplo a facilidade de uso e a eficiência de uso. Por se tratar de uma aplicação voltada para web, qualquer pessoa poderá ter acesso a este sistema, desde que tenha acesso a *internet*, pois foi construída de maneira responsiva, a fim de atingir qualquer tipo de equipamento eletrônico que possui navegação na internet, conforme a demanda de tecnologia atual.

As informações coletadas para a construção do simulador, bem como, os resultados esperados, foram tratadas a partir das revisões bibliográficas efetuadas neste trabalho, em que foram escolhidas as informações que mais se adaptavam ao objetivo da pesquisa. O simulador permite que os usuários enviem sugestões de incremento de dados para a simulação, o que facilitaria um ganho de proporção das situações que podem ser tratadas com a utilização dessa ferramenta, pois pode-se, a partir daí, simular trabalhos que fogem do propósito inicial da ferramenta, por exemplo, a simulação de optogenética para tratamento de outras doenças, sendo

[8] Capacidade do software de ser compreendido, aprendido, usado e apreciado pelo usuário, quando usado nas condições especificadas.

necessária apenas a inserção das informações essenciais para a construção.

A ideia da construção do simulador surgiu para que fosse possível trabalhar estratégias hipotéticas de experimentos optogenéticos. É importante ressaltar que durante o seu desenvolvimento, a maior preocupação foi quanto à escolha dos dados que iriam compor o banco de dados: organismo, sistema nervoso, órgão, região, estrutura, área e núcleos, população, promotor, opsinas, fluorescentes e vírus. As escolhas pelos dados apresentados se validam de acordo com a revisão da literatura realizada, portanto, pode-se dizer que, para o principal objetivo deste trabalho, os dados dispostos são uma opção aceitável para as simulações.

Qualquer simulador tem como principal característica a possibilidade de errar sem grandes danos, e não seria diferente para este trabalho, a possibilidade de testar, mesmo que hipoteticamente, um experimento poderia ser de grande valia para os pesquisadores. Além dessa vantagem, poderíamos salientar uma redução de custos e de tempo para as pesquisas, visto que o processo de optogenética é custoso para o pesquisador e demanda tempo. Com o simulador, isso poderia ser reduzido, pois o resultado teórico esperado sairia de forma instantânea e com custos quase nulos. Um outro benefício que podemos notar com a construção de um simulador de optogenética seria uma divulgação maior dos trabalhos, podendo chegar a novos pesquisadores que não têm tecnologia suficiente para reproduzir os experimentos em seus ambientes de trabalho, levando a uma esfera maior de pessoas os conhecimentos sobre essa técnica.

Apesar das vantagens apresentadas, tem-se algumas desvantagens quanto à utilização de um simulador, como por exemplo, mesmo que possamos simular de forma fidedigna o experimento, não é possível garantir o seu funcionamento in vivo, portanto os trabalhos com abrangência real, deverão ser cautelosos mesmo com o resultado esperado vindo de um simulador. Outra limitação seria a fidelidade das informações que serão inseridas no simulador, pois, como foi dito, trata-se de um sistema que permite o envio de informação que possam se acrescentar ao simulador por qualquer usuário, não garantindo assim, que todas as informações inseridas estão corretas e validadas.

6. CONCLUSÃO

Durante o desenvolvimento do trabalho, foi verificado que existem muitos neurotransmissores e estruturas do SNC que participam na regulação do comportamento alimentar. Estudos e experimentos mostraram que o hipotálamo é um dos sítios funcionais da integração nutricional, recebendo informações que se originam em órgãos periféricos a partir de metabólitos, hormônios e outros peptídeos circulantes. Foi dado destaque no trabalho aos núcleos e populações neuronais que estão relacionados com funções reguladoras do apetite e saciedade, o que serviu de base para a compreensão das estratégias teóricas de intervenção terapêutica na obesidade.

A revisão indicou que é possível estimular neurônios específicos, para que possam evidenciar as suas características, a fim de conseguir um objetivo. Com a utilização de optogenética para estimulação do neurônio POMC/CART que possui características anorexígenas e a inibição do neurônio NPY/AGRP que possui característica orexígenas, foram traçadas estratégias para uma possível intervenção na obesidade. Para a construção destas estratégias, foram utilizados genes opsina de interesse que são dirigidos por promotores que determinam o subtipo celular modulado.

As opsinas escolhidas para a execução do trabalho, mostraram a partir de revisões bibliográficas, que podem desempenhar bem suas ações nas subpopulações específicas, desde que os promotores utilizados sejam específicos para as regiões, o que torna mais complicada a implementação do experimento, pois a existência de informações de promotores que podem atuar nos neurônios POMC/CART e NPY/AGRP ainda é escassa, e a utilização de promotores genéricos poderia ou não atingir os neurônios escolhidos, resultando em trabalhos insatisfatórios.

A técnica de optogenética pode ser útil no combate à obesidade, pois, com a execução dos experimentos, é possível atingir neurônios que conforme a literatura, estão diretamente envolvidos em funções reguladoras do apetite e saciedade,

ficando a cargo então do pesquisador encontrar a melhor estratégia para ser utilizada em cada caso de obesidade.

A realização da técnica de optogenética é muito invasiva, e para que seja realizada, é necessário cirurgia e implantes de equipamentos para as estimulações, o que torna o procedimento mais trabalhoso, demorado e custoso para os pesquisadores. Nesse sentido, a criação de uma ferramenta para simular os efeitos esperados da optogenética pode reduzir o tempo de trabalho e custos para a pesquisa, além de uma divulgação maior dos trabalhos, podendo atingir novos pesquisadores que poderão conhecer e/ou intensificar as pesquisas sobre a optogenenética, o que resultaria em avanços tecnológicos e uma troca de conhecimentos e experiências entre os pesquisadores.

A disponibilização de uma ferramenta online de simulação resultados esperados da técnica optogenética, mostrou que é possível simular efeitos biológicos teóricos, a partir de uma modelagem teórica da intervenção optogenética nos neurocircuitos candidatos.

Com o propósito desse trabalho, pode-se otimizar o estudo da optogenética no Brasil, assim como discutir estratégias para o uso terapêutico da optogenética, tendo a obesidade como protótipo. O presente estudo abordou ainda a disseminação de informação sobre os problemas de saúde pública e como a tecnologia da informação pode ser capaz de ajudar no combate a distúrbios alimentares. Espera-se que venha a aumentar cada vez mais a utilização de tecnologia da informação no combate a problemas de saúde pública.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, G. **O que são Linguagens de Programação**. Disponível em: <http://www.infoescola.com/informatica/o-que-sao-linguagens-de-programacao>. Acesso em: 14 de abril de 2015.

APLICAÇÕES, W. D. E. **HTML & CSS**. Disponível em: <http://www.w3.org/standards/webdesign/htmlcss>. Acesso em: 29 de junho de 2015.

ARRENBERG et al. **Optogenetic control of cardiac function**. Science, 2010.

BENTO, E. J. **Desenvolvimento web com PHP e MySQL**. 1.ª ed., 2013.

BERNDT et al. **High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels**, 2010.

BERTHOUD, H. R. **Interations between the "cognitive" and "metabolic" brain in the control of food intake**. Elmsford: Physiol. Behav, 2007.

BI et al. **Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration**. Neuron, 2006.

BIO, S. R. **Sistemas de Informação Um Enfoque Gerencial**. 2.ª ed. São Paulo, 2008.

BOYDEN et al. **Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity**. Nature neuroscience, 2005.

BRUYNE et al. **Dinâmica da pesquisa em ciências sociais**. Rio de Janeiro, 1977.

CROSSMAN, NEARY, D. **Neuroanatomia Ilustrada**. 4.ª ed. Elsevier, 2011.

CZEPIELEWSKI, M. . **Obesidade**. Rio de Janeiro, 2001.

DAMIANI et al. **Controle do apetite: mecanismos metabólicos e cognitivos**. São Paulo, 2010.

DOUGHERTY, P. **Homeostasis and Higher Brain Function**. Disponível em: <http://neuroscience.uth.tmc.edu/s4/chapter04.html> Acesso em: 22 de outubro de 2015.

EDUARDA, C.; ROMERO, M.; ZANESCO, A. **O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade**. v. 19, 2006.

ELMASRI, R. NAVATHE, S. B. **Sistema de Banco de Dados**. 6.ª ed. São Paulo, 2011.

FEDOTOV, A. B.; BELOUSOV, V. V; ZHELTIKOV, A. M. **Fiber-optic control and thermometry of single-cell thermosensation logic with NV-centers**. Nature Publishing Group, 2015.

FENNO et al. **The development and application of optogenetics**. Neuroscience, 2011.

FRANDSEN et al. **Long term follow up of patients who underwent jejunoileal bypass for morbid obesity**. Eur. J. Surg, 1998.

FREIRE, A, B. **Saúde e Redução Alimentar**. São Paulo, 2005.

GALE, S. M.; CASTRACANE, V. D.; MANTZOROS, C. S. **Grelina e Controle da Energia de Homeostase**. NewsLab, 2004.

GOMES, L. C. **EDUCAÇÃO ALIMENTAR PARA PREVENIR A OBESIDADE**. RIO DE JANEIRO, 2004.

GUYTON, A.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Elsevier, 2006.

HEISLER et al. **Serotonin activates the Hipotalamic-Pituitary-Adrenal Axis via Serotonin 2C receptor stimulation**. J. Neurosci., Baltimore, 2007.

HINES, S. **Words into action-promoting successful weight loss in overweight patients**. JAAPA, 2004.

INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA UFRJ. **Promotores**. Disponível em: <http://www2.bioqmed.ufrj.br/prosdocimi/RNA/promotores.htm>. Acesso em: 12 de novembro de 2015.

KLEIBOER, M. **Simulation methodology for crisis management support.** Journal of Contingencies and Crisis, 1997.

KORNER, J. ARONNE, L. J. **Pharmacological approaches to weight reduction: Therapeutic targets**. J. Clin. Endocrinol. Metab, 2004.

KRUEGER et al. **Optogenética e estimulação óptica neural: estado atual e perspectivas**. Scielo, 2012.

KUMAR et al. **Robbins & Cotran PATOLOGIA Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier, 2010.

LANDEIRO, F. M.; QUARANTINI, L. D. C. **Obesidade : Controle Neural e Hormonal do Comportamento Alimentar**. R. Ci. med. biol., Salvador, 2011.

LENT, R. **CEM BILHOES DE NEURONIOS?** 2.ª ed. Atheneu, 2010.

LIN, J. Y. **A User's Guide to Channelrhodopsin Variants: Features, Limitations and Future Developments**. Department of Pharmacology, University of California, 2012.

LIN et al. **Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics**. Biophys J, 2009.

LOPES, S. G. B. C. **Introdução à biologia e origem da vida, citologia, reprodução e embriologia, histologia**. Saraiva ed. São Paulo, 2002.

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. Atheneu, 2000.

MANCINI, M. C.; HALPERN, A. **Tratamento Farmacológico da Obesidade**. Scielo, 2002.

MANCUSO et al. **Optogenetic probing of functional brain circuitry**. Experimental Physiology, 2011.

MATSUNO-YAGI, A. MUKOHATA, Y. **Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of Halobacterium halobium differing in pigmentation**. Biochem. Biophys, 1977.

MATTIS et al. **Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins**. Nat Methods, 2012.

MCINNES et al. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 6.ª ed. Guanabara Koogan, 2002.

MÖGLICH, A. M. K. **Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools**. Photochemical & Photobiological Sciences, 2010.

NAGEL et al. **Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of Caenorhabditis elegans triggers rapid behavioral responses**. Curr Biol, 2005.

NAGEL et al. **Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae**. Science, 2002.

NEARY, N.; BLOOM, A.; STEPHEN, R. **Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus**. Clin Endocrinol (Oxf). 2004.

O'BRIEN, J. A. **Sistemas de Informação e as Decisões Gerenciais na era da Internet**. São Paulo, 2004.

PISTON, et al. **Introduction to Fluorescent Proteins**. Disponível em: <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/fpintro.html> Acesso em: 30 de outubro de 2015.

RODRIGUES, A. M. et al. **Implicações na Gênese da Obesidade**. São Paulo: Arq Bras Endocrinol Metab, 2003.

ROEHE, P. **CURSO DE VIROLOGIA BÁSICA**. Disponível em: < http://www.ufrgs.br/labvir/material/poligrafo1.pdf>. Acesso em: 11 de setembro de 2015.

ROSSI et al. **A wirelessly controlled implantable LED system for deep brain optogenetic stimulation**. Frontiers in Integrative Neuroscience, 2015.

SANTOS A, L. **Estratégias de Prevenção da Obesidade**. Rio de Janeiro, 2007.

SAÚDE, O. M. DA. **Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10 – descrições clínicas e diretrizes diagnósticas**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993.

SILVA, M. **Problemas com a utilização de medicamentos – estudo piloto em hospital psiquiátrico do Rio de Janeiro**. Rev. Bras. Farm, 2004.

SILVA, M. S. **Criando Sites com HTML Sites de Alta Qualidade com HTML e CSS**. Novatec. São Paulo: 2008.

SILVA, M. S. **JavaScript Guia do Programador**. Novatec, 2010.

SILVA, M. S. **CSS3 DESENVOLVA APLICAÇÕES WEB PROFISSIONAIS COM O USO DE PODEROSOS RECURSOS DE ESTILIZAÇÃO DAS CSS3**. 1.ª ed.

Novatec. São Paulo, 2012.

TYE, K. M.; DEISSEROTH, K. **Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models**. Nature reviews. Neuroscience, 2012.

VAN SWIETEN, M. M. H. et al. **The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus**. Journal of chemical neuroanatomy, 2014.

WARD et al. **Effects of a Cannabinoid1 receptor antagonist and Serotonin2C receptor agonist alone and in combination on motivation for palatable food: a dose-addition analysis study in mice**. Endocrinology. Baltimore: 2008.

WEIZMANN, I. OF S. **GeneCards: The Human Gene Database**. Disponível em: <http://www.genecards.org/>. Acesso em: 26 de setembro de 2015.

WELLING, L. THOMSON, L. **PHP e MySQL Web Development**. 4.ª ed. Pearson, 2009.

YIZHAR et al. **Optogenetics in neural systems**. Neuron, 2011.

ZHANG et al. **Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures**. Nature protocols, 2010.