PRYSCILA DRYELLE SOUSA TEIXEIRA

**ADAPTAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA
GESTAÇÃO E LACTAÇÃO: PAPEL DA VIA DE
SINALIZAÇÃO DO STAT5 OU DO HORMÔNIO DO
CRESCIMENTO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-
USP) para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

PRYSCILA DRYELLE SOUSA TEIXEIRA

**ADAPTAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA
GESTAÇÃO E LACTAÇÃO: PAPEL DA VIA DE
SINALIZAÇÃO DO STAT5 OU DO HORMÔNIO DO
CRESCIMENTO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-
USP) para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

Pryscila Dryelle Sousa Teixeira

Adaptações Metabólicas Induzidas pela Gestação e Lactação: Papel da Via de sinalização do STAT5 ou do Hormônio do Crescimento no Sistema Nervoso Central

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Donato Júnior

Versão Corrigida

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Sousa Teixeira, Pryscila Dryelle

Adaptações Metabólicas Induzidas pela Gestação e Lactação: Papel da Via de sinalização do STAT5 ou do Hormônio do Crescimento no Sistema Nervoso Central / Pryscila Dryelle Sousa Teixeira; orientador Jose Donato Junior. -- São Paulo, 2019.

112 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Balanço Energético. 2. Gestação. 3. Hormônios. 4. Programação Metabólica. 5. Sinalização Neuronal. I. Donato Junior, Jose , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Pryscila Dryelle Sousa Teixeira

Título da Tese: Adaptações Metabólicas Induzidas pela Gestação e Lactação: Papel da Via de sinalização do STAT5 ou do Hormônio do Crescimento no Sistema Nervoso Central

Orientador: Jose Donato Junior

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ____/____/____, considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Estudo do controle neuroendócrino do peso corporal e da ingestão alimentar na infância e período pós-gestacional de camundongos*", registrado sob o protocolo nº **79/2015**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **25/11/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Jose Donato Junior**

- Membros da Equipe: *Angela Maria Ramos Lobo, Thaís Zampieri, Isadora Clivatti Furigo, João Alfredo Bolivar Pedroso, Ana Maria P. Campos, Priscila Dryelle Sousa Teixeira, Tiago Eugênio Oliveira da Silva*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Study of the neuroendocrine control of body weight and food intake in childhood and post- pregnancy mice*", protocol nº **79/2015**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **11/25/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Jose Donato Junior**

- Team members: *Angela Maria Ramos Lobo, Thaís Zampieri, Isadora Clivatti Furigo, João Alfredo Bolivar Pedroso, Ana Maria P. Campos, Priscila Dryelle Sousa Teixeira, Tiago Eugênio Oliveira da Silva*

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57bl/6	Fêmea/female	10 dias/days	120
	C57bl/6	Macho/male	10 dias/days	120
	C57bl/6 sem mutação	Fêmea/female	02 meses/months	120
	NESTINcre/STAT5flox/flox	Fêmea/female	02 meses/months	120
	db/db LepR	Fêmea/female	10 dias/days	180
	db/db LepR	Macho/male	10 dias/days	180
	LepRcre/Tomato-reporter	Fêmea/female	10 dias/days	180
	LepRcre/tomato-reporter	Macho/male	10 dias/days	180

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

*Aos meus pais e irmãos que são todo o suporte e amor
A tio Salvador, o primeiro a me dar o título de doutora, espero que
você saiba de onde estiver*

AGRADECIMENTOS

A inteligência suprema do universo, causa primária de todas as coisas.

A meus pais, sem vocês nada seria. A meus irmãos, com vocês tivemos a primeira lição de que todo trabalho deve ser para o bem coletivo. Vocês minha família, me mostram que distância e saudade não limitam em nada nossa capacidade de amar mais e construir sempre.

À Universidade de São Paulo, pelos sete anos que até agora vivi, aprendi e cresci. Esta contribuição é imensurável.

Ao meu orientador, José Donato por me receber em seu laboratório e ter me dado grande número de oportunidades de crescimento, aprendizado e trabalho, muito trabalho. Sou muito grata!

Ao Instituto de Ciências Biomédicas, ao Departamento de Fisiologia e Biofísica, particularmente ao programa de pós-graduação em Fisiologia Humana e Biofísica, pela estrutura, suporte e possibilidade de desenvolver meu trabalho.

Aos professores do departamento que compartilharam seus conhecimentos e me ajudaram sempre que necessário: Wagner Antunes, Andréa Beltrão, William Festuccia, Angelo Carpinelli, Thiago Moreira e Carla Carvalho. Tenha sido no laboratório, no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, nas reuniões de conselho que tive a oportunidade de participar como representante discente ou nos cursos de ministrados para a comunidade externa à USP. Aos funcionários do departamento pela organização: Leila Affini, Paloma Nunes e José Maria.

Às orientadoras anteriores: Raquel Simões, pelo exemplo, incentivo e orientação. Célia Colli, por seu conhecimento, cultura e pelas oportunidades. A todos os professores que tive, que me foram exemplo de que a educação é o melhor caminho de evolução.

Ao companheiro que esteve a me incentivar, apoiar e torcer por toda esta jornada acadêmica, sobretudo grande amigo. Erick, por todo incentivo, paciência, companheirismo e amor. Você é luz e exemplo de dedicação, persistência e honradez.

Angie, *mocita* obrigada por compartilhar conhecimento, pelo incentivo e apoio, por cada conversa, por todas as risadas, amizade, companheirismo e os momentos dentro e fora do lab.

Aos meus amigos: Dado, você é a família que São Paulo trouxe, a USP uniu e nós escolhemos amar, obrigada por tudo. Gabu, por sua energia, luz e alegria. Vinícius e Thiago, compomos um trio de estímulo intelectual e exemplo de amizade

sólida. Às “raqueletes” que são exemplos profissionais e mostram que a diferença faz a força. Diva, obrigada desde a graduação e pela convivência em São Paulo e por cada reencontro. Ana Lina, por tanto carinho e apoio maternal. Vivi, pelo incentivo, torcida e exemplo. Às preces e apoio dos amigos do CEUF. Aos filhos de quatro patas, Sandy e Junior por serem um bálsamo de alegria diária.

À Gabriela e Grupo Phorte pela confiança depositada e me dar a oportunidade de levar meu amor pela docência para sala de aula, foi um grande suporte e aprendizado entre o mestrado e doutorado. A todos que foram meus alunos, que me deram oportunidades diversas de aprender mais. À Marcela por toda semana, em cada aula de yoga, ter sido um ponto de equilíbrio e refazimento. Ao Grupo Maria de Magdala pela acolhida. Ao grupo do CREA+ pelo exemplo de dedicação à educação e oportunidade de trabalho conjunto.

Aos amigos e colegas de laboratório, vocês fizeram o trabalho mais fácil, leve e animado: Angie, Isa, João, compusemos um incrível quarteto. Paula, pela alta compatibilidade de energia, pela amizade e apoio! Fred, pela trilha sonora e animação, Will (pelo pão), Gi, Fer e Gabriel pelas conversas e risadas. Aninha, por toda ajuda, suporte técnico, alegria vibrante, cafés e principalmente por como me recebeu no laboratório. Marina, pelo exemplo, incentivo e carinho. Tábata, pelas colaborações e oportunidade de compor um grupo incrível de divulgação científica. Isa, por ensinar e ser exemplo de trabalho focado, por ter sido paciente (nos dois sentidos), amiga e companheira de yoga. Moranguito, pela amizade, incentivo, memes, carinho, apoio e atenção.

A todos que me deram um suporte visível ou invisível, direto ou indireto.

Às vidas transformadas nestes experimentos, meu respeito e agradecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. E do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) agradeço pelo suporte financeiro (Processo:160186/2015-3), desde à iniciação científica, mestrado e doutorado.

“Considera o trabalho o melhor meio para progredir.”

Joanna de Ângelis

RESUMO

TEIXEIRA, P.D.S. **Adaptações metabólicas induzidas pela gestação e lactação: papel da via de sinalização do STAT5 ou do hormônio do crescimento no Sistema Nervoso Central.** 2019. 110 fl. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2019.

A gestação e lactação promove grande número de adaptações metabólicas no organismo feminino, que envolvem alterações na regulação do balanço energético e homeostase glicêmica, de forma a suprir a nova demanda energética requerida para manutenção da prole. Pouco se sabe das consequências a longo prazo desse grande número de adaptações para o organismo materno e os mecanismos neurais e moleculares envolvidos ainda precisam ser elucidados. O primeiro objetivo (E1) da presente tese foi determinar se a experiência da gestação, seguida ou não da lactação, é capaz de induzir alterações metabólicas permanentes na fêmea e compreender a participação da via de sinalização neural (STAT5) nestas adaptações. O segundo objetivo (E2) foi investigar o papel da sinalização do hormônio do crescimento (GH) no sistema nervoso central (SNC) frente às adaptações fisiológicas e metabólicas durante a gestação. No E1 fêmeas controles e com deleção tecido específica dos genes *Stat5a/b* no sistema nervoso (*Nestin^{Cre}/STAT5^{flox/flox}*) foram acompanhadas por um tempo médio de 25 semanas (entre gestação e período pós-gestacional), estas fêmeas foram distribuídas em três grupos para os dois genótipos estudados: Virgens (Vir), Gestação (Gest) e Gestação com Lactação (G+L). As fêmeas do grupo Gest eram mais pesadas que as controles e as G+L tiveram peso corporal ainda maior ao longo de todo acompanhamento quando comparadas a dos outros grupos, um padrão semelhante foi observado nas fêmeas *Nestin/STAT5*, porém as fêmeas G+L foram mais pesadas somente até a 10ª semana pós-gestacional. As fêmeas dos grupos experimentais tiveram maior reserva adiposa periuterina (G+L e Gest KO), as do grupo G+L deambularam menos, enquanto as Gest KO tiveram menor gasto energético (VO_2). Foi identificada redução do número de histona 3 (H3) acetilada nos núcleos ARC e VMH do hipotálamo das fêmeas G+L quando comparadas às Vir. Tal observação sugere que a lactação promove modificações epigenéticas hipotalâmicas a longo prazo. Notavelmente, a ablação de STAT5 no cérebro preveniu as alterações metabólicas e epigenéticas previamente observadas em fêmeas do tipo selvagem com experiência reprodutiva. As fêmeas KO dos grupos experimentais tiveram maior sensibilidade à insulina, melhor tolerância à glicose, menor consumo alimentar em teste de sensibilidade aguda à leptina e menor expressão gênica hipotalâmica de AgRP, NPY, maior de CISH, PRLr e ER α . Estes resultados indicam que a gestação seguida de lactação promove alterações permanentes no metabolismo da fêmea e estas alterações parecem estar relacionadas com a ativação central da via STAT5, uma vez que as fêmeas nocaute neuronal deste gene tiveram alterações não observadas entre as fêmeas controles. No E2 foram utilizadas fêmeas de dois diferentes modelos de deleção gênica do receptor de GH (GHR): neuronal (*GHR^{flox/flox}/Nestin^{Cre}*) e de células que expressam receptor de leptina (*GHR^{flox/flox}/LepR^{Cre}*). As fêmeas foram acasaladas e, quando identificado o primeiro dia de gestação, foram individualizadas para avaliação. As fêmeas *GHR/Nestin* grávidas tiveram maior ganho de peso e menor adiposidade no fim da gestação, maior sensibilidade à insulina (ITT), menores concentrações séricas de insulina e leptina, enquanto as concentrações de IGF-1 estavam maiores durante a gestação. A deleção do GHR em células com receptor de leptina implicou em maior consumo de ração, sem alterar ganho de peso, menor adiposidade em todos os períodos avaliados, melhor tolerância à glicose, maior sensibilidade à insulina e menores concentrações séricas deste hormônio, bem como de leptina. Este grupo apresentou

maior responsividade à leptina no núcleo ventromedial do hipotálamo durante o final da gestação, enquanto sua ninhada teve taxa de crescimento reduzida. Nossos achados revelaram que a ação central do GH na gestação regula a ingestão de alimentos, a retenção de gordura e a sensibilidade à insulina e à leptina. Assim, o GH age em conjunto com outros hormônios característicos deste período para preparar o organismo materno para as demandas metabólicas da prole.

Palavras-chave: balanço energético, gestação, hormônios, programação metabólica, sinalização neuronal

ABSTRACT

TEIXEIRA, P.D.S. **Metabolic adaptation induced by pregnancy and lactation: role of brain STAT5 or growth hormone in the Central Nervous System.** 2019. 112fl. Thesis (PhD in Sciences) – Biomedical Science Institute, University of Sao Paulo; Sao Paulo, 2019.

Gestation and lactation promote many metabolic adaptations in the female organism, involving changes in energy balance regulation and glycemic homeostasis, in order to supply the new energy demand required for the maintenance of the offspring. There are few data about the long-term consequences of adaptations to the maternal organism and the neural and molecular mechanisms involved still need to be elucidated. The first objective (E1) of the present thesis was to determine if the experience of gestation, followed or not followed by lactation, is able to induce permanent metabolic changes in female and to understand the participation of the neural signaling pathway (STAT5) in these adaptations. The second objective (E2) was to investigate the role of Growth Hormone (GH) signaling in the Central Nervous System (CNS) against physiological and metabolic adaptations during gestation. In the E1 female controls and tissue specific deletion of *Stat5a/b* genes in the nervous system (Nestin^{Cre}/STAT5^{flox/flox}) were followed for an average time of 25 weeks (between gestation and post-gestational period), these females were distributed into three groups for the two genotypes studied: Virgens (Vir), Pregnancy (Gest) and Pregnancy with Lactation (G+L). Females of the Gest group were heavier than controls and G+L had even higher body weight throughout follow-up when compared to the other groups, a similar pattern was observed in Nestin/STAT5 females, but G+L females were heavier only up to the 10th week after gestation. The females of the experimental groups had heavier periuterine reserve (G+L KO and Gest KO), those of the G+L group had lower ambulatory activity, whereas the Gest KO had lower energy expenditure (VO₂). A reduction in the number of histone 3 (H3) acetylated in the ARC and VMH nuclei of the hypothalamus of G+L females was identified when compared to Vir. Such observation suggests that lactation promotes long-term hypothalamic epigenetic changes. Notably, ablation of STAT5 in the brain prevented previously observed metabolic and epigenetic changes in wild-type females with reproductive experience. The KO females of the experimental groups had greater insulin sensitivity, better glucose tolerance, lower food intake in the acute leptin sensitivity test, and lower hypothalamic gene expression of AgRP, NPY, higher CISH, PRLr and ER α . These results indicate that gestation followed by lactation promotes permanent alterations in the female's metabolism and these changes seem to be related to the central activation of the STAT5 pathway, since the neuronal knockout females of this gene had alterations not observed among the control females. In E2, females of two different knockout mice model of GH receptor (GHR) gene deletion were used: neuronal (GHR^{flox/flox}/Nestin^{Cre}) and leptin receptor expressing cells (GHR^{flox/flox}/LepR^{Cre}). The females were mated and, when identified the first day of gestation, were individualized for follow up and experiments. Pregnant GHR/Nestin females had higher weight gain and lower adiposity at the end of gestation, higher insulin sensitivity (ITT), lower serum concentrations of insulin and leptin, whereas IGF-1 concentrations were higher during pregnancy. The deletion of GHR in leptin receptor cells resulted in higher food intake, without altering weight gain, lower adiposity in all evaluated periods, better glucose tolerance, higher insulin sensitivity and lower serum concentrations of this hormone, as well as leptin. This group showed greater responsiveness to leptin in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during late gestation, while its litter had a reduced growth rate. Our findings revealed that the central action of GH in

gestation regulates food intake, fat retention, and insulin and leptin sensitivity. Thus, GH acts in conjunction with other hormones characteristic of this period to prepare the maternal organism for the metabolic demands of the offspring.

Keywords: energetic balance, gestation, hormones, metabolic programming, neuronal signaling

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Variações hormonais e de adipocinas da fêmea durante o período gestacional. Adaptado de Newbern e Freemark (2011).....	25
Figura 2. Sistemas biológicos que sofrem adaptação a longo-prazo promovidas pela experiência reprodutiva (Adaptado de Bridges, 2015).....	33
Figura 3. Fêmeas que passaram por gestação e lactação apresentam maior peso corporal em acompanhamento longitudinal da evolução do peso corporal (período de 20 semanas pós gestação/lactação) de camundongos fêmeas controles (c57bl6) que passaram ou não pela experiência gestacional, seguida ou não de lactação.	50
Figura 4. Monitoramento metabólico no período de uma semana em sistema OXYMAX/CLAMS de fêmeas selvagens (c57bl6) na 20ª semana após passarem ou não pela gestação, seguida ou não de lactação.	52
Figura 5. Fêmeas que passaram pela gestação seguida de lactação apresenta maior depósito de gordura periuterina após 20 semanas de acompanhamento pós-gestacional.	52
Figura 6. Homeostase glicêmica de fêmeas (c57bl6) na 20ª semana após passarem ou não pela gestação, seguida ou não de lactação.....	53
Figura 7. Fêmeas que passaram por gestação seguida de lactação apresentam maior perda de peso aguda após 14h de injeção de leptina exógena.....	54
Figura 8. Concentração sérica dos hormônios insulina (A), leptina (B) e estradiol (C) de camundongos fêmeas controles (c57bl6) e de fêmeas que passaram por período gestacional seguido (G+L) ou não (Gest) de lactação após 20 semanas de acompanhamento.	55
Figura 9. Expressão gênica hipotalâmica de fêmeas (c57bl6) após 20 semanas de acompanhamento de fêmeas controles e de fêmeas que passaram por período gestacional seguido (G+L) ou não (Gest) de lactação.	56
Figura 10. Marcação de histonas 3 acetiladas por imuno-histoquímica no PVH, ARC, VMHdm e VMHvl após 20 semanas de acompanhamento de fêmeas controles (A e D) e de fêmeas que passaram por período gestacional sem lactação (Gest - B e E) e fêmeas que passaram pela gestação seguida de lactação (G+L – C e F)	57
Figura 11. Avaliação da distribuição de células responsivas ao anti-ER α no VMH, ARC e AMG após 20 semanas de acompanhamento de fêmeas controles (A e D) e de fêmeas que passaram por período gestacional sem lactação (Gest - B e E) e fêmeas que passaram pela gestação seguida de lactação (G+L – C e F)	58
Figura 12. Expressão gênica hipotalâmica de fêmeas (c57bl6) controles e com deleção neural dos genes STAT5a e STAT5b (Nestin/STAT5).	59
Figura 13. Fêmeas com nocaute neuronal dos genes STAT5 que passaram por gestação seguida de lactação apresentam maior peso corporal até a décima semana pós-gestacional. Acompanhamento da evolução do peso corporal (período de 20 semanas) de camundongos fêmeas com deleção neural dos genes STAT5a e STAT5b que passaram ou não pela experiência gestacional, seguida ou não de lactação.	60
Figura 14. Monitoramento metabólico no período de uma semana em sistema OXYMAX/CLAMS de fêmeas nocaute cerebral dos genes STAT5 (Nestin/STAT5) na 20ª semana após passarem ou não pela gestação, seguida ou não de lactação.....	61
Figura 15. Fêmeas que passaram pela gestação apresenta maior depósito de gordura periuterina após 20 semanas de acompanhamento pós-gestacional.....	62

Figura 16. Homeostase glicêmica de fêmeas com deleção neural dos genes STAT5a e STAT5b após acompanhamento longitudinal de 20 semana após passarem ou não pela gestação, seguida ou não de lactação.	63
Figura 17. Fêmeas que passaram por gestação seguida de lactação apresentam maior redução do consumo alimentar após 24h de injeção de leptina exógena.	64
Figura 18. Concentração sérica dos hormônios insulina (A), leptina (B) e estradiol (C) de camundongos fêmeas nocaute (Nestin/STAT5) e de fêmeas que passaram por período gestacional seguido (G+L) ou não (Gest) de lactação após 20 semanas de acompanhamento.	64
Figura 19. Expressão gênica hipotalâmica de fêmeas com deleção neural dos genes STAT5a e STAT5b após 20 semanas de acompanhamento pós-gestacional.	65
Figura 20. Marcação de histonas 3 acetiladas por imuno-histoquímica no PVH, ARC, VMHdm e VMHvl após 20 semanas de acompanhamento de fêmeas com deleção neural dos genes STAT5a e STAT5b. Em A e D distribuição de células imunorreativas à anti-H3ac de fêmeas virgens, em B e E e de fêmeas que passaram por período gestacional sem lactação (Gest) e em C e F de fêmeas que passaram pela gestação seguida de lactação (G+L)	66
Figura 21. Avaliação da distribuição de células responsivas ao anti-ER α no VMH, ARC e AMG após 20 semanas de acompanhamento de fêmeas com deleção neural dos genes STAT5a e b; Virgens (A e D) e de fêmeas que passaram por período gestacional sem lactação (Gest - B e E) e fêmeas que passaram pela gestação seguida de lactação (G+L – C e F)	67
Figura 22. Confirmação da deleção neuronal do receptor de GH (GHR) pela quantificação de células imunorreativas ao pSTAT5 (pSTAT5-ir) em diferentes núcleos neuronais após tratamento com GH porcino (pGH) ou salina.	69
Figura 23. Deleção de GHR em células que expressam LepR.....	71
Figura 24. Caracterização das fêmeas dos modelos de deleção do receptor de GH (GHR) estudados (GHR/Nestin e GHR/LepR).	71
Figura 25. Fêmeas com deleção neuronal do receptor de GH (GHR/Nestin) apresentam maior consumo de ração em dias específicos do período gestacional e de lactação e maior ganho de peso no período final da gestação.	72
Figura 26. Fêmeas com deleção neuronal do receptor de GH apresentam menor adiposidade corporal no período gestacional e maior depósito da região subcutânea durante a lactação.....	73
Figura 27. Fêmeas com deleção central do receptor de GH (GHR/Nestin) são mais sensíveis à insulina exógena.	74
Figura 28. Fêmeas com deleção central do receptor de GH (GHR/Nestin) secretam menos insulina após injeção de solução de glicose.	756
Figura 29. Fêmeas grávidas com deleção central do receptor de GH apresentam concentração de insulina e leptina séricas reduzidas e aumentadas de IGF-1.	77
Figura 30. Fêmeas grávidas com deleção central do receptor de GH são responsivas à leptina de maneira semelhante às fêmeas controles.....	77
Figura 31. Expressão gênica hipotalâmica de camundongos fêmeas grávidas com deleção central do receptor de GH nos dias 18-19 de gestação.....	78
Figura 32. A ninhada de mães com deleção neuronal do receptor de GH apresenta maior peso corporal absoluto.	78
Figura 33. Fêmeas com deleção do receptor de GH em células que co-expressam o receptor de leptina (GHR/LepR) apresentam maior consumo de ração em dias específicos do período gestacional e nos primeiros dias de lactação, mas não diferem dos seus controles em relação ao ganho de peso ao longo do acompanhamento.....	79

Figura 34. Fêmeas com deleção do receptor de GH em células que expressam receptor de leptina apresentam menor adiposidade corporal no período basal e gestacional e maior depósito na região periovariana durante a lactação.	80
Figura 35. Fêmeas com deleção do receptor de GH em células que co-expressam o receptor de leptina (GHR/LepR) são mais sensíveis à insulina exógena.	81
Figura 36. Fêmeas com deleção do receptor de GH nas células com receptor de leptina (GHR/LepR) tendem a secretar menos insulina após injeção de solução de glicose.	82
Figura 37. Fêmeas grávidas com deleção do receptor de GH em células que co-expressam o receptor de leptina apresentam menores concentrações séricas de insulina e leptina.	82
Figura 38. Fêmeas grávidas com deleção do receptor de GH nas células com receptor de leptina são mais responsivas à leptina no núcleo ventromedial do hipotálamo.	84
Figura 39. Fotografias representativas grávidas com deleção do receptor de GH nas células com receptor de leptina são mais responsivas à leptina.	85
Figura 40. Expressão gênica hipotalâmica de camundongos fêmeas grávidas com deleção do receptor de GH nas células que expressam LepR no dia 18-19 de gestação.	86
Figura 41. A ninhada de mães com deleção do receptor de GH em células que co-expressam o receptor de leptina apresenta prejuízo de evolução ponderal nos dias 14 e 21 de lactação.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers utilizados para genotipagem dos animais que compõe os modelos experimentais do projeto.	16
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3V – terceiro ventrículo
AgRP – peptídio relacionado ao agouti
ARH – núcleo arqueado do hipotálamo
CART – transcrito regulado por cocaína e anfetamina
cDNA – ácido desoxirribionucleico complementar
CISH – citocina induzível por proteína contendo SH2
d - dia
DAB - diaminobenzedina tetrahydroclorido
DMH – núcleo dorsomedial do hipotálamo
DNA – ácido desoxirribonucleico
ELISA – ensaio imunoenzimático
ER α – receptor de estrógeno alfa
g - grama
G - Gestação
G+L – grupo experimental Gestação + Lactação
Gest – grupo experimental Gestação
GH – hormônio do crescimento
GHR – receptor do hormônio do crescimento
GTT – do inglês, *glucose tolerance test*
h - hora
i.p. - intraperitoneal
IGF – do inglês, *insulin growth factor*
IMC – índice de massa corporal
ITT – do inglês, *insulin tolerance test*
Kcal – quilocaloria
Kg – quilograma
KITT – constante de decaimento do teste de tolerância à insulina
KO - nocaute
KPBS – tampão fosfato potássio de sódio
L - lactação
Lact.- lactação
LepR – receptor de leptina
LHA – área hipotalâmica lateral
mL - mililitro
MPA – área pré-ótica medial
NPY – neuropeptídio Y
och – quiasma óptico
ovlt – órgão vascular da lâmina terminal
PBS – tampão fosfato salino
PCR – reação de polimerase em cadeia
Periov. - periovariano
Periut. - periuterino
pGH – hormônio do crescimento porcino
pH – potencial hidrogeniônico
PMV – núcleo pré-mamilar ventral
POMC – pró-opiomelanocorticotropina
PRLr – receptor de prolactina
pSTAT5 – sinal de transdução e ativador de transcrição 5 fosforilado

pSTAT5ir – células imunorreativas ao anticorpo anti-STAT5
RER - coeficiente respiratório
Retrop.- retroperitoneal
RNA – ácido ribonucleico
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
s.c. - subcutâneo
SNC – sistema nervoso central
SOCS3 – supressores de sinalização de citocina 3
STAT – sinal de transdução e ativador de transcrição
Subcut. - subcutâneo
TH – tirosina hidroxilase
TSL – teste de sensibilidade à leptina
Tyr - tirosina
UI – unidades internacionais
VCO₂ – dióxido de carbono produzido
Virg – grupo experimental virgens
VMH – área ventromedial do hipotálamo
VO₂ – volume de oxigênio consumido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 ADAPTAÇÕES METABÓLICAS NA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO	23
1.1.1 Alterações neuroendócrinas na gestação	24
1.1.2 Alterações neuroendócrinas na lactação.....	27
1.2 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO	29
1.3 HORMÔNIOS GESTACIONAIS E A VIA STAT5	31
1.4 ADAPTAÇÕES NEUROENDÓCRINAS PÓS-GESTACIONAIS.....	33
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	37
3.1 GERAL.....	37
3.2 ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 SUBPROJETO 1.....	39
4.1.1 Investigar o papel da gestação e/ou da lactação na programação do metabolismo de camundongos no longo prazo.....	39
4.1.2 Avaliação de alterações do balanço energético	41
4.1.3 Avaliação de alterações na homeostase glicêmica e sensibilidade hormonal	41
4.1.4 Análises teciduais.....	42
4.2 SUBPROJETO 2.....	44
4.2.1 Investigação do papel do GH na regulação central das adaptações metabólicas promovidas pela gestação e lactação.....	44
4.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS	48
5 RESULTADOS	49
5.1 SUBPROJETO 1.....	49
5.1.1 Repercussões da gestação e/ou da lactação no metabolismo de camundongos no longo prazo.....	49
5.1.2 Repercussões da gestação e/ou da lactação no metabolismo de camundongos com deleção neural de STAT5 no longo prazo	58
5.2 SUBPROJETO 2.....	68
6 DISCUSSÃO	86
6.1 SUBPROJETO 1.....	86
7 CONCLUSÃO.....	100
SUBPROJETO 1	100

SUBPROJETO 2	100
8 REFERÊNCIAS	102
ANEXO	111
APÊNDICES	112
PRODUÇÃO CIENTÍFICA COMPLEMENTAR.....	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 ADAPTAÇÕES METABÓLICAS NA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

A gestação engloba uma série de contínuos ajustes fisiológicos que afetam o metabolismo energético. Na mulher, estas adaptações são individuais e dependem do estado nutricional pré-gestacional, de fatores genéticos e ambientais. Entretanto é comum entre as espécies o aumento da demanda energética neste período, pois as fêmeas precisam suprir tanto suas próprias necessidades fisiológicas bem como as do(s) feto(s) em desenvolvimento, sendo um período de grande desafio metabólico para o organismo feminino (NUMAN, 2010, DUARTE-GUTERMAN, LEUNER, GALEA, 2019).

Por consequência do maior requerimento energético uma das primeiras adaptações observadas é a hiperfagia; que progressivamente aumenta durante a gestação, ocasionando balanço energético positivo. Esta condição implica aumento no ganho de peso corporal materno, que é uma outra alteração observada e de grande importância para o desenvolvimento adequado do concepto. Os componentes do ganho de peso gestacional compreendem o aumento do estoque de tecido adiposo materno, volume de fluidos, sangue, placenta, útero, mamas e o componente fetal (ZENG, LIU, LI, 2017).

Dada a importância do ganho de peso durante a gestação, restrições energéticas neste período comprometem a nutrição e desenvolvimento adequados do feto. Da mesma forma, o ganho de peso excessivo aumenta o risco de morte do binômio fêmea-prole, estas condições de ganho de peso inadequado também são causa de programação metabólica. Este termo se refere a condição de nutrição intrauterina e/ou pós-natal imediato que a prole é exposta, como um período crítico do desenvolvimento para seu posterior desempenho metabólico, assim como de das gerações futuras, com relevância duradoura ou permanente (DUARTE-GUTERMAN, LEUNER, GALEA, 2019).

Além das consequências para a prole, o ganho de peso gestacional excessivo é associado com complicações para a mãe, como diabetes mellitus gestacional, síndrome hipertensiva da gestação e pré-eclâmpsia (MANNAN et al., 2013a; ZALBAHAR et al., 2016; MANNAN, DOI, MAMUN, 2013). Esta condição ainda

favorece a retenção de gordura corporal no pós-parto e pode predispor mulheres à obesidade no longo-prazo (SCHOLL et al., 1995; WALKER et al., 2006 e LUKE et al., 2003).

Na mulher grávida a deposição de tecido adiposo é predominante no depósito subcutâneo, na região dos quadris, coxas e costas (SOHLSTROM e FORSUM, 1995), embora mais recentemente, com o uso de técnicas mais refinadas de avaliação da composição corporal, Gunderson e colaboradores (2008) sugerem que a gestação pode estar associada com o ganho de gordura visceral. Ao avaliar *in situ* o tecido adiposo periuterino de ratas nota-se remodelação de sua capacidade de converter glicose em ácido graxo e glicerol, favorecendo a deposição de triacilglicerol no adipócito deste compartimento adiposo (PALACÍN et al., 1991).

Este conjunto de adaptações garante o armazenamento de reservas maternas para manutenção da gestação, parto e, posteriormente, produção de leite na lactação; e são consequência da importante regulação neuroendócrina deste período. Durante a gestação e lactação há grande secreção de hormônios que contribuem para a manutenção do estado gestacional, para as adaptações metabólicas que garantem o aporte energético necessário para o feto e que propiciam o desenvolvimento do comportamento maternal.

1.1.1 Alterações neuroendócrinas na gestação

As adaptações metabólicas na gestação se iniciam logo após a implantação do embrião no útero, são orquestradas, principalmente, pelos hormônios hipofisários e placentários e a regulação central é mediada, basicamente pelo hipotálamo. O padrão de secreção destes hormônios varia ao longo da gestação, neste período estão aumentados estrógeno, progesterona, prolactina, hormônio do crescimento (GH) e há ainda a produção de análogos placentários, tais como o GH e lactogênio placentários. (Figura 1).

Figura 1. Variações hormonais e de adipocinas da fêmea durante o período gestacional. Adaptado de Newbern e Freemark (2011).

Uma característica muito marcante da gestação é a redução de 45-70% da sensibilidade à insulina, o que acarreta num estado de resistência à insulina, particularmente na segunda metade da gestação (FREEMARK, 2006). Este quadro é importante para facilitar a difusão de glicose através da placenta para o feto, como consequência da hipoglicemia materna característica do período. Desta forma, é garantido o aporte energético necessário para o crescimento e desenvolvimento fetal. Alguns hormônios que estão aumentados neste período contribuem para a resistência à insulina, incluindo o estrógeno, a progesterona, o GH e outros fatores como citocinas pró-inflamatórias (RYAN e ENNS, 1988).

O aumento gradual da concentração sérica de progesterona é associada com a inibição da translocação de GLUT4 e captação de glicose induzida pela insulina, em decorrência da supressão da ativação da via da insulina mediada pela fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) por meio da redução da expressão do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) (WADA et al., 2010, GRATTAN, 2008; JOHNSTONE e HIGUCHI, 2001). Também foi demonstrado por González e colaboradores (2000) que altas concentrações de estrógeno durante a gestação diminui a sensibilidade à insulina. O GH e seu análogo placentário, cuja secreção é tônica e não pulsátil, pois não é regulado por fatores hipotalâmicos, promove efeitos diabetogênicos, em decorrência deste padrão de secreção. Os efeitos observados são hiperinsulinemia, diminuição da

captação de glicose, da síntese de glicogênio e redução da supressão hepática de gliconeogênese (BARBOUR et al., 2002). O cortisol também exerce efeitos diabetogênicos alterando a secreção pancreática de insulina (BARSEGHIAN et al., 1982).

Assim como a progesterona, o estrógeno aumenta progressivamente durante a gestação, melhorando o fluxo sanguíneo útero-placenta e está envolvido no desenvolvimento das glândulas mamárias para a lactação assim como aumenta a captação de LDL colesterol mediado por receptor para garantir a produção placentária de hormônios esteroides. Enquanto a progesterona prepara o útero para a implantação, mantém a quiescência uterina até o parto e medeia também outras alterações anato-funcionais como redução do tônus uretal, peristaltismo e pressão de contração (CHEUNG et al., 2013).

A prolactina e seu análogo, o lactogênio placentário, são hormônios que durante a gestação tem um importante papel para adaptação materna às novas demandas energéticas, uma vez que são os principais responsáveis pelo aumento da ingestão alimentar. A prolactina atua nas fases iniciais da gestação, enquanto o lactogênio placentário promove a mesma adaptação, porém em estágios mais avançados. A hiperprolactenemia promove aumento do consumo alimentar decorrente, da indução da resistência central à leptina. Além disso, parece refletir diretamente no aumento da expressão gênica hipotalâmica de neuropeptídeo Y (NPY) e/ou do peptídeo relacionado ao agouti (AgRP) (AUGUSTINE e GRATAN, 2008)

Outra importante consequência do aumento das concentrações séricas de prolactina é que ela promove expansão das células beta-pancreáticas e, consequentemente maior produção de insulina. Assim, a prolactina tem um papel importante no quadro de resistência à insulina, comum do período gestacional, evitando que evolua para o diabetes mellitus gestacional (TRUJILLO et al., 2011). Há na literatura mecanismos descritos de como os hormônios lactogênicos promovem a expansão da célula beta-pancreática, como indução por ciclinas (D2, A2, B1 e B2), quinases dependentes de ciclinas (CDK1), aumento da expressão de GLUT2 e aumento da produção de serotonina na ilhota pancreática (ARUMUGAM et al., 2008; MAZANCOURT et al., 1994).

Altas concentrações séricas de leptina, são marcantes no período gestacional e decorrem da síntese pelo tecido adiposo da fêmea e pela placenta. Esses altos níveis refletem no estado de resistência à leptina, condição análoga a de indivíduos obesos cuja hiperleptinemia não regula a homeostase energética. Em contraste, a concentração sérica de adiponectina diminui com a progressão da gestação, proporcionalmente à redução da sensibilidade à insulina (CATALANO et al., 2006). A resistência à leptina é caracterizada pelo aumento das concentrações séricas do hormônio, assim como por prejuízo nos seus efeitos na regulação gênica hipotalâmica e na ingestão alimentar. Trujillo e colaboradores (2011) demonstraram que o transporte da leptina pela barreira hematoencefálica está inibido, há redução da expressão de POMC e indução de STAT3, Akt, SOCS3, NPY e AgRP. Além disso, sabe-se que essas alterações são decorrentes não só do aumento da leptina circulante como também do aumento dos hormônios lactogênicos.

O aumento transitório tanto da insulina quanto da leptina sérica durante a gestação (TRUJILLO, et al., 2011; AUGUSTINE e GRATTAN, 2008) é de grande importância, pois a resistência à insulina garante a disponibilidade de glicose para o feto enquanto que a resistência à leptina garante o aumento da ingestão alimentar de forma que supra a nova demanda energética (BELL e BAUMAN, 1997). Por estas duas características fisiológicas marcantes da gestação, este é um período importante para avaliar os mecanismos moleculares envolvidos com a sensibilidade à insulina e à leptina. É possível avaliar a sensibilidade destes hormônios por meio da resposta aguda à leptina ou insulina no controle do balanço energético e glicemia dos animais, respectivamente (SALTIEL e KAHN, 2001).

1.1.2 Alterações neuroendócrinas na lactação

No pós-parto, o estímulo pela lactação tem papel essencial na manutenção das adaptações hormonais promovidas na gestação e do comportamento maternal, esta regulação, assim como na gestação, também tem como núcleo central de regulação o hipotálamo (CROWLEY, 2015).

Os dois hormônios que parecem ter um papel mais importante na regulação endócrina durante a lactação são a prolactina, absolutamente necessária em todas as fases da lactação (lactogênese e galactopoesse); e a ocitocina, primariamente necessária para a ejeção e remoção do leite. A secreção de ambos durante a lactação

decorre do arco-reflexo neuroendócrino iniciado pela sucção e outros estímulos exteroceptivos (audição e olfação) providos dos filhotes, ativando vias ascendente no hipotálamo e resultando em um padrão único de secreção (CROWLEY, 2015).

É bem descrito na literatura que a prolactina tem funções peliotrópicas, além do estímulo à produção de leite, seus efeitos são observados também no metabolismo e sistema endócrino (GRATTAN, 2015). Este hormônio ativa seus receptores que estão amplamente expressos em núcleos hipotalâmicos importantes para o controle do balanço energético como núcleo arqueado (ARC) e núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) (FURIGO et al., 2014), além de tecidos periféricos como fígado e tecido adiposo. Neste último, a prolactina atua estimulando a adipogênese e regulando a secreção de adipocinas, como estímulo à produção de leptina e inibição de adiponectina (CARRÉ e BINART, 2014).

Além da secreção de prolactina, a mais importante regulação hormonal hipotalâmica na lactação é promovida pela dopamina (DA), que é liberada na eminência mediana pelos neurônios túbero-infundibulares do núcleo arqueado. É bem estabelecido que o sistema dopaminérgico tuberoinfundibular (TIDA) realiza o maior controle inibitório hipotalâmico sobre a secreção de prolactina, por meio de receptores D2 presentes em lactotrófos da hipófise anterior (GRATTAN, 2015; BEN-JONATHAN et al., 1985 e 2001; FENELON et al., 1996).

É sugerido que a dopamina não seja o único neurotransmissor responsável pela supressão da exocitose da prolactina. Potencializando a ação da dopamina sobre os lactotrófos, há algumas evidências de que o neuropeptídeo Y (NPY) possa desempenhar este papel. Ciofi e colaboradores (1993) identificaram a expressão transiente de NPY pelos neurônios TIDA durante a lactação. Além disso, a expressão de NPY nestes neurônios depende do estímulo de sucção, uma vez que após remoção dos filhotes, os neurônios TIDA não apresentam imunoreatividade ao NPY.

Diante do aumento das concentrações séricas destes hormônios durante a lactação, algumas funções biológicas sofrem adaptação neste período, incluindo o aumento da ingestão de alimentos e água; redução do gasto energético; indução do comportamento maternal; inibição do ciclo ovariano e a supressão da resposta ao estresse (HIRSCHBERG, 2012).

A síntese e secreção de leite são energeticamente custosas e requer adaptações no balanço energético para atender esta demanda. A alteração mais característica é a hiperfagia, observa-se um incremento de quatro a cinco vezes na ingestão alimentar diária durante a lactação de roedores quando se compara à de fêmeas não-lactantes (ZAMPIERI et al., 2015; RAMOS-LOBO et al., 2018). A prolactina potencializa a condição de resistência à leptina característica da gestação, o que pode contribuir no aumento da ingestão alimentar (Augustine e Grattan 2008, Grattan et al. 2007, Augustine et al. 2008, Ladyman 2008, Ladyman et al. 2010).

Além da influência dos hormônios já citados, a hiperfagia pode decorrer também do aumento condicional ao estímulo de sucção de AgRP (*agouti-related peptide*) e NPY – neuropeptídeos orexigênicos, nos núcleos ARC, paraventricular do hipotálamo (PVN) e hipotálamo dorsomedial (DMH). Outras adaptações metabólicas para atender a alta demanda energética são a maior mobilização dos estoques de lipídios do adipócito, a redução da atividade física, a inibição do crescimento, função tireoidiana e ciclo reprodutivo (DENIS et al., 2003; SMITH e GROVE, 2002; VERNON et al., 2002; WOODSIDE, 2007; WOODSIDE et al., 2012). Apesar da hiperfagia e de todas estas adaptações, ainda foi observado em ratas lactantes modesto balanço energético negativo, marcado por redução da glicemia (WOODSIDE et al., 2012).

1.2 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

A secreção hipofisária do hormônio do crescimento (GH), também conhecido como somatotropina, está sob controle de neurônios hipotalâmicos que secretam fatores estimuladores ou inibidores no sistema porta-hipofisário. Neurônios do núcleo arqueado e ventromedial do hipotálamo produzem o hormônio liberador de GH (GHRH) que atua estimulando a síntese do GH, enquanto neurônios do núcleo periventricular do hipotálamo produzem somatostatina (SST) que age como um inibidor da secreção hipofisária de GH. A função mais conhecida e estudada do GH é aquela correspondente ao crescimento somático e tecidual, como também a regulação de processos metabólicos, de células em tecidos periféricos, como músculo, ossos e tecido adiposo (KATO et al., 2002).

A ação do GH é dependente da ativação do seu receptor cognato (GHR). Consequentemente, a inativação do GHR implica em perda da função do GH naquela

célula/tecido. O GHR pertence à classe de receptores de citocina do tipo 1, que inclui os receptores de eritropoetina, prolactina, leptina, interleucinas e outros fatores. Maior parte destes receptores liberam seu domínio extracelular na circulação e, no caso do GHR, ele libera uma proteína circulante ligada ao GH, o que regula a disponibilidade do mesmo. O principal elemento comum para esta classe de receptores é a região Box 1 rica em prolina conservada, que é necessário para a ligação da proteína Janus tirosina quinase (JAK), que é o principal responsável por produzir a transdução dos efeitos do receptor na célula. A JAK fosforila os principais resíduos de tirosina no domínio citoplasmático do GHR que servem como locais de ancoragem para proteínas contendo o domínio SH2, notavelmente as proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT5a e STAT5b), que medeiam uma parte considerável da ação do GH na célula (BARNARD e WATERS, 1997; BROOKS e WATERS, 2010).

O gene *Igf1* é um dos principais alvos da ativação da via GHR/STAT5 em vários tecidos. A síntese e liberação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) pode ter ação local (autócrina ou parácrina) e parece ser responsável por diversos efeitos biológicos atribuídos ao GH. A ação direta do GH no fígado é imprescindível para a manutenção das concentrações séricas de IGF-1, o que indica que esse órgão é responsável por exercer, via secreção do IGF-1, um efeito sistêmico sobre o crescimento corporal e demais funções biológicas dependentes do GH (LIST et al, 2014).

Tanto no cérebro de humanos quanto no de roedores, o GHR é expresso em regiões que participam da regulação do comportamento alimentar, do balanço energético e da homeostase glicêmica, como hipotálamo, hipocampo e amígdala (FURIGO et al., 2017; HOJVAT et al., 1982; KASTRUP et al., 2005). No núcleo arqueado do hipotálamo o GHR está envolvido com o *feedback* negativo que regula a produção e secreção do GH pelo somatotrofos da hipófise. A administração de GH induz a expressão do gene *c-fos*, um marcador de atividade neuronal, em neurônios NPY e somatostatina do hipotálamo (KAMEGAI et al., 1996). Recentemente Cady e colaboradores (2017) e Furigo e colaboradores (2019) descreveram um importante papel do GH no cérebro diferente da ação clássica de *feedback* negativo, cuja função central está muito relacionada com o metabolismo energético e da glicose. Furigo e colaboradores (2019) demonstraram que o GH atua como um sinal central de fome

em situações de débito energético, desencadeando respostas adaptativas para conservar reservas energéticas que estão limitadas nesta situação.

Ainda não está descrito o papel do GH no sistema nervoso central nas regulações metabólicas que acontecem no período gestacional. Na gestação, as concentrações séricas de GH mantêm-se constantes, embora haja diminuição da produção hipofisária deste hormônio, isto ocorre devido à produção placentária não pulsátil de uma variante de GH (PRAGER e BRAUNSTEIN, 1995) que age como o GH hipofisário na regulação do metabolismo materno durante a segunda metade da gestação (FRANKENNE et al., 1988). Ele também é necessário para nutrição e crescimento fetal, também para o desenvolvimento mamário e lactação. O mecanismo descrito pelo qual o GH garante o crescimento fetal é pela mobilização de nutrientes maternos para utilização pelo feto, pois este hormônio é um dos principais determinantes para indução da resistência à insulina materna.

É descrito que quando administrado periféricamente, o GH promove aumento da ingestão alimentar, sugerindo seu papel orexígeno (BLISSETT et al., 2000 e SNEL et al., 1995). Além disso, este papel do GH já foi descrito por Bohlooly e colaboradores (2005) não periféricamente, mas quando há maior expressão de GH centralmente, assim como após injeção intra-cérebro-ventricular há resposta orexigênica associada com resistência à insulina e dislipidemia. Hipotetizamos que o GH durante a gestação tem um papel central importante na regulação da homeostase glicêmica e do apetite.

1.3 HORMÔNIOS GESTACIONAIS E A VIA STAT5

JAK/STAT é um nome genérico para a via de sinalização que envolve a ativação de duas famílias de proteínas: JAK que compreende quatro tirosinas quinases e as do transdutor do sinal e ativador de transcrição gênica (STAT do inglês, *signal transducer and activator of transcription*) com sete fatores de transcrição, dentre eles os STAT5A e STAT5B. Esta via é um sistema eficiente e finamente regulado, cujo fim é especialmente a regulação da expressão gênica. A JAK/STAT envolve a ativação de um receptor por uma proteína específica, como hormônios, fatores de crescimento e citocinas, que desencadeia na ativação da JAK. Por conseguinte, JAK fosforila STAT que então se dimeriza, este dímero de STAT é translocado para o núcleo onde atua como fator de transcrição ligando-se ao DNA (RAWLINGS et al., 2004).

Esta via é conservada evolutivamente entre as espécies de eucariotos e participa da regulação de grande número de funções biológicas como crescimento e sobrevivência celular, diferenciação e desenvolvimento. No sistema nervoso central, já foi descrito o papel da via de sinalização JAK-STAT na regulação gênica durante o desenvolvimento, secreção de hormônios, inflamação e tumorigênese (NICOLAS et al., 2013). Nosso grupo descreveu o envolvimento da via STAT5 neural em um bom número de funções como manutenção da lactação (BUONFIGLIO et al., 2015), aprendizado e memória (FURIGO et al., 2018) e efeito inibitório no desencadeamento da puberdade (SILVEIRA et al., 2017).

Muitos dos hormônios secretados em alta concentração durante a gestação e lactação, como GH e prolactina, ligam-se aos seus respectivos receptores celulares presentes na superfície celular e ativam a via JAK/STAT, particularmente a do STAT5 (BROWN et al., 2010). Sugere-se que esta via seja a principal envolvida nas alterações promovidas pela gestação no organismo da fêmea e pode estar relacionada com mudanças permanentes no metabolismo, na sensibilidade a certos hormônios e alterações epigenéticas da fêmea (CHAMPAGNE et al., 2006; SJOEHOLM et al., 2011).

Por exemplo, foi observado que ratas fêmeas que já haviam passado pela experiência reprodutiva apresentam maior ativação da via do STAT5 em resposta à prolactina, enquanto outras vias de sinalização se mantiveram inalteradas em decorrência da experiência reprodutiva (SJOEHOLM et al., 2011). Além disso, CHAMPAGNE e colaboradores (2006) observaram que mudanças comportamentais podem ser herdadas e possivelmente envolvem maior ativação da via STAT5 na área pré-óptica do hipotálamo, resultado em maior atividade do STAT5b como fator de transcrição para o receptor de estrógeno, controlando, portanto, sua expressão gênica.

A secreção de prolactina pela hipófise anterior é negativamente regulada, em parte por neurônios dopaminérgicos, como descrito anteriormente. Essa regulação é mediada pela prolactina numa alça de retroalimentação negativa para modular a secreção de dopamina. Uma vez que a prolactina induz a ativação de STAT5b e a fosforilação de STAT5 (pSTAT5), a marcação de células que expressam pSTAT5 após injeção aguda de prolactina tem sido usado como um importante marcador para

identificar células responsivas à PRL, assim como ao GH (Brown et al., 2010, Furigo et al., 2017, Silveira et al., 2017). Na fase final da gestação e na lactação, há redução da ativação de STAT5b e hiper-expressão de SOCS (principal supressor do sinal das STAT's) do inglês, *suppressor of cytokine signaling*) nos neurônios responsivos à prolactina, o que contribui para maior secreção deste hormônio por diminuição do *feed-back* negativo (ANDERSON et al., 2006). É importante destacar que a leptina também é capaz de ativar a via STAT5, embora classicamente o principal alvo da leptina seja a STAT3. Na gestação há maior expressão de SOCS3, este mecanismo parece ser o principal relacionado à resistência a leptina característica do período gestacional (ZAMPIERI et al., 2015).

1.4 ADAPTAÇÕES NEUROENDÓCRINAS PÓS-GESTACIONAIS

Praticamente todas as fêmeas mamíferas são capazes de gestar e produzir alimento para nutrir sua prole. A experiência reprodutiva, que compreende a gestação, lactação e maternidade pode modular a fisiologia e comportamento da fêmea no longo prazo, se não, permanentemente. O período da gestação e lactação é o momento fisiológico particular do organismo feminino em que há uma série de adaptações endócrinas, neuroendócrinas, neuroquímicas, neuroanatômicas e imunológicas (Figura 1) (BRIDGES, 2015).

Figura 2. Sistemas biológicos que sofrem adaptação a longo-prazo promovidas pela experiência reprodutiva (Adaptado de Bridges, 2015).

Das primeiras observações de adaptação no longo prazo decorrentes da gestação e lactação foi a redução sérica de prolactina de mulheres durante a fase folicular do ciclo menstrual após 10 anos do parto (MUSEY, 1987). Observações semelhantes também foram feitas em roedores quando comparadas as concentrações de prolactina de fêmeas na segunda e primeira gestação, assim como de fêmeas que tinham passado por experiência reprodutiva com a de fêmeas nulíparas em idade correspondente. Assim como a prolactina as concentrações séricas de estradiol também estão modestamente reduzidas, após a experiência reprodutiva. (BRIDGES e HAMMER, 1992; BRIDGES e BYRNES, 2006).

As adaptações endócrinas a longo prazo promovidas pela gestação são reguladas por fatores neuroendócrinos e podem refletir uma mudança na responsividade a estes hormônios. Uma importante alteração neuroquímica se dá no sistema dopaminérgico; o aumento da atividade dopaminérgica no hipotálamo, decorrente da experiência reprodutiva, pode inibir a secreção de prolactina. Embora a prolactina seja menos secretada no período pós-gestacional, foi demonstrado que a expressão gênica do receptor de prolactina é maior na glândula mamária e no tecido hepático de fêmeas que passaram por experiência reprodutiva. Uma vez que há maior número de receptores é necessária menor concentração sérica do hormônio para promover a ação regulatória dele. Sjöholm e colaboradores (2011) observaram maior número de células reativas contendo STAT5 fosforilado (pSTAT5) – que medeia a ação de prolactina, GH – em áreas como MPOA, núcleo paraventricular, núcleo supraóptico e arqueado do hipotálamo após ratas passarem pela experiência reprodutiva.

Outra alteração observada após a experiência reprodutiva é a distribuição do receptor de estrógeno no cérebro da fêmea. Em ratos, foi observado concomitante aumento no número de células com receptores de estrógeno alfa (ER α) no período vespertino do proestro na região antero-dorsal do MPOA e redução de células imunorreativas ao ER α na amígdala antero-medial (Byrnes et al., 2009). Além deste tipo de alteração crônica, já foi descrito o papel protetor da gestação e lactação em alguns aspectos da saúde da mulher, como no desenvolvimento de câncer de mama

(LIU et al., 2007; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002), na redução do risco de diabetes tipo 2 (JÄGER et al., 2014) e endometriose (FARLAND et al., 2017). Além disso, aspectos comportamentais e psicológicos, como memória, ansiedade e resposta ao stress podem ser permanentemente alteradas. Recentemente Ladyman e colaboradores (2018) demonstraram mais especificamente que a experiência reprodutiva modifica no longo prazo a homeostase energética da fêmea, sendo mais susceptível à modificações na dieta como exposição à ração hiperlipídica.

2 JUSTIFICATIVA

É descrito que a experiência reprodutiva altera permanentemente alguns parâmetros biológicos do organismo materno, embora maior parte dos trabalhos foquem na prole, ao avaliar possíveis consequências no longo prazo das modificações durante o período gestacional. As adaptações necessárias para atender a maior demanda energética da gestante promovem aumento da ingestão alimentar, maior deposição de gordura e resistência à insulina. Contudo, pouco se sabe das repercussões destas adaptações a longo prazo e o papel da STAT5, principal proteína da via ativada pelos hormônios gestacionais.

Órgãos de saúde pública (Institute of Medicine, IOM, 2009) têm estabelecido que o ganho de peso da mulher durante a gestação deve ser baseado no estado nutricional pré-gestacional, além de definir a faixa ideal de ganho de peso baseada no índice de massa corpórea (IMC) da mulher. Alguns estudos populacionais avaliaram a retenção de peso no período pós-parto no médio e longo prazo e indicam que parte das mulheres apresenta retenção de peso corporal, mesmo 15 anos depois do período pós-parto (AMORIM et al., ROONEY e SCHAUBERGER, OLSON et al., ROONEY et al.). Dessa maneira, é possível que a experiência reprodutiva possa causar repercussões endócrinas e metabólicas no organismo das mulheres de modo a promover aumento do peso corporal.

Diante da descrição do padrão de distribuição do receptor de GH no encéfalo, em áreas classicamente estudadas na regulação do balanço energético (FURIGO et al., 2017) e das questões suscitadas a respeito do papel central do GH (CADY et al., 2017; FURIGO et al., 2019), também buscamos investigar especificamente o papel central do GH na modulação das alterações fisiológicas deste período.

Nossas hipóteses são de que os hormônios produzidos na gestação causam alterações metabólicas permanentes no organismo da fêmea; e parte destas alterações metabólicas que ocorrem durante a gestação é causada pela ação do GH sobre o sistema nervoso central.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Com o intuito de estudar mecanismos neurais de regulação do balanço energético do organismo da fêmea frente às alterações metabólicas promovidas pela gestação e lactação, a presente tese tem como objetivos: 1) investigar o impacto da experiência gestacional e/ou lactação no metabolismo da fêmea no longo prazo, 2) determinar a participação da via de sinalização do STAT5 sobre as eventuais alterações metabólicas a longo-prazo de fêmeas que passaram pela experiência gestacional e/ou lactação e 3) avaliar o papel central do GH na regulação das adaptações metabólicas observadas durante a gestação e lactação.

3.2 ESPECÍFICOS

- No que se refere ao período pós-gestacional (SUBPROJETO 1):
 - Avaliar as consequências no longo prazo sobre o balanço energético e homeostase glicêmica causadas pela experiência da gestação e/ou lactação;
 - Investigar como a gestação e/ou lactação programa sistemas neuronais específicos (neurônios dopaminérgicos, serotoninérgicos, bem como aqueles responsivos ao estrógeno) de camundongos fêmeas;
 - Testar se a gestação e/ou lactação altera a sensibilidade/resposta a hormônios específicos (insulina, leptina) no período pós-gestacional tardio;
 - Avaliar se possíveis alterações no organismo da fêmea promovidas pela gestação e lactação ocorrem devido a ativação neuronal da via STAT5 (Nestin^{Cre}STAT5^{flox/flox}).
- No que se refere ao papel do GH durante a gestação (SUBPROJETO 2):

- Estudar em modelos de camundongos geneticamente modificados com deleção do receptor de GH em neurônios ($GHR^{flox/flox}Nestin^{Cre}$) ou em células que expressam receptor de leptina (LepR) potenciais mudanças no:
 - balanço energético durante o período gestacional e lactação;
 - sensibilidade à leptina e à insulina na gestação;
 - concentração sérica de insulina, leptina e IGF-1 ao final da gestação;
 - modulação gênica hipotalâmica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo nº 79/2015/CEUA). Todos os animais foram mantidos em biotério em condições ambientais padrão (ciclo 12h claro/escuro; 22 ± 2 °C; água e ração *ad libitum*. Em todos os experimentos, os animais receberam ração experimental padrão (2,99 Kcal/g; 9,4% das calorias provenientes de gordura – Quimtia, Brasil).

4.1 SUBPROJETO 1

4.1.1 Investigar o papel da gestação e/ou da lactação na programação do metabolismo de camundongos no longo prazo

Para avaliar as adaptações metabólicas promovidas pela gestação e/ou lactação no longo prazo foram utilizados camundongos fêmeas, com fundo genético C57BL6 e com aproximadamente 3 meses de vida. Estes animais foram distribuídos aleatoriamente em três diferentes grupos experimentais (n=15/grupo):

- Grupo Nulípara - **Virg** (camundongos fêmeas virgens – nunca passaram por experiência reprodutiva)
- Grupo Gestação - **Gest** (camundongos fêmeas que passaram por uma única gestação, mas tiveram os filhotes removidos após o nascimento – não amamentaram)
- Gestação+Lactação – **G+L** (camundongos fêmeas que passaram por uma gestação, seguida de três semanas de lactação).

Para a formação dos grupos experimentais, as fêmeas ao atingirem a idade ideal, foram agrupadas em caixas de policarbonato com filtro em estantes ventiladas (20x21x32 cm, Alesco, Brasil). Aleatoriamente, as fêmeas foram distribuídas em três grupos e aquelas que passaram pela gestação foram acasaladas com um macho (*background* C57bl6). Após a identificação da gestação, as fêmeas foram alocadas individualmente e monitoradas até o dia do parto. No dia do nascimento dos filhotes, as fêmeas do grupo sem lactação foram separadas de sua ninhada e reagrupadas em

caixas como uma forma de minimizar o stress pela retirada dos filhotes. Este grupo é importante para avaliar o efeito isolado da gestação nas alterações metabólicas.

Uma vez que muitos hormônios secretados durante a gestação e lactação tem sua ação mediada pela ativação a via JAK/STAT5 (por exemplo, leptina, prolactina e GH) (BROW et al., 2010; FURIGO et al., 2014; GRIMLEY et al., 1999; SINGIREDDY et al., 2013), animais com deleção neural dos genes STAT5a e STAT5b (camundongos Nestin STAT5 KO) foram submetidos às mesmas condições experimentais dos animais controle.

Para a produção de camundongos nocaute específico foi utilizada a tecnologia Cre/loxP: em uma linhagem de camundongos um gene derivado de bacteriófagos P1 (Cre recombinase) foi condicionado à expressão do gene Nestin (neural stem cells); outra linhagem de camundongos teve os genes Stat5a e Stat5b flanqueados por sítios loxP. O cruzamento destas duas linhagens de camundongos gera animais cujos genes *Stat5a/b* são inativados especificamente no sistema nervoso (uma vez que a Cre é condicionada ao gene *Nestin* que é expresso primariamente em neurônios).

Para tanto, foram realizados cruzamentos entre animais STAT5^{flox/flox} x Nestin^{Cre/-}STAT5^{flox/flox}, sendo que os animais com deleção tecido específica apresentam o genótipo de STAT5^{flox/flox}Nestin^{Cre/+}. Os animais foram genotipados para confirmação das mutações. Para tanto, no 21º dia de vida os camundongos foram desmamados, identificados (perfuração de orelha) e tiveram coletada amostra do epitélio caudal para extração de DNA (Sigma-Extrat-N-Amp™ Tissue PCR Kit), seguido de amplificação do DNA por PCR utilizando primers específicos para as mutações.

Tabela 1. Sequência de primers utilizados para genotipagem dos animais que compõe os modelos experimentais do projeto.

Gene alvo	Sequência genotípica
Nestin ^{Cre}	
1	GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC
2	GTG AAA CAG CAT TGC TCT CAG TT
STAT5 ^{flox/flox}	
1	GAA AGC ATG AAA GGG TTG GAC
2	AGC ACG CAG AGG ACT AC
3	AAG TTA TCT CAG GTT AGT CAG G

O objetivo da reprodução do experimento neste modelo de animais nocaute é determinar se a ativação da via do STAT5 é responsável por causar as adaptações metabólicas possivelmente induzidas pela gestação e/ou lactação a longo prazo.

A confirmação da inativação do gene STAT5 foi feita por qPCR em amostras de hipotálamo dos animais controle e STAT5^{flox/flox}Nestin^{Cre/+} para quantificação relativa da expressão dos genes *STAT5a* e *STAT5b* (sequência de primers no anexo 1).

4.1.2 Avaliação de alterações do balanço energético

O peso das fêmeas dos grupos estudados foi monitorado semanalmente por um período total de 20 semanas (após o último contato com os filhotes ou idade equivalente no grupo nulípara). Depois disso, as fêmeas foram alocadas no sistema de monitoramento integral de animais (Oxymax/CLAMS). Esse sistema permite a avaliação simultânea e individual de 8 camundongos, onde são aferidos o consumo de oxigênio (VO₂) – por meio de dois sensores para detecção de oxigênio [paramagnético e de zircônia], produção de gás carbônico (VCO₂), a atividade locomotora voluntária (por meio de sensores de infravermelho), o consumo alimentar e o consumo de água. Com base nos resultados obtidos na calorimetria indireta, foram calculados o gasto energético e o coeficiente respiratório dos animais. As fêmeas passaram por habituação de 3 dias no sistema CLAMS, seguido de análises por 5 dias consecutivos.

4.1.3 Avaliação de alterações na homeostase glicêmica e sensibilidade hormonal

Foram conduzidos testes *in vivo* para avaliação da homeostase glicêmica pós-gestacional, bem como a sensibilidade à leptina nos grupos experimentais. As fêmeas foram submetidas a um período de 4h de privação alimentar para padronização do estado basal de glicemia. Todos os grupos passaram por teste de tolerância à insulina (ITT; dose: 1 UI/kg, via i.p., *insulina recombinante humana* - NPH) e teste de tolerância à glicose (GTT; dose: 2 g/Kg, via i.p.). A glicemia foi aferida por glicosímetro portátil (OneTouche® – Jhonson&Jhonson) em amostras de sangue da veia da cauda coletado por meio de um pequeno corte na ponta da cauda dos animais, nos tempos 0 (basal), 20, 40, 60, 90 e 120 minutos após início do teste. Com os dados de glicemia

foi calculada a área sob a curva e do ITT também foi calculada a constante de decaimento da glicemia (KITT).

Para avaliar a sensibilidade aguda à leptina os animais receberam injeção intraperitoneal do hormônio (dose: 2,5 µg/g, *NHPP – recombinant mouse leptin*) 3h antes do início do ciclo escuro (período de maior ingestão alimentar), a ração e os animais foram pesados em diferentes momentos (0, 4h, 10h e 24h após a injeção de leptina) para mensuração da variação do consumo alimentar e peso corporal, respectivamente, por serem os parâmetros mais influenciados pela ação deste hormônio. Os valores obtidos no dia do teste com a injeção de leptina são confrontados com os aqueles obtidos após a injeção de PBS no mesmo animal (basal).

4.1.4 Análises teciduais

Ao final das avaliações *in vivo*, as fêmeas foram eutanasiadas por decapitação após anestesia inalatória (isoflurano). Dos animais que foram decapitados (n=15/grupo) foi coletado sangue para separação do soro e determinação das concentrações séricas de hormônios (insulina, leptina, estradiol) utilizando kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) – *Calbiotech – Mouse/Rat Estradiol ELISA (CatNo. ES180S-100; Crystal Chem – Mouse Insulin ELISA kit CatNo. #90080; Crystal Chem – Mouse Leptin ELISA kit CatNo. #90030)*. O hipotálamo foi coletado para quantificação de expressão gênica; os depósitos de tecido adiposo (subcutâneo, periuterino, periovariano e retroperitoneal) foram coletados e pesados para comparação do volume de depósito adiposo entre os grupos.

O hipotálamo foi armazenado a -80°C, deste tecido foi extraído o RNA total (Invitrogen-TRIzol® Reagent) para obtenção de cDNA por transcrição reversa (Invitrogen-Super Script® II Reverse Transcriptase) e amplificação do cDNA para avaliação expressão gênica em tempo real (real time PCR – SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes). A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo cálculo do $2^{-\Delta\Delta CT}$, comparando com a média dos genes constitutivo GAPDH e β -actina (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Foram avaliados os genes hipotalâmicos AgRP (NM_007427.2), CART (NM_013732.7), POMC (NM_008895.3), NPY (NM_023456.2), TH, ER- α (NM_007956-4), PRLR, GHR, SOCS3, CISH (sequências

disponíveis no anexo 1). Nosso grupo de pesquisa apresenta ampla experiência nesses métodos de quantificação de RNAm (BUONFIGLIO et al., 2016; ZAMPIERI et al., 2016; PEDROSO et al., 2014).

Outro grupo de animais foi anestesiado com dose letal (i.p.) de coquetel de xilazina e cetamina (n=6/grupo), submetido à perfusão trascárdica com solução de formalina 10% para fixação dos tecidos, após a administração de solução salina a 9% para remoção do sangue circulante. Após este procedimento, os encéfalos foram então imersos em solução fixadora (por 1h), transferidos para solução a 20% de sacarose (12h) para crioproteção do tecido, e seccionados (30 µm) em micrótomo (Hyrax S30) em 4 séries. Os cortes foram imersos em solução anticongelante e armazenados em freezer -20°C até a avaliação por imunohistoquímica.

a) Imunohistoquímica

Os cortes histológicos dos encéfalos foram submetidos a lavagens em tampão sódio-potássio (KPBS- 0,02 M, Ph 7,4); pré-tratados em peróxido de hidrogênio (0,3%) e NaOH (1%) por 20 min; seguido de lavagens em KPBS; incubação em solução de glicina (0,3%) por 10 min; lavados em KPBS; tratados por 10 min em dodecil sulfato de sódio (SDS 0,3%); o bloqueio dos cortes foi conduzido por lavagem em soro por no mínimo 1h (concentração de 3% - *donkey serum*); incubados em anticorpo primário anti-ERα (1:100.000, Millipore) ou anti-H3 (histona 3 acetilada 1:250, Cell Signaling) ou anti-H4 (histona 4 acetilada 1:250, Cell Signaling) por 48h; lavados em KPBS; incubados por 1h em anticorpo secundário biotilado (1:1000, Jackson ImmunoResearch); seguido de lavagens em KPBS; incubados por 1h no complexo avidina-biotina (1:500, vector labs); lavados em KPBS e tampão acetato (0,1 M, pH 6,0). Após passarem por esse procedimento os cortes histológicos do encéfalo foram submetidos à reação de imunoperoxidase em tampão acetato contendo diaminobenzedina tetrahydroclorido (DAB, Sigma), peróxido de hidrogênio a 0,03% e sulfato de níquel 0,25%. Da mesma forma nosso grupo possui vasta experiência e tem bem padronizada a condução desta técnica (FURIGO et al., 2016; ZAMPIERI et al., 2016; PEDROSO et al., 2014).

4.2 SUBPROJETO 2

4.2.1 Investigação do papel do GH na regulação central das adaptações metabólicas promovidas pela gestação e lactação

4.2.1.1 Modelos experimentais

Para compreender a ação central do GH nas adaptações fisiológicas e metabólicas que acontecem durante a gestação e/ou lactação, foram utilizados animais com deleção neuronal do receptor de GH (GHR). Para a produção destes animais foi utilizada, assim como no subprojeto 1, a tecnologia Cre/loxP. Neste caso a enzima Cre recombinase também estava condicionado à expressão do gene *Nestin* (*neural stem cells*); enquanto a outra linhagem de camundongos tinha o gene do receptor de GH (GHR) flanqueado por sítios loxP nos dois cromossomos. O cruzamento destas duas linhagens de camundongos gera animais com deleção de GHR no sistema nervoso (uma vez que a Cre é expressa primariamente em células neurais).

O resultado do cruzamento entre animais $GHR^{flox/flox} \times GHR^{flox/flox}Nestin^{Cre/-}$ é 50% da ninhada com deleção tecido específica ($GHR^{flox/flox}Nestin^{Cre/+}$) enquanto a outra metade corresponde aos animais controle ($GHR^{flox/flox}$). Os animais foram genotipados, conforme detalhado anteriormente.

Também foram gerados animais de outro modelo ($GHR^{flox/flox}LepR^{Cre}$) a fim de investigar o efeito da deleção do receptor de GH especificamente nas células que também expressam receptor de leptina, visto que um alto percentual de neurônios é responsivo aos dois hormônios (FURIGO et al., 2017). Com esse modelo pretendemos investigar como o GH poderia regular o metabolismo por meio de uma ação modulatória sobre as células responsivas à leptina.

Para obter a confirmação da inativação do receptor de GH, os animais gerados foram genotipados e submetidos (controles e nocautes) a uma injeção intraperitoneal de GH extraído da hipófise de porcos – pGH (National Hormone and Peptide Program); 90 min depois da injeção os animais foram perfundidos com solução salina seguida de formaldeído 10%, os encéfalos foram coletados e cortados coronariamente em micrótomo (30 μ m). Estes cortes passaram por reação de imunohistoquímica usando anticorpo anti-pSTAT5, quando foi analisado o percentual de co-

localização entre o pSTAT5 na população neuronal de interesse. O padrão de marcação observado foi comparado com o dos animais controle (sem deleção).

A partir da geração destes animais as fêmeas compuseram três diferentes grupos de grávidas:

- **Controles**
- **GHR/Nestin**
- **GHR/LepR**

Entretanto as comparações foram feitas de forma pareada (Controle x GHR/Nestin e Controle x GHR/LepR).

4.2.1.2 Balanço energético durante a gestação e lactação

A partir da 11^a semana de vida as fêmeas (controle e nocautes – GHR/Nestin e GHR/LepR) foram alocadas com machos de genótipo oposto de forma a minimizar o efeito do genótipo da prole nas adaptações metabólicas da mãe durante a gestação. As fêmeas em acasalamento foram monitoradas diariamente até a detecção do tampão vaginal (plug copulatório) este foi considerado o dia 1 de gestação. As fêmeas foram mantidas com o macho num período máximo de 3 semanas, se o tampão não fosse identificado estas fêmeas eram removidas do experimento. Este sistema foi adotado em todos os experimentos.

As fêmeas foram acompanhadas antes do acasalamento por uma semana para avaliação do balanço energético [peso corporal (g) e ingestão alimentar (g/d)]. Após a confirmação da gestação as fêmeas foram individualizadas e tiveram o consumo e peso corporal registrados diariamente durante a gestação (aproximadamente 19 dias) e lactação (21 dias). Uma vez que estes parâmetros estão associados com o número de filhotes por ninhada, o número destes foi normalizado para cinco no dia do parto, os filhotes eram de ambos os sexos (ZAMPIERI et al., 2015).

Na prole, os parâmetros avaliados foram: o número de nascidos vivos, o peso da ninhada completa em diferentes momentos; no nascimento, após a normalização do número de filhotes (L0), no sétimo dia (L7), no décimo quarto dia (L14) e no vigésimo primeiro dia (L21) que corresponde ao dia do desmame.

4.2.1.3 Teste de sensibilidade hormonal durante a gestação

a) Homeostase glicêmica

Para avaliação da homeostase glicêmica, outro grupo de fêmeas grávidas foi submetido a dois testes. O teste de tolerância à glicose (GTT, do inglês) foi realizado entre o 13º e o 15º dia de gestação, a fim de avaliar a capacidade de assimilação da glicose durante a gestação. Após um período de restrição alimentar de 4h, as fêmeas receberam injeção de solução de glicose subcutânea (2g/kg) numa concentração de 40% para que o volume de solução administrado fosse menor a fim de minimizar o estresse para a grávida. A glicemia foi aferida em amostra do sangue da veia caudal por glicosímetro portátil (One Touch Ultra – Johnson & Johnson) nos tempos 0 (basal), 20, 40, 60, 90 e 120 minutos após a injeção. A determinação destes valores serviu de comparação da glicemia entre os grupos em cada ponto do teste e para o cálculo da área sob a curva de glicêmica.

Entre o 17-18º dia de gestação foi realizado, nas mesmas fêmeas que passaram pelo GTT, o teste de tolerância à insulina (ITT, do inglês) que permite a avaliação da sensibilidade ao hormônio. O período de privação alimentar foi o mesmo do teste descrito anteriormente (4h), as fêmeas receberam uma injeção de insulina via subcutânea (1 UI/g) e as glicemias foram aferidas nos mesmos momentos (0, 20, 40, 60, 90 e 120). Estes valores serviram para comparação das glicemias entre os grupos em cada ponto avaliado e para o cálculo da constante de decaimento da glicose (KITT).

Outro teste para medir a capacidade de secreção de insulina foi feito em um outro grupo de fêmeas grávidas de ambas as mutações ($GHR^{flox/flox}/Nestin^{cre}$ e $GHR^{flox/flox}/LepR^{cre}$). Para tanto as fêmeas passaram por um período de restrição alimentar (4h), posteriormente receberam v.sc. 2g/kg de glicose em solução 40%, as glicemias do sangue da cauda foram aferidas por meio de glicosímetro portátil, nos tempos 0, 5 e 20min, nestes mesmos pontos foi coletado o sangue da cauda por gotejamento, o soro separado e foi dosada a concentração de insulina sérica por ELISA.

b) Sensibilidade à leptina

As fêmeas grávidas dos genótipos estudados (n=8/grupo), após passarem por um período de 4h de restrição alimentar para padronização do estado alimentado, receberam injeção via s.c. de leptina (2,5 µg/g) e 90 minutos após a administração do hormônio, as fêmeas foram anestesiadas com anestésico inalatório (isoflurano). Posteriormente foi conduzida a perfusão transcardíaca (primeiramente solução salina seguida de solução de formalina 10%). Os encéfalos foram pós-fixados em formalina por um período de 45min e em seguida crioprotetidos em solução de sacarose 20%. Os mesmos passaram por microtomia e os cortes (30 µm) foram processados por imunohistoquímica (como descrito anteriormente), incubados com anticorpo primário anti-pSTAT3^{Tyr705} (1:1000, Cell Signaling) e reagidos por imunoperoxidase. Os cortes foram então montados em lâminas gelatinizadas, desidratados em banhos seriados de álcool, incubados em xilol e cobertos em meio de montagem DPX e por lamínula. As imagens obtidas das regiões específicas foram obtidas em microscópio óptico (Zeiss Axioimager A – Zeiss, Muencher, Alemanha), num aumento de 10x, as condições de exposição e intensidade de luz foram padronizadas.

A contagem dos neurônios marcados (imunorreativos à pSTAT3) foi realizada manualmente utilizando o software Image J (National Institutes of Health, USA), ferramenta *Cell Counter*. Os núcleos escolhidos para avaliação foram aqueles que sabidamente contém um número expressivo de neurônios responsivos à leptina (área pré-óptica media – MPA, arqueado do hipotálamo – ARH, ventromedial do hipotálamo – VMH, área hipotalâmica lateral – LHA, dorsomedial do hipotálamo – DMH, pré-mamilar ventral – PMV), o nível avaliado foi aquele que apresentou um número representativo de células marcadas.

4.2.1.4 Dosagem de hormônios séricos

Um grupo de fêmeas foi eutanasiado nos últimos dias da gestação (18-19 d) e amostras de sangue foram coletadas para separação do soro e foram dosadas por ensaio imunoabsorção enzimática (ELISA) utilizando kits comerciais específicos as concentrações séricas de insulina (Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit, #90080 – Crystal Chem), leptina (Ultra Sensitive Mouse Leptin ELISA Kit, #90030 – Crystal Chem) e IGF-1 (ELISA Mouse/Rat IGF-1 kit, R&D Systems).

4.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram apresentados como média (erro padrão médio). A análise estatística foi conduzida com auxílio do software GraphPad Prisma (versão 7.0). Foi adotado intervalo de confiança de 95% (nível de significância de 0,05). A normalidade dos dados foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. Os testes de comparação de médias escolhidos após avaliação da normalidade dos dados foram conduzidos testes paramétricos (para dados com distribuição normal -test t ou ANOVA).

5 RESULTADOS

5.1 SUBPROJETO 1

Foram utilizados 114 camundongos fêmeas (controles e nocautes dos genes STAT5a e STAT5b) para a condução dos experimentos propostos no subprojeto 1. Destas, 78 compuseram oito coortes de testes *in vivo* e foram eutanasiadas para coleta de tecido a fresco (n=13/grupo); e 36 passaram por perfusão transcardíaca (n=6/grupo) para coleta do encéfalo fixado. A fim de investigar a repercussão da gestação e lactação a longo prazo no organismo da fêmea inicialmente foram testados animais selvagens (sem nenhuma modificação genética). Os grupos experimentais foram delineados para que fosse possível estudar o efeito da gestação isoladamente, assim como da gestação combinada com lactação. As figuras 3-11 referem-se aos dados de fêmeas C57BL6 sem deleção gênica.

5.1.1 Repercussões da gestação e/ou da lactação no metabolismo de camundongos no longo prazo

A Figura 3 apresenta a evolução do peso corporal por 20 semanas de camundongos fêmeas com mesma idade distribuídas em três diferentes grupos experimentais: **Virgens** que nunca foram expostas à cópula; **Gestação** que passaram por uma única gestação e foram separadas dos filhotes no dia do nascimento; e **Gestação+Lactação** que tiveram uma gestação seguida de 21 dias de lactação dos filhotes de sua ninhada. A semana “0” refere-se à primeira semana que as fêmeas dos três grupos experimentais já tinham sido expostas à condição experimental desejada correspondente ao período pós-gestacional/lactação.

As fêmeas do grupo G+L apresenta maior peso corporal em todo o período avaliado, quando comparadas tanto aos controles (Virg) quanto àquelas do grupo que não lactaram (Gest) na maior parte dos pontos avaliados. Após a 10ª semana de acompanhamento, a diferença de peso entre as Gest e as fêmeas Virgens desaparece, assinalando que o período de lactação promove impacto a longo prazo no peso corporal das fêmeas além da gestação.

Figura 3. Fêmeas que passaram por gestação e lactação apresentam maior peso corporal em acompanhamento longitudinal da evolução do peso corporal (período de 20 semanas pós gestação/lactação) de camundongos fêmeas controles (c57bl6) que passaram ou não pela experiência gestacional, seguida ou não de lactação.

*Gest é diferente de virgem; #G+L é diferente de virgem; †G+L é diferente de Gest; Virgem (n=16); Gestação (n=12); Gestação+Lactação (n=13).

As fêmeas virgens (controles) foram controladas segundo a idade. Diferença significativa quando $p < 0,05$ em teste de comparação de médias (ANOVA).

Após este período médio de 20 semanas de acompanhamento, as fêmeas dos três grupos foram individualizadas para os testes *in vivo*. Durante uma semana, em dias alternados, foi monitorado o consumo de ração; contudo, não houve diferença entre os grupos experimentais. Na Figura 4A está apresentada a média diária da ingestão de ração em uma semana das fêmeas dos diferentes grupos experimentais. Em seguida, estes animais foram transferidos para gaiolas metabólicas para obtenção de parâmetros como ingestão de água, consumo de oxigênio (VO_2), coeficiente respiratório (RER), e deambulação (Deambulatory – counts) por calorimetria indireta no aparelho Oxymax-CLAMS (Figura 4B-E). Com relação a esses dados relativos à média de uma semana de avaliação, foram analisados no período claro, escuro e nas 24 horas, não foram observadas diferenças significativas no consumo de água, no gasto energético, assim como o coeficiente respiratório – RER (Figura 4D). Contudo, vale observar uma tendência (não significativa) de redução do gasto energético (VO_2) (Figura 4C) nos grupos Gest e G+L. Além disso, foi observado que no período escuro as fêmeas do grupo G+L deambulam menos, comparadas ao grupo Virgens, o poderia incorrer num menor dispêndio energético.

Figura 4. Monitoramento metabólico no período de uma semana em sistema OXYMAX/CLAMS de fêmeas selvagens (c57bl6) na 20ª semana após passarem ou não pela gestação, seguida ou não de lactação. Em **A-B**, média do consumo de ração e ingestão de água no período de uma semana das fêmeas dos três grupos experimentais. **C-E**, monitoramento metabólico pela avaliação do VO_2 (C), coeficiente respiratório (D) e observação de menor deambulação (E) das fêmeas que passaram pela gestação e gestação com lactação no ciclo escuro; no período de uma semana e suas respectivas médias.

Virgem (n=12); Gestação (n=8); Gestação+Lactação (n=10). † G+L é diferente de Virg (ANOVA).

A fim de determinar se o maior peso corporal das fêmeas dos grupos experimentais em relação às fêmeas virgens foi decorrente de maior volume de tecido adiposo, foi mensurado o peso de quatro diferentes depósitos adiposos (subcutâneo da região abdominal, periuterino, periovariano e retroperitoneal) coletados bilateralmente no momento da eutanásia. Na figura 5, são apresentados os dados de adiposidade corporal. Nota-se maior volume de tecido adiposo no compartimento periuterino de fêmeas que passaram pela gestação seguida de lactação. Quando avaliada a adiposidade pelo somatório destes quatro depósitos de tecido adiposo não é observada diferença entre os grupos.

Figura 5. Fêmeas que passaram pela gestação seguida de lactação apresenta maior depósito de gordura periuterina após 20 semanas de acompanhamento pós-gestacional. Adiposidade corporal de fêmeas (c57bl6) depois da 20ª semana de acompanhamento após passarem ou não pela gestação, seguida ou não de lactação. Avaliada pelo peso de quatro diferentes depósitos de tecido adiposo; subcutâneo, periuterino, periovariano e retroperitoneal.

Virgem (n=10); Gestação (n=8); Gestação+Lactação (n=8). † G+L é diferente de Virg.; ‡ Gest é diferente de G+L comparação de médias por ANOVA.

Durante a gestação ocorre simultaneamente dois quadros de alteração da sensibilidade hormonal, grávidas apresentam transitoriamente resistência à insulina, bem como resistência à leptina. Com o intuito de avaliar se essas alterações são permanentes ou poderiam prejudicar o controle glicêmico da fêmea que passou pela gestação, foram realizados os testes de sensibilidade à insulina e tolerância à glicose

para avaliação da homeostase glicêmica da fêmea no período pós-gestacional tardio. Estes dados são apresentados na Figura 6A-D. A curva de decaimento da glicose no teste de sensibilidade à insulina (do inglês, ITT) apresenta um comportamento semelhante entre os grupos (Figura 6A), portanto a constante de decaimento da glicose (KITT) não apresenta diferenças (Figura 6C); assim como os valores de glicemia em todos os momentos avaliados durante o teste (glicemia basal e nos tempos 20, 40, 60, 90 e 120) que são semelhantes entre os três grupos. No teste de tolerância à glicose (GTT) tanto nos valores de glicemia obtidos quanto na área sob a curva calculada, baseada nos seis diferentes pontos de aferição não foram observadas diferenças entre os grupos. Estes parâmetros combinados indicam que a homeostase glicêmica não é alterada a longo prazo pelo fato de a fêmea ter sido gestante (com ou sem lactação).

Figura 4. Homeostase glicêmica de fêmeas (c57bl6) na 20ª semana após passarem ou não pela gestação, seguida ou não de lactação. **A-B.** curva glicêmica nos testes de tolerância à insulina (ITT) (A) e tolerância à glicose (B) glicemias aferidas no momento imediato antes do teste (basal, 0) e nos tempos após 20, 40, 60, 90 e 120 minutos após injeção de insulina v.ip. (1 UI/kg) (ITT) ou solução de glicose (2 g/Kg); **C.** constante de decaimento da glicemia no ITT (KITT) e **D.** área sob a curva do GTT Virgem (n=14); Gestação (n=10); Gestação+Lactação (n=12). Diferença significativa quando $p < 0,05$ em teste de comparação de médias (ANOVA). As comparações das glicemias nos testes (ITT e GTT) foram realizadas em todos os pontos do teste individualmente.

Também foi testado se a sensibilidade à leptina é modificada a longo prazo pelo fato de a fêmea ter sido gestante. O teste conduzido avalia a resposta aguda a este hormônio e foram feitas as mensurações do peso corporal em três diferentes pontos após injeção subcutânea do hormônio ou de tampão fosfato-salino (PBS) (Figura 7). A variação da ingestão do consumo e do peso corporal referem-se à diferença dos valores obtidos 4h, 14h e 24h após a administração da leptina em comparação aos mesmos valores quando a injeção foi de PBS. Fêmeas do grupo G+L mostraram maior perda de peso em resposta à leptina 14h após injeção, embora não houve diferença significativa entre os grupos no consumo alimentar (Figura 7B). Uma vez que não foi observada nenhuma diferença em relação das fêmeas dos grupos experimentais (Gest e G+L) em relação aos controles, pode-se inferir que o fato de a fêmea ter sido gestante não altera a longo prazo a sensibilidade à leptina. Entretanto, o fato de a fêmea ter lactado é um fator que promoveu uma variação significativa no peso corporal após 14h da administração da leptina o que poderia indicar uma melhor resposta aguda a este hormônio.

Figura 7. Fêmeas que passaram por gestação seguida de lactação apresentam maior perda de peso aguda após 14h de injeção de leptina exógena. Variação do consumo alimentar (A) e diferença de peso corporal (B) de fêmeas (c57bl6) em três momentos (4h, 14h e 24h) após administração de leptina em comparação à administração de solução de tampão fosfato-salino após 20 semanas do período gestacional, seguida ou não de lactação.

Virgem (n=7); Gestação (n=4); Gestação+Lactação (n=7). ‡ Gest é diferente de G+L (ANOVA).

Após coleta de sangue, foram analisadas as concentrações séricas de insulina, leptina ou estradiol (Figura 8A-C), porém nenhuma diferença entre os grupos foi observada.

Figura 8. Concentração sérica dos hormônios insulina (A), leptina (B) e estradiol (C) de camundongos fêmeas controles (c57bl6) e de fêmeas que passaram por período gestacional seguido (G+L) ou não (Gest) de lactação após 20 semanas de acompanhamento. Dosagens realizadas por meio de kits comerciais de ELISA. O ciclo estral das fêmeas foi controlado e as dosagens referem-se ao período de diestro. Fêmeas virgens (controle) tinham a idade correspondente àquelas dos grupos experimentais. Virgens (n=10), Gest (n=8), G+L (n=8).

Para avaliar se a experiência gestacional, seguida ou não de lactação promove modulação gênica hipotalâmica no longo prazo foi quantificado nesta região encefálica a expressão de genes conhecidos pelo importante papel no controle do balanço energético corporal, bem como de receptores de alguns hormônios envolvidos com regulação metabólica neste período. Foi quantificada a expressão gênica, pela mensuração de mRNA de quatro genes que codificam neuropeptídeos relacionados com controle da ingestão alimentar [neuropeptídeo relacionado ao agouti (AgRP), transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), pró-opiomelanocortina (POMC), neuropeptídeo Y (NPY)]; dois genes que codificam proteínas relacionadas com regulação da sinalização celular, neste caso, modulação da sensibilidade hormonal - particularmente leptina e prolactina [supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3) e o gene da proteína contendo SH2 indutível por citocina (CISH)].

Ainda foi quantificada a expressão gênica de receptores dos principais hormônios envolvidos com o período gestacional [receptor de prolactina (PrIR), receptor de estrógeno α (ER- α) e receptor de GH (GHR) e o gene tirosina hidroxilase (TH) que no hipotálamo está relacionado com o controle da secreção de prolactina. Além destes, foi avaliada a expressão gênica de seis genes que codificam enzimas responsáveis deacetilação de histonas (HDAC3, HDAC5 e HDAC8) e metilação do DNA (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b). Ao avaliar estas últimas, pretendíamos investigar se a experiência reprodutiva poderia promover mudanças permanentes por alterações epigenéticas. Nas fêmeas selvagens, foi observada apenas alteração na expressão do gene que codifica para histona deacetilase 8, indicando uma possível modulação epigenética induzida pela lactação (Figura 9).

Figura 9. Expressão gênica hipotalâmica de fêmeas (c57bl6) após 20 semanas de acompanhamento de fêmeas controles e de fêmeas que passaram por período gestacional seguido (G+L) ou não (Gest) de lactação. Avaliação realizada por PCR em tempo real; comparação feita por one-way ANOVA.

Uma vez que foi observado aumento da expressão do gene que codifica para uma das enzimas responsáveis pela deacetilação de histonas, buscamos investigar possíveis alterações na marcação de histona 3 acetilada em núcleos hipotalâmicos importantes na regulação do balanço energético como o núcleo arqueado, núcleo ventromedial e paraventricular do hipotálamo (Figura 10). Observa-se que a experiência da lactação promove hipoacetilação de histona 3 em todos os núcleos avaliados.

Figura 10. Marcação de histonas 3 acetiladas por imuno-histoquímica no PVH, ARC, VMHdm e VMHvl após 20 semanas de acompanhamento de fêmeas controles (A e D) e de fêmeas que passaram por período gestacional sem lactação (Gest - B e E) e fêmeas que passaram pela gestação seguida de lactação (G+L - C e F); G-J: contagem das células nos núcleos hipotalâmicos avaliados; comparação feita por one-way ANOVA.

Para avaliar se a gestação e a lactação promovem alterações neuroanatômicas a longo prazo, foi avaliada a distribuição do receptor de estrógeno alfa em três regiões classicamente conhecidas pela distribuição abundante deste receptor, os

núcleos arqueado e ventromedial do hipotálamo e amígdala (Figura 11). Nota-se que a lactação promove redução do receptor de estrógeno em todas as áreas avaliadas.

Figura 11. Avaliação da distribuição de células responsivas ao anti-ERα no VMH, ARC e AMG após 20 semanas de acompanhamento de fêmeas controles (A e D) e de fêmeas que passaram por período gestacional sem lactação (Gest - B e E) e fêmeas que passaram pela gestação seguida de lactação (G+L - C e F); G: contagem das células nas áreas cerebrais avaliadas; comparação feita por one-way ANOVA.

†Virgem é diferente de Gestação+Lactação; *Diferente de todos os grupos

5.1.2 Repercussões da gestação e/ou da lactação no metabolismo de camundongos com deleção neural de STAT5 no longo prazo

A gestação e a lactação são períodos caracterizados pelo aumento das concentrações séricas de hormônios como, por exemplo, leptina, GH e prolactina (GATFORD et al., 2017; LADYMAN E GRATTAN, 2016; ZAMPIERI et al, 2015). Estes hormônios atuam nas células alvo ligando-se a seus receptores específicos, que são membro da família dos receptores de citocina e ativam as proteínas STAT5. Para

determinar a importância da via de sinalização do STAT5 para manutenção da homeostase glicêmica e sensibilidade à leptina no pós-gestacional tardio, assim como seu papel nas alterações metabólicas promovidas pela gestação e lactação no longo prazo; conforme observamos: maior retenção de peso corporal, menor deambulação, alteração na expressão gênica hipotalâmica de HDAC8, padrão de acetilação da histona 3 no hipotálamo e redução da distribuição do receptor de estrógeno alfa.

Foram geradas fêmeas deficientes dos genes STAT5a e STAT5b especificamente nas células que expressam o gene NES (predominantemente neurônios) (Nestin/STAT5). A Figura 12 apresenta valores de expressão gênica hipotalâmica dos genes STAT5a e STAT5b de fêmeas controle (sem deleção) e nocautes. Observa-se que há redução significativa de ambos os genes, o STAT5a apresenta redução de aproximadamente 80% enquanto a expressão do gene STAT5b foi reduzido em 99,9%. Esta avaliação valida o modelo de deleção gênica utilizado.

Figura 12. Expressão gênica hipotalâmica de fêmeas (c57bl6) controles e com deleção neural dos genes STAT5a e STAT5b (Nestin/STAT5). Avaliação realizada por PCR em tempo real; comparação feita por teste *t* não-pareado.

As figuras 13-21 apresentam os resultados das avaliações conduzidas em fêmeas nocaute neuronal dos genes *Stat5a* e *Stat5b*. É importante destacar que foram adotados os mesmos critérios metodológicos e os mesmos protocolos experimentais foram aplicados nos experimentos com fêmeas selvagens e com aquelas fêmeas nocautes.

Pode-se notar que a evolução do peso das fêmeas dos diferentes grupos de animais nocaute diverge menos que aqueles selvagens (Figura 13). As fêmeas do grupo G+L têm maior peso corporal até a 10ª semana pós-gestacional e as do grupo

Gest apenas até a 5ª semana quando comparadas às virgens. Contudo, após esse período não foi mais observada diferença entre os grupos.

Figura 13. Fêmeas com nocaute neuronal dos genes STAT5 que passaram por gestação seguida de lactação apresentam maior peso corporal até a décima semana pós-gestacional. Acompanhamento da evolução do peso corporal (período de 20 semanas) de camundongos fêmeas com deleção neuronal dos genes STAT5a e STAT5b que passaram ou não pela experiência gestacional, seguida ou não de lactação. (NESTIN Virgem, NESTIN Gestação e NESTIN Gestação+Lactação).

*Gest KO é diferente de Virgem KO; #G+L KO é diferente de Virgem KO; †G+L KO é diferente de Gest KO; NESTIN Virgem (n=12); NESTIN Gestação (n=23); NESTIN Gestação+Lactação (n=19).

Após acompanhamento longitudinal do peso corporal das fêmeas nocaute dos três grupos experimentais (virgens tiveram a idade pareada às dos grupos que passaram pelo período de gestação com ou sem lactação), os animais foram individualizados para mensuração de parâmetros metabólicos por calorimetria indireta durante uma semana (Figura 14). O consumo de ração foi semelhante entre as fêmeas dos três grupos (Figura 14A), enquanto a ingestão hídrica no ciclo escuro (período ativo do animal) das fêmeas do grupo gestação (Figura 14B) foi menor que a dos outros grupos avaliados. Aquelas do grupo Gestação apresentaram menor consumo de oxigênio (VO_2) comparadas às virgens, denotando menor gasto energético em ambos os períodos de atividade escuro (ativo) e claro (repouso). O coeficiente respiratório (Figura 14D) e a deambulação (Figura 14E) não diferiram entre os grupos.

Figura 14. Monitoramento metabólico no período de uma semana em sistema OXYMAX/CLAMS de fêmeas nocaute cerebral dos genes STAT5 (Nestin/STAT5) na 20ª semana após passarem ou não pela gestação, seguida ou não de lactação. Em **A-B**, média do consumo de ração e ingestão de água

no período de uma semana das fêmeas dos três grupos experimentais. **C-E.** monitoramento metabólico pela avaliação do VO_2 (C), coeficiente respiratório (D) e observação de menor deambulação (E) das fêmeas que passaram pela gestação (NESTIN Gest) e gestação com lactação (NESTIN G+L) no ciclo escuro; no período de uma semana e suas respectivas médias.

NESTIN Virgem (n=11); NESTIN Gestação (n=18); NESTIN Gestação+Lactação (n=16). #Gest é diferente de Virg; ‡Gest é diferente de G+L (ANOVA).

Após estas avaliações foi mensurado o peso dos compartimentos de tecido adiposo (Figura 15) e, diferente do observado nas fêmeas selvagens, o grupo G+L nocaute não teve maior depósito de gordura no compartimento de tecido adiposo periuterino; neste experimento nota-se maior acúmulo neste mesmo compartimento, porém em fêmeas que passaram apenas pela gestação quando comparadas às virgens.

Figura 15. Fêmeas que passaram pela gestação apresenta maior depósito de gordura periuterina após 20 semanas de acompanhamento pós-gestacional. Adiposidade corporal de fêmeas nocaute (NESTIN/STAT5) depois da 20ª semana de acompanhamento após passarem ou não pela gestação, seguida ou não de lactação. Avaliada pelo peso de quatro diferentes depósitos de tecido adiposo; subcutâneo, periuterino, periovariano e retroperitoneal.

NESTIN Virgem (n=10); NESTIN Gestação (n=19); NESTIN Gestação+Lactação (n=21). #Gest é diferente de Virg em teste de comparação de médias (ANOVA).

Ao avaliarmos a homeostase glicêmica, demonstrada na figura 16, nota-se que a experiência da gestação, seguida ou não da lactação em fêmeas com deleção neural dos genes STAT5 (Nestin STAT5 KO), parece melhorar a homeostase glicêmica. A área sob a curva (GTT) não foi diferente entres os grupos nos testes, entretanto o decaimento da glicose avaliado pela comparação da constante de decaimento da curva glicêmica (ITT) foi maior no grupo de fêmeas nocaute que passaram pela experiência da gestação demonstrando maior sensibilidade à insulina exógena, o mesmo não foi observado nos grupos de fêmeas sem deleção (c57bl6).

Tais dados indicam que a condição hormonal a que as fêmeas são sujeitas no período gestacional e de lactação, apesar de não piorar, pode modular a homeostase glicêmica a longo prazo via ativação do STAT5 no sistema nervoso.

Figura 16. Homeostase glicêmica de fêmeas com deleção neural dos genes STAT5a e STAT5b após acompanhamento longitudinal de 20 semana após passarem ou não pela gestação, seguida ou não de lactação. **A-B.** curva glicêmica nos testes de tolerância à insulina (ITT) (A) e tolerância à glicose (B) glicemias aferidas no momento imediato antes do teste (basal, 0) e nos tempos após 20, 40, 60, 90 e 120 minutos após injeção de insulina v.i.p. (1 UI/kg) (ITT) ou solução de glicose (2 g/Kg); **C.** constante de decaimento da glicemia no ITT (KITT) e **D.** área sob a curva do GTT

Virgem (n=10); Gestação (n=6); Gestação+Lactação (n=11). Diferença significativa quando $p < 0,05$ em teste de comparação de médias (ANOVA). As comparações das glicemias nos testes (ITT e GTT) foram realizadas em todos os pontos do teste individualmente.

Neste grupo de fêmeas nocaute também foi avaliada a sensibilidade aguda à leptina. Foi observado maior redução do consumo de ração (após 24h da injeção) entre as fêmeas que passaram pela gestação seguida de lactação o que pode indicar maior sensibilidade à leptina aguda a leptina (Figura 17). Na figura 17 são apresentados dados de variação de ingestão de ração e diferença de peso corporal mensurados quando administrado PBS em relação à administração intraperitoneal de leptina (dose: 2,5µg/g). A variação de peso corporal não apresenta diferença entre os grupos (Figura 17B).

Figura 17. Fêmeas que passaram por gestação seguida de lactação apresentam maior redução do consumo alimentar após 24h de injeção de leptina exógena. Variação do consumo alimentar (A) e diferença de peso corporal (B) de fêmeas nocaute (Nestin/STAT5) em três momentos (4h, 14h e 24h) após administração de leptina (via i.p., dose: 2,5 µg/g) peso em comparação à administração de solução de tampão fosfato-salino após 20 semanas do período gestacional, seguida ou não de lactação. Virgem (n=10); Gestação (n=16); Gestação+Lactação (n=19). †G+L é diferente de Virg; ‡Gest é diferente de G+L; em teste de comparação de médias (ANOVA).

Também foi mensurada as concentrações séricas de insulina, leptina e estradiol das fêmeas Nestin/STAT5 KO (Figura 18). Contudo, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos experimentais.

Figura 18. Concentração sérica dos hormônios insulina (A), leptina (B) e estradiol (C) de camundongos fêmeas nocaute (Nestin/STAT5) e de fêmeas que passaram por período gestacional seguido (G+L) ou não (Gest) de lactação após 20 semanas de acompanhamento. Dosagens realizadas por meio de kits comerciais de ELISA. O ciclo estral das fêmeas foi controlado e as dosagens referem-se ao período de diestro. Fêmeas virgens (controle) tinham a idade correspondente àquelas dos grupos experimentais. Comparação de médias feita por ANOVA.

Os mesmos genes hipotalâmicos avaliados nos grupos de camundongos selvagens também tiveram a expressão quantificada nos grupos de fêmeas nocautes (figura 19). Diferentemente do que foi observado no grupo de fêmeas selvagens, os genes AgRP e o NPY, que codificam para neuropeptídeos orexígenos, estão menos expressos no hipotálamo das fêmeas nocautes que passaram pela gestação, seguida ou não de lactação. Além destes genes, foi observada maior expressão dos genes do

CISH, do GHR e do LepR no grupo G+L. Enquanto que o gene da DNMT3b, que codifica para a enzima que catalisa a transferência de grupo metil para o DNA, foi menos expresso nas fêmeas com deleção neural dos genes STAT5 que passaram pela experiência de gestação seguida de lactação.

As fêmeas nocautes do grupo Gest tiveram redução de mRNA do gene que codifica o receptor de prolactina quando comparada aos outros grupos. Estas alterações reforçam que a via STAT5 é importante para a regulação metabólica a longo prazo da fêmea já passou pela experiência reprodutiva.

Figura 19. Expressão gênica hipotalâmica de fêmeas com deleção neural dos genes STAT5a e STAT5b após 20 semanas de acompanhamento pós-gestacional.

Avaliação realizada por PCR em tempo real; comparação feita por one-way ANOVA.

#Virgem é diferente de Gestação; †Virgem é diferente de Gestação+Lactação; * Diferente de todos os grupos

Embora não tenha sido observada nenhuma alteração na expressão nos genes que codificam para as enzimas que deacetilam histonas (HDAC's), foram conduzidas, assim como no grupo de fêmeas sem deleção gênica, reações de imunohistoquímica para avaliar o padrão de histona 3 acetilada em três diferentes núcleos hipotalâmicos (Figura 20). Em concordância com os dados de expressão gênica, observa-se que não há diferença na quantidade de células com marcação de histona 3 acetilada.

Figura 20. Marcação de histonas 3 acetiladas por imuno-histoquímica no PVH, ARC, VMHdm e VMHvl após 20 semanas de acompanhamento de fêmeas com deleção neural dos genes STAT5a e STAT5b. Em A e D distribuição de células imunorreativas à anti-H3ac de fêmeas virgens, em B e E de fêmeas que passaram por período gestacional sem lactação (Gest) e em C e F de fêmeas que passaram pela gestação seguida de lactação (G+L); G-J: contagem das células nos núcleos hipotalâmicos avaliados; comparação feita por one-way ANOVA.

Uma vez que a experiência reprodutiva (gestação e lactação) foi capaz de reduzir a distribuição de receptor de estrógeno alfa (ER α) a longo prazo tanto nos

núcleos hipotalâmicos (arqueado e ventromedial) quanto na amígdala, buscamos avaliar se essa alteração depende da ativação neural da via STAT5. Foi avaliada a distribuição de células imunorreativas ao anti-ER α em cortes encefálicos de fêmeas com deleção neural dos genes STAT5a e b, virgens e que passaram pela experiência reprodutiva, seguida (G+L) ou não de lactação (Gest). A distribuição do receptor de estrógeno alfa foi igual entre as fêmeas nocautes dos três grupos experimentais; nas três regiões avaliadas (Figura 21). Desta forma pode-se afirmar que esta adaptação neuro-anatômica pós-gestacional a longo prazo depende da ativação neural da via STAT5.

Figura 21. Avaliação da distribuição de células responsivas ao anti-ER α no VMH, ARC e AMG após 20 semanas de acompanhamento de fêmeas com deleção neural dos genes STAT5a e b; Virgens (A e D) e de fêmeas que passaram por período gestacional sem lactação (Gest - B e E) e fêmeas que passaram

pela gestação seguida de lactação (G+L – C e F); G: contagem das células nas áreas cerebrais avaliadas; comparação feita por one-way ANOVA.

5.2 SUBPROJETO 2

No estudo anterior (Subprojeto 1) foram investigadas as repercussões metabólicas da gestação e/ou lactação no metabolismo materno a longo prazo. Os mesmos parâmetros foram avaliados em dois diferentes modelos de animais: em fêmeas selvagens (c57bl6) e naquelas com deleção tecido específica (neural) dos genes STAT5a e STAT5b. Estes genes codificam para proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição – especificamente a 5 – a via STAT5 é a principal ativada pelos hormônios que estão aumentados na gestação e lactação, particularmente prolactina e GH. De tal modo, os delineamentos experimentais foram conduzidos para que fosse possível compreender se o aumento destes hormônios a que a fêmea está sujeita durante a gestação promove uma programação metabólica no organismo feminino, e se isto ocorre por meio da ativação neural desta via específica.

No subprojeto 2 pretende-se compreender especificamente o papel do GH na modulação metabólicas durante a gestação e lactação. Para tanto foram gerados dois modelos de deleção gênica tecido-específica utilizando-se da mesma tecnologia empregada no primeiro subprojeto (sistema Cre-loxP). As fêmeas grávidas avaliadas apresentavam deleção neural do receptor de GH (GHR/Nestin) ou deleção deste mesmo receptor em células que também expressam o receptor de leptina (GHR/LepR). Uma vez que a resistência a este hormônio é uma condição observada durante a gestação e é responsável por parte das alterações metabólicas deste período (Ladyman e Grattan, 2016; Ladyman e Grattan 2004), avaliamos no modelo GHR/LepR uma possível interação entre o GH e a leptina na regulação metabólica da gestação.

As figuras 22-32 correspondem às avaliações realizadas nas fêmeas com deleção neural do receptor de GH (GHR/Nestin) e seus respectivos controles. Na figura 22 observa-se a confirmação da deleção do receptor de GH em diferentes núcleos cerebrais (hipotálamo e amígdala). A validação do modelo foi baseada na verificação da presença de células imunorreativas ao pSTAT5 após tratamento com solução salina em animais controles para determinar o estado basal de células pSTAT5-ir ou com GH porcino em animais controles e nocautes. Nota-se uma redução

significante no número de células marcadas após estímulo com GH em animais nocaute em todas as áreas investigadas.

Figura 22. Confirmação da deleção neuronal do receptor de GH (GHR) pela quantificação de células imuno-reativas ao pSTAT5 (pSTAT5-ir) em diferentes núcleos neuronais após tratamento com GH porcino (pGH) ou salina. **A-C.** fotomicrografia em campo claro de cortes encefálicos de animais controles após injeção de salina demonstrando a distribuição de células pSTAT5-ir basal em diferentes núcleos encefálicos. **D-F.** células pSTAT5-ir de animal controle tratado com pGH. **G-I.** células pSTAT5-ir de células pSTAT5-ir de animal nocaute tratado com pGH. **J.** Número de células imuno-reativas ao pSTAT5 em diferentes núcleos do cérebro (n=3/grupo). As células foram contadas eletronicamente em um nível rostrocaudal de cada área usado o software ImageJ.

Abreviações: 3v, terceiro ventrículo; ARH, núcleo arqueado do hipotálamo; CEA, núcleo central da amígdala; DMH, núcleo dorsomedial do hipotálamo; fx, fornix; MEA, núcleo medial da amígdala; opt, trato óptico; PV, núcleo paraventricular; PVH, núcleo paraventricular do hipotálamo; VMH, núcleo ventromedial do hipotálamo. Escala= 200 μ m.

Além desta, conduzimos outros dois tipos de validação: por expressão gênica (Figura 23A) e por imunofluorescência, específica para o animal GHR/LepR (Figura 23B-E). Uma vez que, neste modelo a deleção do GHR acontece especificamente nas células com receptor de leptina e existe grande número de populações neuronais que expressam GHR - mas não o LepR - não é factível validar este animal mensurando ativação de pSTAT5 ou por expressão gênica global. Para tanto, utilizamos animais LepR/tdTOMATO que co-expressam a proteína fluorescente *tomato* ao promotor do gene *LepR*. Assim, é possível visualizar as células LepR (em vermelho) e o pSTAT5 após injeção periférica de GH (em verde), quando há co-localização a célula é visualizada em amarelo. Nota-se que o animal nocaute (Figura 23C e E) apresentou baixo número de co-localização, demonstrando deleção eficaz do GHR em células LepR. O que valida nosso modelo.

Figura 23. Deleção de GHR em células que expressam LepR. **A.** Expressão gênica de *Ghr* no hipotálamo de camundongos fêmeas controle (n = 8), GHR Nestin (n = 8) and GHR LepR (n = 8). *GHR Nestin é diferente de todos os grupos ($p < 0,05$); # GHR LepR é diferente do GHR Nestin ($p < 0,05$). **B-E.** Fotomicrografias demonstrando neurônios que expressam LepR em vermelho e neurônios marcados com pSTAT5 após tratamento com GH (em verde). O amarelo representa células duplamente marcadas. Abreviações: 3V, terceiro ventrículo; ARH, núcleo arqueado; VMH, núcleo ventromedial do hipotálamo. Escala= 100 μ m.

Uma vez que foram testadas fêmeas exclusivamente no período gestacional, foram realizados testes no período basal (estado não gravídico) nos dois modelos de

deleção de GH (GHR/Nestin e GHR/LepR). A figura 24 apresenta os dados obtidos nestas avaliações. As fêmeas do grupo com nocaute neuronal do receptor de GH são maiores (figura 24A e B) e mais pesadas (figura 24C) mesmo sem nunca terem passado pelo período gestacional. Em relação ao consumo de ração relativizado pelo peso corporal, é observado um comportamento hiperfágico da fêmea GHR/LepR já no período basal (figura 24D). Não há diferença na homeostase glicêmica (figura 25E-H) quando comparadas as fêmeas controles e as fêmeas nocaute do receptor de GH neuronal ou nas células que expressam receptor de leptina no período basal.

Figura 24. Caracterização das fêmeas dos modelos de deleção do receptor de GH (GHR) estudados (GHR/Nestin e GHR/LepR). Comprimentos corporal (A) e do fêmur (B), peso corporal (C), consumo de ração (D), e parâmetros obtidos nos testes de tolerância à insulina (E-G) e teste de tolerância à glicose (F-H).

Pode-se observar que o consumo alimentar durante a gestação apresenta um comportamento semelhante entre os grupos (Figura 25A). Contudo, nos dias 2, 6 e 9 as fêmeas deficientes do receptor de GH em neurônios consumiram mais ração que as fêmeas controle. A curva do consumo de ração pelas fêmeas neste período revela que há inicialmente uma pequena redução do consumo (até a primeira metade), seguida de aumento progressivo da ingestão alimentar. O período de lactação é o que se observa maior diferença do padrão de consumo de ração entre os grupos avaliados. A curva de acompanhamento mostra que as fêmeas do grupo nocaute (GHR/Nestin) tendem a ingerir mais ração ao longo da lactação, entretanto só pode ser observada diferença significativa logo nos primeiros dias de lactação (L1, L2 e L3) e em dois dias específicos do período final da lactação (L15 e L19) (Figura 18A). O consumo acumulado de ração não difere entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados.

Como observado na figura 24 (A-C) fêmeas nocaute são inicialmente mais pesadas e mais compridas, um fenótipo observado da própria mutação. Possivelmente, a deleção neuronal do receptor de GH pode influenciar no *feedback* negativo da produção deste hormônio. Por este motivo, para compreender o comportamento do peso corporal das fêmeas durante a gestação relativizamos este dado para o ganho de peso (Figura 25B). E, de forma interessante, nota-se que as fêmeas nocaute apresentam ganho de peso maior que as fêmeas controle nos últimos dias de gestação e no primeiro dia de lactação, entretanto, apesar de terem maior consumo alimentar em alguns dias do período lactação (Figura 18A), o ganho de peso é o mesmo entre os grupos neste período (Figura 18B).

Figura 25. Fêmeas com deleção neuronal do receptor de GH (GHR/Nestin) apresentam maior consumo de ração em dias específicos do período gestacional e de lactação e maior ganho de peso no período final da gestação. **A.** curva de acompanhamento longitudinal do consumo de ração ao longo da gestação (19 dias) e de lactação (21 dias) de fêmeas nocaute neuronal para o receptor de GH. **B.** ganho de peso relativo ao período basal (média de uma semana antes da gestação) ao longo da gestação e lactação de fêmeas GHR/Nestin e seus controles.

* Diferença significativa quando $p < 0,05$. Médias comparadas por test t de student. GHR/nestin (n=15), Controles (n=15).

Para verificar se a variação do ganho de peso e de consumo alimentar influenciou na adiposidade destas fêmeas, foi mensurado o peso do tecido adiposo

de quatro diferentes compartimentos (subcutâneo da região abdominal, periuterino, periovariano e retroperitoneal) em três momentos diferentes: no período basal (antes de a fêmea passar pela gestação), no período final da gestação (18-19 dias de gestação) e após a lactação (21 dias).

Não foi observado diferença no peso dos depósitos adiposos antes da gestação (Figura 26A). Curiosamente durante a gestação as fêmeas nocaute (GHR/Nestin) apresentam menor adiposidade relativa e todos os compartimentos adiposos avaliados são menos pesados (Figura 26B). Durante a lactação a adiposidade das fêmeas difere apenas no compartimento de tecido adiposo subcutâneo (Figura 26C).

Figura 26. Fêmeas com deleção neuronal do receptor de GH apresentam menor adiposidade corporal no período gestacional e maior depósito da região subcutânea durante a lactação. **A.** peso do tecido adiposo coletado de fêmeas adultas (GHR/Nestin) e controles sem passarem pela gestação, quatro depósitos avaliados: subcutâneo, periuterino, periovariano e retroperitoneal. **B.** mesma avaliação em fêmeas ao final do período gestacional (19 dias). **C.** adiposidade de fêmeas GHR/Nestin e seus controles após 21 dias de lactação.

*Diferença significativa ($p < 0,05$). Teste t de student para comparação de médias. GHR/nestin (n=15), Controles (n=15).

Durante a gestação a fêmea apresenta um quadro de resistência à insulina (SONAGRA et al., 2014). Para investigar o papel do GH na modulação central da sensibilidade a este hormônio durante o período gestacional; outro grupo de fêmeas grávidas (GHR/Nestin) foi submetido aos testes de GTT e ITT no período final da gestação para avaliar a homeostase glicêmica das fêmeas. No GTT, realizado entre os dias 15-16 de gestação (Figura 27A), não houve diferença significativa nas glicemias das fêmeas dos grupos nocaute e controle nos tempos avaliados, nem na área sob a curva (Figura 27B).

Para compreender melhor a influência da ação central do GH na homeostase glicêmica durante a gestação, foi feito também o teste de tolerância à insulina. Este teste revelou que as fêmeas nocaute têm melhor sensibilidade à insulina, uma vez

que após 20 min da injeção subcutânea de insulina as glicemias das fêmeas do grupo GHR/Nestin tem uma redução acentuada de glicemia, tendendo a ser menor em todos os outros momentos avaliados (40, 60, 90 e 120). Calculando a área sob a curva do comportamento de decaimento da glicose, pode-se observar que as fêmeas nocaute apresentam menores valores deste parâmetro. Estes resultados indicam que o GH exerce uma influência na homeostase glicêmica a nível central durante a gestação.

Figura 27. Fêmeas com deleção central do receptor de GH (GHR/Nestin) são mais sensíveis à insulina exógena. **A.** curva glicêmica de fêmeas grávidas nocaute (GHR/Nestin) e seus controles no teste de tolerância à glicose, aferição da glicemia basal (tempo zero) seguida da injeção de solução de glicose 40% via subcutânea (2g/kg), aferições de glicemia nos tempos 20, 40, 60, 90 e 120 min após a injeção. **B.** área sob a curva glicêmica no teste de tolerância à glicose. **C.** curva glicêmica de fêmeas grávidas (GHR/Nestin e controles) no teste de tolerância à insulina (1 UI/g, v. sc.), glicemia basal e aferição da glicemia nos mesmos momentos do GTT. **D.** área sob a curva glicêmica no teste de tolerância à insulina. Diferença significativa quando $p < 0,05$ em teste de comparação de médias (test t de student). As comparações das glicemias nos testes (ITT e GTT) foram realizadas em todos os pontos do teste individualmente.

Uma vez que as grávidas nocautes de forma inesperada apresentaram maior sensibilidade à insulina, outro grupo de fêmeas grávidas foram submetidas à um teste para avaliar a capacidade secretória de insulina. A insulinemia das fêmeas grávidas do grupo com deleção neural do receptor de GH foi menor após cinco e vinte minutos da injeção de glicose (Figura 28A), a área sob a curva confirma a observação.

Figura 28. Fêmeas com deleção central do receptor de GH (GHR/Nestin) secretam menos insulina após injeção de solução de glicose. **A.** curva insulinêmica de fêmeas grávidas nocaute (GHR/Nestin) e seus controles no teste de avaliação da capacidade de secreção insulina, nos tempos zero (basal), cinco e vinte minutos após a injeção. **B.** área sob a curva da insulinemia nos tempos avaliados. Diferença significativa quando $p < 0,05$ em teste de comparação de médias (test t de student). As comparações das insulinemias foram realizadas nos pontos do teste individualmente.

Ainda foram dosadas as concentrações séricas de hormônios no final da gestação (dias 18-19) das fêmeas dos grupos estudados. Há uma redução marcante na concentração sérica de insulina (Figura 29A) e leptina (Figura 29B) das grávidas nocaute, enquanto IGF-1, cuja produção é induzida pelo GH, sendo o mediador primário dos efeitos deste, está aumentado nas fêmeas nocaute (Figura 29C).

Alteração nas concentrações séricas destes hormônios confirmam a hipótese de o GH ter efeito modulatório central no controle neuroendócrino da gestação. A concentração de insulina circulante menor nas fêmeas grávidas nocaute confirma a maior sensibilidade à insulina nesse grupo (Figura 27A e 27C)

Pode-se inferir, baseado na caracterização fenotípica das fêmeas com deleção central do receptor de GH (figura 24A e B) e na observação de maior concentração sérica de IGF-1 (Figura 29) durante a gestação, que as fêmeas nocaute apresentam maior concentração de GH circulante (possivelmente por um menor feedback negativo mediado pelo sistema nervoso central).

Figura 29. Fêmeas grávidas com deleção central do receptor de GH apresentam concentração de insulina e leptina séricas reduzidas e aumentadas de IGF-1. Concentração sérica dos hormônios insulina (A), leptina (B) e IGF-1 (C) de camundongos fêmeas grávidas (18-19 dias) nocautes (GHR/Nestin) e controles.

a. Dosagens realizadas por meio de kits comerciais de ELISA.

Diferença significativa quando $p < 0,05$ em teste de comparação de médias (test t não-pareado).

GHR/Nestin (n=6), Controles (n=6)

Normalmente, durante a gestação as fêmeas estão com a concentração sérica de leptina aumentada e é um período caracterizado por resistência à este hormônio, entretanto, observamos que nas fêmeas com deleção neural do receptor de GH a concentração leptina está muito baixa, o que nos levou a investigar a responsividade hipotalâmica deste hormônio durante à gestação. Na figura 30 pode-se observar que a responsividade à leptina das fêmeas nocaute é semelhante à das fêmeas controle, mesmo com a concentração sérica do hormônio mais baixa.

Figura 30. Fêmeas grávidas com deleção central do receptor de GH são responsivas à leptina de maneira semelhante às fêmeas controles.

Controle (n= 8), GHR/Nestin (n= 8)

MPA: área pre-ótica medial, LHA: área hipotalâmica lateral, ARH: núcleo arqueado, DMH: núcleo dorso-medial do hipotálamo, VMH: núcleo ventro-medial do hipotálamo, PMV: pré-mamilar ventral do hipotálamo

A figura 31 refere-se à avaliação da expressão gênica hipotalâmica das fêmeas grávidas com deleção neural do receptor de GH e seus controles. O único gene com expressão alterada foi o NPY, gene que codifica para proteína homóloga que desempenha muitas funções no hipotálamo, principalmente estímulo do consumo alimentar e estoque energético.

Figura 31. Expressão gênica hipotalâmica de camundongos fêmeas grávidas com deleção central do receptor de GH nos dias 18-19 de gestação. Controle (n= 8), GHR/Nestin (n= 8); * p< 0,05.

Avaliamos a característica da ninhada proveniente destas fêmeas. O número de filhotes por ninhada (Figura 32A) não é diferente entre as mães nocaute e controle, entretanto o peso dos filhotes no dia do nascimento (Figura 32B) é maior quando são provenientes de mães GHR/Nestin. Após normalizar o tamanho da ninhada para cinco filhotes essa diferença não é mais observada em nenhum momento do acompanhamento (L1, L7, L14 e L21).

Figura 32. A ninhada de mães com deleção neuronal do receptor de GH apresenta maior peso corporal absoluto. **A.** número de filhotes nascidos das fêmeas controles (c57bl6) e daquelas com deleção neural do receptor de GH (GHR/Nestin). **B.** Peso da ninhada completa no dia do nascimento. **C.** Peso da ninhada após padronização do número de filhotes para cinco por mãe no dia do nascimento (L1) e evolução do peso ao longo do período de lactação (L7, L14 e L21).

Diferença significativa quando $p < 0,05$ em teste de comparação de médias (test t não-pareado).

O receptor de GH no encéfalo está distribuído em regiões que apresentam abundante quantidade de neurônios responsivos à leptina (FURIGO et al., 2016), sabe-se que este hormônio desempenha um papel importante no controle do metabolismo e da ingestão alimentar e que durante a gestação a fêmea passa por um quadro de resistência à leptina (Augustine e Grattan, 2008). Para avaliar se o papel do GH no controle do metabolismo durante o período gestacional está relacionado especificamente com a leptina, as avaliações conduzidas no modelo anterior (GHR/Nestin) foram feitas em fêmeas grávidas com deleção do receptor de GH em células que co-expressam o receptor de leptina (GHR/LepR). As figuras 33-41 apresentam os resultados dos experimentos neste modelo.

No acompanhamento longitudinal do balanço energético nos períodos: basal, gestacional e de lactação das fêmeas GHR/LepR e seus controles foi possível identificar um fato interessante: as fêmeas nocaute têm uma tendência a um maior consumo alimentar durante a gestação e lactação, sendo que há diferença significativa no consumo de ração em dias específicos da gestação (G4, G5, G6, G10, G13, G15 e G16) e nos quatro primeiros dias de lactação, apesar disto, o peso corporal destas fêmeas não difere dos seus controles (Figura 33).

Figura 33. Fêmeas com deleção do receptor de GH em células que co-expressam o receptor de leptina (GHR/LepR) apresentam maior consumo de ração em dias específicos do período gestacional e nos primeiros dias de lactação, mas não diferem dos seus controles em relação ao ganho de peso ao longo do acompanhamento. **A.** curva de acompanhamento longitudinal do consumo de ração ao longo da gestação (19 dias) e de lactação (21 dias) de fêmeas GHR/LepR e controles. **B.** peso corporal absoluto durante a gestação e lactação de fêmeas nocaute (GHR/LepR) e controles.

* Diferença significativa quando $p < 0,05$. Médias comparadas por test t de student.

GHR/LepR (n=15), Controles (n=15).

A adiposidade corporal das fêmeas GHR/LepR e controles foi avaliada no período basal (fêmeas adultas nocautes e controles que nunca passaram por gestação), ao final da gestação (18-19 dias) e no 21º dia de lactação. Com exceção do tecido adiposo periuterino, os depósitos adiposos das fêmeas GHR/LepR são menores que os de fêmeas controle no período basal (Figura 34A), já na gestação, todos os depósitos de gordura das fêmeas nocaute são menores que os das fêmeas controle (figura 33B). Na lactação observou-se maior adiposidade no depósito periovariano e menor no subcutâneo abdominal (Figura 34C).

Figura 34. Fêmeas com deleção do receptor de GH em células que expressam receptor de leptina apresentam menor adiposidade corporal no período basal e gestacional e maior depósito na região periovariana durante a lactação. **A.** peso do tecido adiposo coletado de fêmeas adultas (GHR/LepR) e controles que não passaram pela gestação, quatro depósitos avaliados: subcutâneo, periuterino, periovariano e retroperitoneal. **B.** mesma avaliação em fêmeas ao final do período gestacional (19 dias). **C.** adiposidade de fêmeas GHR/LepR e seus controles após 21 dias de lactação. *Diferença significativa ($p < 0,05$). Teste t de student para comparação de médias. GHR/LepR (n=15), Controles (n=15).

De forma semelhante ao que foi observado em fêmeas com deleção neural do receptor de GH; nos testes para avaliar a homeostase glicêmica das fêmeas grávidas cuja deleção do receptor de GH acontece especificamente em células que co-expressam o receptor de leptina (GHR/LepR); nota-se que as fêmeas nocaute apresentam, durante a gestação, tendência à intolerância à glicose. Após 40 e 60 minutos da injeção de solução de glicose, a glicemia das fêmeas nocaute é significativamente maior que a das controles (Figura 35A). Apesar disso, as grávidas nocautes são mais sensíveis à insulina exógena, após 20 minutos da injeção de insulina a glicemia destes animais diminui de forma mais pronunciada que a das controles (Figura 35C), a glicemia dos animais nocaute se mantém menor que a dos controles até 120 min depois da injeção de insulina. Confirmando o dado de maior sensibilidade à insulina, a área sob a curva do ITT calculada das as fêmeas GHR/LepR é menor (Figura 35D).

Figura 35. Fêmeas com deleção do receptor de GH em células que co-expressam o receptor de leptina (GHR/LepR) são mais sensíveis à insulina exógena. **A.** curva glicêmica de fêmeas grávidas nocaute (GHR/LepR) e seus controles no teste de tolerância à glicose, aferição da glicemia basal (tempo zero) seguida da injeção de solução de glicose 40% via subcutânea (2g/kg), aferições de glicemia nos tempos 20, 40, 60, 90 e 120 min após a injeção. **B.** área sob a curva glicêmica no teste de tolerância à glicose. **C.** curva glicêmica de fêmeas grávidas (GHR/LepR e controles) no teste de tolerância à insulina (1 UI/g, v. sc.), glicemia basal e aferição da glicemia nos mesmos momentos do GTT. **D.** área sob a curva glicêmica no teste de tolerância à insulina.

Diferença significativa quando $p < 0,05$ em teste de comparação de médias (test t de student). As comparações das glicemias nos testes (ITT e GTT) foram realizadas em todos os pontos do teste individualmente.

De forma mais evidente que no modelo anterior, as fêmeas nocaute do receptor de GH nas células que co-expressam receptor de leptina, são mais sensíveis à insulina e tendem a ser intolerantes à glicose. Para avaliar se esta alteração na homeostase glicêmica é decorrente de menor secreção endógena de insulina, foi avaliada a insulinemia após injeção de solução de glicose. Foi observada menor concentração sérica de insulina após 20 minutos da injeção (Figura 36).

Figura 36. Fêmeas com deleção do receptor de GH nas células com receptor de leptina (GHR/LepR) tendem a secretar menos insulina após injeção de solução de glicose. **A.** curva insulinêmica de fêmeas grávidas nocaute (GHR/Nestin) e seus controles no teste de avaliação da capacidade de secreção insulina, nos tempos zero (basal), cinco e vinte minutos após a injeção. **B.** área sob a curva da insulinemia nos tempos avaliados. Diferença significativa quando $p < 0,05$ em teste de comparação de médias (test t de student).

Também foi dosada a concentração sérica de insulina, leptina e IGF-1 destas fêmeas no período final da gestação. A fêmea GHR/LepR também apresenta menores concentrações circulantes de insulina (Figura 37A) e leptina (Figura 37B), entretanto não foi observada diferença na concentração de IGF-1 (Figura 37C).

Figura 37. Fêmeas grávidas com deleção do receptor de GH em células que co-expressam o receptor de leptina apresentam menores concentrações séricas de insulina e leptina. Concentração sérica dos hormônios insulina (A), leptina (B) e IGF-1 (C) de camundongos fêmeas grávidas (18-19 dias) nocautes (GHR/LepR) e controles.

a. Dosagens realizadas por meio de kits comerciais de ELISA.

Diferença significativa quando $p < 0,05$ em teste de comparação de médias (test t não-pareado).

GHR/LepR (n=6), Controles (n=6).

Assim como as fêmeas grávidas com deleção central do receptor de GH, a concentração sérica de leptina é menor que a das fêmeas controle. Neste modelo também avaliamos a responsividade central à leptina; porém diferente do observado nas fêmeas GHR/Nestin, em praticamente todas as áreas cerebrais avaliadas, as

fêmeas GHR/LepR tiveram maior número de células responsivas à leptina após injeção subcutânea deste hormônio (Figura 38).

Figura 38. Fêmeas grávidas com deleção do receptor de GH nas células com receptor de leptina são mais responsivas à leptina no núcleo ventromedial do hipotálamo.

Controle (n=8), GHR/LepR (n=8); *, $p < 0,05$

MPA: área pre-ótica medial, LHA: área hipotalâmica lateral, ARH: núcleo arqueado, DMH: núcleo dorso-medial do hipotálamo, VMH: núcleo ventro-medial do hipotálamo, PMV: pré-mamilar ventral do hipotálamo

Na figura 40 são apresentadas fotomicrografias representativas de cortes coronais com células marcadas com pSTAT3 após três tratamento com leptina de grávidas com 18-19 dias de gestação. Pode-se notar aumento significativo no número de células responsivas à leptina no VMH das fêmeas GHR/LepR, as fotomicrografias são relativas aos dados das figuras 29 e 38.

Figura 39. Fotografias representativas grávidas com deleção do receptor de GH nas células com receptor de leptina são mais responsivas à leptina.

Controle (A, D, G e J - n= 8), GHR/Nestin (B, E, H e K - n= 8), GHR/LerR (C, F, I e L - n= 8)

MPA: área pre-ótica medial, LHA: área hipotalâmica lateral, ARH: núcleo arqueado, DMH: núcleo dorso-medial do hipotálamo, VMH: núcleo ventro-medial do hipotálamo, PMV: pré-mamilar ventral do hipotálamo, och: quiasma óptico, ovlt: órgão vascular da lâmina terminal, 3V: terceiro ventrículo. Escala: 200μm

A figura 40 refere-se à avaliação da expressão gênica hipotalâmica das fêmeas grávidas com deleção do receptor de GH em células que co-expressam receptor de leptina e seus controles. Os genes AgRP, SOCS1 e SOCS3 estão hiper-expressos no hipotálamo de grávidas nocautes.

Figura 40. Expressão gênica hipotalâmica de camundongos fêmeas grávidas com deleção do receptor de GH nas células que expressam LepR no dia 18-19 de gestação. Controle (n= 8), GHR/LepR (n = 8); * p<0,05

Por fim, a característica da ninhada também foi avaliada neste grupo e foi possível observar que o número de filhotes nascidos de mães controle e nocaute (GHR/LepR) é semelhante (Figura 41A), assim como o peso da ninhada completa ao nascer (Figura 41B). Curiosamente, após a padronização do número de filhotes por ninhada para 5 filhotes, nota-se que o peso da ninhada das fêmeas nocaute é menor que o das fêmeas controles nos dias 14 e 21 de lactação, indicando prejuízo na evolução ponderal destes animais.

Figura 41. A ninhada de mães com deleção do receptor de GH em células que co-expressam o receptor de leptina apresenta prejuízo de evolução ponderal nos dias 14 e 21 de lactação. **A.** número de filhotes nascidos das fêmeas controles (c57bl6) e nocautes (GHR/LepR). **B.** Peso da ninhada completa no dia do nascimento. **C.** Peso da ninhada após padronização do número de filhotes para cinco por mãe no dia do nascimento (L1) e evolução do peso ao longo do período de lactação (L7, L14 e L21). Diferença significativa quando p<0,05 em teste de comparação de médias (test t não-pareado).

6 DISCUSSÃO

6.1 SUBPROJETO 1

A deposição excessiva de tecido adiposo incorre no desenvolvimento do sobrepeso e obesidade, cujas consequências na saúde do indivíduo são observadas principalmente a longo-prazo. Entre as consequências da obesidade estão incluídos diabetes, doenças cardiovasculares, osteoartrites e maior risco para alguns tipos de câncer. Além de ser dos mais sérios problemas de saúde pública devido à alta e crescente prevalência e aos efeitos na saúde, é uma doença que demanda alto custo. O acúmulo excessivo de gordura decorre de grande número de fatores, desde características genéticas (mutações e polimorfismos gênicos) até fatores ambientais que parecem envolver as principais causas de obesidade e seus distúrbios metabólicos (HRUBY e HU, 2015; ARABIN e STUPIN, 2014; McCARTHY, 2010).

Entre os fatores ambientais destaca-se a dieta inadequada, com desajuste de macronutrientes (alto consumo de carboidrato simples e gorduras saturadas), sedentarismo, alterações na microbiota, até poluição (BÄCKHED et al., 2004; TURNBAUGH et al., 2006). Estes fatores ambientais estão relacionados com modificações epigenéticas (como exemplo, metilação e acetilação de genes e histonas) que explicam parte dos mecanismos moleculares da influência do ambiente no desenvolvimento das doenças crônicas e maior predisposição para acúmulo de gordura (Lillycrop et al., 2011).

A experiência reprodutiva vem sendo associada com maior retenção de peso pós-parto, mesmo muitos anos após o nascimento da criança e é considerada um importante fator de risco de sobrepeso e obesidade na população feminina (NEHRING et al., 2011), inclusive para roedores. Zampieri e colaboradores (2015) observaram maior peso corporal pelo menos até o 21º dia pós-lactação, de forma semelhante Ladyman e colaboradores (2018) observaram maior peso corporal ainda com 9 semanas pós-lactação. Embora haja evidências de que a experiência reprodutiva esteja associada a menor risco de câncer de mama, bem como de endometriose e de diabetes mellitus (JORDAN et al., 2017; RIMAN et al., 1998), é imperativo avaliar

alterações metabólicas e possíveis riscos como aqueles relacionados à obesidade e ao diabetes.

No subprojeto 1 da presente tese pretendíamos investigar as adaptações metabólicas a longo prazo que ocorrem no organismo materno. Outros parâmetros, além do peso corporal, têm sido pouco estudados. Como gasto energético, homeostase glicêmica e alterações no SNC pós-gestação. E mais especificamente, vias celulares que podem ser responsáveis pelas adaptações no organismo materno também são pouco descritas.

Para testar nossa hipótese de que a experiência reprodutiva promove alterações permanentes no organismo materno, sejam elas positivas ou não, e que elas são mediadas pela ativação da STAT5 neuronal; foram avaliados parâmetros neuroendócrinos no modelo de camundongos sem nenhum tipo de deleção gênica. Os mesmos experimentos foram conduzidos num modelo de animais com deleção neural dos genes STAT5a e STAT5b, responsáveis por codificar as proteínas homólogas, cuja função é a transdução do sinal da via JAK/STAT5. Esta é a principal via ativada pelos hormônios que são amplamente secretados durante a gestação e lactação, particularmente prolactina e GH.

Desta forma, o modelo de animais geneticamente modificado que chamamos de Nestin/STAT5 já validado e utilizado em outros trabalhos do nosso laboratório, nos serviu para investigar a importância da ativação desta via para as adaptações promovidas pela gestação e/ou lactação no longo prazo. Em ambos os modelos os grupos estudados foram: Virgens (grupo controle), Gestação (fêmeas que pariram seus filhotes, mas não lactaram) e G+L (fêmeas que passaram pela experiência reprodutiva completa).

Para o grupo controle optamos por fêmeas virgens, em vez de fêmeas expostas à cruzamento com machos vasectomizados. Pois já foi descrito que mesmo sem a possibilidade de gestarem, só o fato de camundongos fêmeas terem a mucosa vaginal estimulada, um estado de pseudo-gestação pode ser induzido. O que já acarreta algumas alterações hormonais como aumento da prolactina sérica, que não corresponde ao estado fisiológico basal de fêmeas que nunca passaram pela experiência reprodutiva (YANG et al., 2008). Por este motivo optou-se por um grupo controle de fêmeas virgens.

No grupo gestação, há uma limitação que é o stress para a mãe decorrente da separação dos filhotes, numa tentativa de minimizar este problema tomou-se o cuidado de reagrupar as fêmeas em caixas para que elas não ficassem isoladas, além de ter sido checadas diariamente a fim de identificar o nascimento nas primeiras horas, evitando uma separação tardia gerando um stress ainda maior para a fêmea. Numa tentativa de compreender se o fato de não amamentar, seja por escolha ou por impossibilidade, repercutiria negativamente na fisiologia materna, optamos pela existência deste grupo. Foi possível avaliar a importância da lactação nas adaptações no longo prazo, uma vez que maior parte dos benefícios associados à experiência reprodutiva, descritos na literatura é atribuído à lactação (JORDAN et al., 2017; RIMAN et al., 1998).

Por este efeito protetor atribuído à lactação, o primeiro resultado que observamos e descrevemos nesta tese foi inesperado. Acreditávamos que as fêmeas que lactaram (G+L) teriam o peso corporal no longo prazo semelhante ao do grupo Virgem e as do grupo Gest teriam maior peso corporal. Entretanto observamos o contrário, as fêmeas que lactaram tiveram retenção do peso corporal no longo prazo e após a 14ª semana pós-gestacional as fêmeas que só gestaram voltaram a ter o peso corporal semelhante ao das virgens.

Maior peso corporal é decorrente também de balanço energético positivo (HILL et al., 2013), para investigar o fator que promoveu esta retenção de peso nas fêmeas G+L foram medidos o consumo alimentar e o gasto energético dos três grupos experimentais. Nenhuma destas variáveis tiveram diferenças entre os grupos; consumo de ração, VO_2 e coeficiente respiratório foram semelhantes. A única observação que justificou maior peso corporal das fêmeas do grupo G+L foi menor deambulação no período escuro (de maior atividade para o roedor) que corresponde à atividade física voluntária. Apesar de não interferir de forma significativa no gasto energético (tiveram tendência a menor gasto energético [VO_2]), propõe-se que cronicamente esta alteração foi suficiente para que estas fêmeas do grupo G+L tivessem maior peso corporal. Vale destacar que alterações muito sutis na atividade física poderiam não interferir diretamente no consumo de O_2 , mas cronicamente poderia interferir no peso corporal.

Apesar de grande variação nos dados de peso do compartimento adiposo periuterino, há diferença significativa entre o grupo G+L em relação aos outros. O maior peso corporal no longo prazo das fêmeas deste grupo experimental parece estar relacionado com maior adiposidade, principalmente nesta região. Vale destacar que este método de avaliação de composição corporal não é padrão-ouro e para minimizar os erros atribuídos ao método, o tecido foi sempre coletado pelo mesmo avaliador e seguindo referências anatômicas padronizadas pelo nosso grupo.

O que interpretamos destes dados é que a retenção de peso corporal ao longo da vida das fêmeas que passaram pela experiência reprodutiva completa, parece estar relacionada ao acúmulo de gordura, especificamente no depósito periuterino e decorrer de menor atividade física voluntária. Ladyman e colaboradores (2018) observaram resultados semelhantes em fêmeas que passaram pela experiência reprodutiva após 8 semanas estas ainda apresentavam maior peso corporal, sem apresentarem maior ingestão de ração nem maior gasto calórico, embora estas fêmeas terem deambulado menos tanto no ciclo escuro quanto claro, mas sem diferenças na atividade física voluntária na roda de correr. Estes resultados reforçam os nossos no sentido de que a menor deambulação das fêmeas que passaram pela experiência reprodutiva parece ter uma importante correlação com maior peso corporal no longo prazo.

Dentre as adaptações metabólicas durante a gestação, destaca-se a resistência à insulina que garante maior disponibilidade de glicose para o embrião/feto (NORMAN et al., 2011). Uma vez que esta alteração é tão marcante do período gestacional, investigamos a homeostase glicêmica das fêmeas no longo prazo após passarem pela experiência reprodutiva. Tanto na tolerância à glicose quando no teste de sensibilidade à insulina não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais. O que nos parece plausível concluir que a experiência reprodutiva não prejudica a homeostase glicêmica em períodos tardios do pós-gestacional.

Outra característica marcante do período gestacional é a resistência à leptina (AUGUSTINE et al., 2008) que reflete no aumento da ingestão alimentar e assim como a resistência à insulina, garante melhores condições para o desenvolvimento da prole. No entanto, fora do período gestacional essa condição que é bem característica na obesidade, prejudica a regulação do balanço energético, induzindo maior ingestão de

alimentos. A instalação do balanço energético positivo incorre no acúmulo excessivo de tecido adiposo, consequentemente desequilíbrio metabólico e prejuízos para o organismo. Buscamos investigar a sensibilidade à leptina no longo prazo pós gestação de forma a responder se há permanência do estado de resistência observada durante a gestação. Pelo teste de resposta aguda à leptina não houve diferença no consumo de ração 24h após a injeção do hormônio, embora após 14h da injeção houve maior perda de peso no grupo que passou pela lactação. Baseado nestes resultados não podemos afirmar que há perpetuação do estado de resistência à leptina, parece que a condição contrária é mais plausível. O fato de a fêmea ter lactado fez com que ela respondesse melhor à leptina exógena, apesar de não podermos afirmar que melhora a sensibilidade ao hormônio apenas por este dado. Ladyman et al (2018) ao avaliar pSTAT3 em núcleos hipotalâmicos de fêmeas que passaram pela experiência reprodutiva no longo prazo, não observaram diferença de ativação de neurônios entre o grupo controle e as fêmeas que gestaram e lactaram.

Uma vez que a gravidez é período característico de alterações hormonais marcantes, como aumento de estrógeno, insulina, leptina, prolactina e GH placentário (AUGUSTINE et al., 2008); dosamos as concentrações séricas de hormônios classicamente conhecidos por seu papel regulação do metabolismo energético e da glicose, nota-se que a experiência reprodutiva não altera permanentemente as concentrações séricas de insulina, leptina e estrógeno.

Embora não tenha sido observado alterações nas concentrações séricas de estrógeno no longo prazo pós-gestação, investigamos a distribuição de receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) nos núcleos arqueado, ventromedial do hipotálamo e amígdala e nestas três regiões estudadas nota-se clara redução do número de células com o receptor $ER\alpha$. Estes resultados conjuntamente sugerem alteração na responsividade ao estrógeno promovido pela lactação. As fêmeas que lactaram tiveram alteração neuroanatômica da distribuição do $ER\alpha$, um número reduzido de células com este receptor quando comparadas às fêmeas controle. Byrnes e colaboradores (2011) fizeram observação semelhante na amígdala, enquanto no MPOA houve aumento da distribuição de células marcadas com anti- $ER\alpha$. De forma contrária ao que descrevemos, Ladyman e colaboradores (2018) não observaram redução do número de células com $ER\alpha$ no núcleo arqueado de fêmeas que passaram por experiência reprodutiva. Entretanto neste trabalho estes pesquisadores descrevem o núcleo

arqueado enquanto observamos o mesmo padrão de redução também no VMH e MEA.

Ao avaliarmos a expressão gênica do receptor de estrógeno no hipotálamo inteiro não foi observada redução, embora haja uma tendência ($p= 0,13$) de menor expressão. Além de avaliar a expressão gênica do ER α , também foi mensurado a quantidade de RNAm de outros genes e nota-se que apenas o gene que codifica para a histona deacetilase 8 (HDAC8) está hiper expressa no grupo que passou pela gestação seguida de lactação.

Este resultado nos aponta para a confirmação da hipótese de que a gestação seguida de lactação promove adaptações permanentes no organismo da fêmea, possivelmente via alterações epigenéticas. Uma vez que fizemos esta observação, optamos por avaliar o número de histonas acetiladas em alguns núcleos hipotalâmicos. Baseado em Funato e colaboradores (2011) que descreveu aumento da expressão de HDAC8 no PVH numa condição de jejum, avaliamos este núcleo, assim como o ARC e VMHdm e VMHvl. Nossos resultados de redução de histona 3 (H3) acetilada vai ao encontro do resultado do aumento da expressão de HDAC8, apenas no grupo que passou por lactação (G+L) nota-se redução de histona 3 acetilada nos núcleos hipotalâmicos avaliados, excetuando-se o VMHvl.

É importante mencionar que a acetilação de histona é condição que altera a cromatina para sua configuração “aberta” o que facilita a transcrição gênica (SALES et al., 2017) e particularmente a acetilação da H3 regula grande número de processos celulares, incluindo transcrição, estrutura da cromatina, replicação e reparo do DNA e proliferação celular. Estes processos são muito bem estudados no câncer. Assim, é possível aventar a hipótese que nesta condição de hipoacetilação que torna a cromatina numa estrutura mais condensada, dificultando a expressão gênica seja fator protetor no desenvolvimento de patologias como o câncer. Muito embora não tenha sido avaliados quais tipos de neurônios, tão pouco quais regiões do cromossomo estão hipoacetiladas, este resultado já aponta para futuras investigações. Torna-se plausível concluir que as adaptações no longo prazo promovidas pela experiência reprodutiva são dependentes da lactação e parecem ser a nível epigenético. Foi revisado por Lillycrop e Burdge (2011) a relação entre alterações epigenéticas e alterações no metabolismo e maior risco de obesidade, também já foi descrito o papel

da via STAT5 para a remodelação da cromatina via estas alterações (WAGATSUMA et al., 2015; WINGELHOFER et al., 2018).

Todas estas avaliações foram conduzidas também em fêmeas com deleção tecido específica dos genes *Stat5a* e *Stat5b*. A deleção foi confirmada pela quantificação do RNAm destes genes no hipotálamo, nota-se redução quase total da expressão destes genes no grupo Nestin/STAT5. Este modelo de deleção tecido específica nos permite avaliar a importância da via JAK/STAT em neurônios o uso da tecnologia cre-LoxP, especialmente neste modelo torna-se superior aos modelos de nocaute global uma vez que deleção global dos genes STAT5a e b é inviável para a sobrevivência do animal.

A primeira diferença observada entre os resultados das fêmeas sem deleção e das nocautes já é na curva de acompanhamento do peso corporal pós-lactação. As fêmeas com deleção neural de STAT5 dos grupos experimentais voltam a ter o peso semelhante ao das virgens nocautes após a 10ª semana pós-gestacional. Vale destacar que Lee e colaboradores (2008) observaram que fêmeas com deleção central de STAT5 apresentavam comportamento hiperfágico e obesidade. Confrontando estes dados optamos por comparar fêmeas sem deleção e fêmeas nocautes com seus respectivos grupos experimentais; uma vez que as fêmeas virgens (grupo controle) não apresentam o mesmo fenótipo entre si. Buonfiglio e colaboradores (2015) demonstraram que fêmeas com deleção neural de STAT5 não são hiperfágicas durante a lactação.

Dadas estas observações, sugerimos que a deleção neural de STAT5 parece ser um fator protetor durante o período pós-gestacional. Além disso, observar que o peso das fêmeas nocautes que passaram pela experiência reprodutiva é semelhante ao das virgens KO foi primeiro indicativo de que a ativação da via STAT5 é de fundamental importância para as adaptações metabólicas promovidas pela experiência reprodutiva.

Mesmo sem apresentarem peso corporal significativamente maior, as fêmeas do grupo Gest KO tiveram maior deposição de gordura no compartimento adiposo periuterino. Aqui cabe a mesma crítica ao método e de que a alteração foi vista em apenas um dos compartimentos, ao fazer o somatório dos pesos dos quatro compartimentos avaliados não existe diferença entre os grupos. O que sugere que a

adiposidade corporal é semelhante entre as fêmeas nocaute neural de STAT5 virgens e aquelas que passaram por gestação e/ou lactação. Lee et al (2008) observou que fêmeas com deleção neural de STAT5 apresentaram adiposidade muito maior em todos os depósitos adiposos avaliados, entretanto esta diferença foi observada em fêmeas com idade avançada caracterizando envelhecimento. As fêmeas deste estudo não apresentaram fenótipo característico de obesidade e adiposidade pronunciadamente aumentada como descrevem estes autores; assemelhando-se ao que descrevem Furigo e colaboradores (2018).

Diferente das fêmeas sem deleção neural, as nocautes tem a mesma taxa de deambulação, entretanto notou-se redução do gasto calórico medido pelo consumo de oxigênio (VO_2) pelas fêmeas do grupo Gest KO, tanto no período claro quanto no escuro. Não coincidentemente, é o mesmo grupo que apresenta maior depósito de gordura no compartimento periuterino.

Outra diferença interessante é que as fêmeas do grupo Gest KO tiveram melhor sensibilidade à insulina no longo prazo, esta diferença foi observada tanto nos valores de glicemia quanto na constante de decaimento da glicemia (KITT), no teste de tolerância à glicose nota-se menores valores de glicemia nos grupos experimentais após 60 minutos da injeção de glicose, mas sem diferenças no valor da área sob a curva (AUC). Já foi descrito que fêmeas com deleção neural de STAT5 apresentam intolerância à glicose e resistência à insulina (Lee et al. 2008), baseando-se nestas observações parece que a experiência reprodutiva é importante para manutenção da homeostase glicêmica quando não há sinalização neural de STAT5.

No teste de sensibilidade à leptina foi observada menor ingestão de ração pelo grupo G+L KO após 24h da injeção de leptina, enquanto que no grupo G+L (sem deleção) a modificação foi maior redução de peso (após 14h), este resultado associado à observação de maior expressão gênica hipotalâmica do receptor de leptina nas fêmeas deste mesmo grupo, indicam que a lactação é uma variável que possivelmente melhore a sensibilidade à leptina no longo prazo. Vale reforçar que melhor sensibilidade à leptina seja concordante com os dados de homeostase glicêmica (DENROCHE et al., 2012).

Assim como nas fêmeas sem deleção, aquelas dos grupos nocaute não apresentaram diferença nas concentrações séricas de insulina, leptina ou estradiol.

Estas observações sugerem que independente da modificação genética ou da experiência reprodutiva estes hormônios voltam às concentrações basais no período pós-gestacional. Uma observação importante nas fêmeas nocaute foi a distribuição do receptor de estrógeno que se mantém semelhante entre as fêmeas dos diferentes grupos experimentais, o que não aconteceu nas fêmeas sem deleção, indicando que a remodelação central da distribuição deste receptor no período pós-lactação tardio depende da ativação da via STAT5.

Ao avaliarmos a expressão gênica hipotalâmica observou-se que a experiência reprodutiva em fêmeas com deleção da via STAT5 promove redução do mRNA dos genes que codificam para os neuropeptídeos orexígenos AgRP e NPY. Buonfiglio e colaboradores (2015) fizeram observação semelhante em fêmeas lactantes também com deleção neural de STAT5, estes dados foram consistentes com a observação de que as fêmeas tiveram menor consumo de ração no período de lactação, que é caracterizado por comportamento hiperfágico.

Ainda a respeito da expressão gênica hipotalâmica observamos que em fêmeas com deleção de STAT5, a experiência reprodutiva altera o padrão de expressão de genes relacionados com a sinalização de prolactina. Nas fêmeas nocautes que só passaram pela gestação observou-se maior expressão de CISH, que codifica para a proteína da família de supressores da sinalização de citocinas que inibe a ação da prolactina. Além disso, no hipotálamo de fêmeas nocautes que passaram pela gestação seguida de lactação, há menor expressão gênica do receptor de prolactina. Tais observações apontam para o fato de que a via STAT5 regula a nível genômico a manutenção da sinalização da prolactina. Ainda foi observado que fêmeas nocautes que passaram pela experiência reprodutiva completa tiveram menor expressão dos receptores de GH e leptina.

Observamos que nas fêmeas sem deleção gênica a experiência reprodutiva promoveu hipoacetilação de histona 3 nas diferentes áreas avaliadas, contudo entre as fêmeas nocaute não foi observada nenhuma alteração neste parâmetro analisado. Baseando-se em todas estas observações concluímos que a experiência reprodutiva promove adaptações neuroanatômicas, epigenéticas e metabólicas no longo prazo e que a via STAT5 neural é fundamental para estas adaptações.

6.2 SUBPROJETO 2

Neste subprojeto pretendíamos avaliar o papel central do GH na regulação das adaptações metabólicas da gestação. Para tanto usamos dois modelos de deleção tecido e célula específica do receptor de GH, no grupo de animais GHR/Nestin a deleção é neuronal e nos animais do grupo GHR/LepR a deleção ocorre nas células que também expressam receptor de leptina. As nossas principais observações foram de que a ação central do GH é importante para a regulação da ingestão de alimentos, da adiposidade corporal, da homeostase glicêmica e da sensibilidade à leptina durante a gravidez.

É bem descrito que o período gestacional é acompanhado de alterações hormonais acentuadas, incluindo elevadas concentrações circulantes de estrógeno, leptina, prolactina/lactogênios placentários e GH. Embora o GH esteja aumentado durante a gestação, especialmente na segunda metade dela, ainda não está esclarecido como acontece essa regulação em roedores. Diferente do que acontece em humanos, grande parte dos mamíferos não produzem a forma placentária do GH que depende do gene *Gh2* (PAPPER et al., 2009). Nesse sentido, roedores possuem apenas um gene que codifica a forma hipofisária. As evidências na literatura apontam para que alguns desses hormônios gestacionais ou até a combinação deles atuam centralmente para promover mudanças nos circuitos neuronais envolvidos na regulação do balanço energético.

A escolha do modelo GHR/Nestin decorre do objetivo geral de compreender o papel central do GH, uma vez que a deleção do seu receptor ocorre em todos os tipos neuronais. Enquanto o GH/LepR foi usado para investigar especificamente uma possível interação entre os hormônios leptina e GH nas adaptações metabólicas da gestação. Furigo e colaboradores (2017) ao descreverem a distribuição de células responsivas ao GH no cérebro de camundongos, demonstram grande compatibilidade no padrão de distribuição destas células com aquelas responsivas à leptina. Vale destacar que as várias populações neuronais hipotalâmicas que expressam o LepR são também responsivas ao GH (CADY et al, 2017; FURIGO et al, 2019). Portanto, núcleos hipotalâmicos classicamente estudados e conhecidos por seu importante papel na regulação do metabolismo energético também apresenta alta distribuição de células responsivas ao GH, como o ARH, VMH, PVH, PMV (RAMOS-LOBO e DONATO, 2017; FURIGO et al., 2017).

Na validação do modelo podemos identificar deleção eficaz em ambos os grupos (Figuras 22 e 23). No GHR Nestin nota-se redução de mais de 80% da expressão gênica do receptor de GH e redução de mais de 95% na marcação de células responsivas ao GH nas regiões hipotalâmicas avaliadas após o tratamento com este hormônio. Quanto ao modelo GHR LepR nota-se que não há redução na expressão gênica hipotalâmica devido ao fato de haver grande número de populações neuronais que também expressam GHR, mas que não possuem receptor de leptina. Utilizando um modelo animal que permite a visualização das células que expressam LepR por meio da co-expressão da proteína tdTomato. Pode-se demonstrar que a deleção aconteceu nas células alvo.

Quanto à caracterização fenotípica das fêmeas de ambos os grupos, constatamos que aquelas do grupo GHR Nestin tem maior comprimento naso-anal, dado confirmado pela mensuração do fêmur, como também pelo aumento da concentração sérica de IGF1 neste grupo. É possível que este fato decorra de prejuízo do *feedback* negativo hipotalâmico da secreção de GH, uma vez que a deleção do seu receptor aconteceu em todos os neurônios. Já é descrito que machos com deleção neural do GHR tem maior expressão gênica hipotalâmica de Ghrh quando comparados aos controles (FURIGO et al., 2019). Além desta característica nota-se que no modelo GHR LepR KO tem consumo de ração basal maior e menor deposição de gordura corporal, o que seria um indicativo de maior gasto energético basal. Não foram observadas alterações na homeostase glicêmica em nenhum dos grupos.

Estas alterações observadas no período basal se mantiveram durante a gestação, portanto o maior peso corporal das fêmeas GHR Nestin, assim como maior ingestão alimentar e menor adiposidade das fêmeas GHR LepR não podem ser atribuídas especificamente ao momento fisiológico da gestação e lactação. No acompanhamento do ganho de peso e ingestão alimentar, as fêmeas GHR Nestin tiveram maior ganho de peso corporal nos últimos dias de gestação, enquanto as GHR LepR consumiram mais ração em vários pontos do período gestacional e de lactação, entretanto estas diferenças parecem ser características secundárias do fenótipo observado em ambos os modelos. Entretanto, vale destacar que foi identificada maior expressão gênica de AgRP no hipotálamo das fêmeas GHR LepR o que poderia explicar a maior ingestão de alimentos neste grupo, mesmo quando no basal também tenha sido feita esta observação.

Além destas características fenotípicas decorrentes da deleção do GHR nos modelos estudados, foi observado que a gestação incorreu em menor deposição de gordura em todos os depósitos adiposos das fêmeas deste grupo. Diante das evidências de que o GH é um dos reguladores centrais do metabolismo, tal dado demonstra que a ausência da sinalização central do GH durante a gestação modifica a regulação do metabolismo energético, a ingestão parece não ser suficiente para manter as reservas adiposas neste período. De forma condizente, esta alteração foi acompanhada de menor da concentração sérica de leptina neste grupo.

É descrito que quando administrado periféricamente, o GH promove aumento da ingestão alimentar, sugerindo seu papel orexígeno (BLISSETT et al., 2000 e SNEL et al., 1995). De forma semelhante Bohlooly e colaboradores (2005) demonstraram que quando há maior expressão de GH centralmente, assim como após injeção i.c.v. há resposta orexigênica. Portanto, embora tenha sido observado aumento da expressão gênica de NPY nas fêmeas GHR Nestin, a função central do GH na modulação do balanço energético é importante na manutenção da reserva adiposa na gestação.

Outra alteração importante feita em ambos os modelos foram as alterações na homeostase glicêmica. As fêmeas grávidas nocaute do receptor de GH (GHR Nestin e GHR LepR) tiveram intolerância à glicose, associado à maior sensibilidade à insulina. Já foi descrita a relação do GH e resistência insulínica, quando há hiper-expressão de GH central, observa-se redução da sensibilidade à insulina (BOHLOODY et al., 2005). A perda da resposta central e especificamente nas células com receptor de leptina parece ter prevenido a resistência à insulina típica da gestação.

Para compreender melhor a causa da intolerância à glicose, foi conduzido um teste para avaliar a capacidade secretória de insulina e constatou-se redução da secreção de insulina frente ao estímulo de glicose. Também se observou menores concentrações séricas de insulina em estado alimentar padronizado (4h de restrição alimentar). Vale destacar que mesmo frente a estas alterações a glicemia basal destas fêmeas está inalterado. Por este motivo, nossa hipótese é que um possível aumento na sensibilidade à insulina causada pela ablação do receptor de GH reduza a necessidade da hiperplasia das células beta pancreáticas que ocorre na gestação para compensar a resistência à insulina típica da gestação (NORMAN e REYNOLDS, 2011). Embora as causas da menor secreção de insulina nas fêmeas nocaute não

sejam conhecidas, é possível ainda que tenha ocorrido deleção do GHR no pâncreas. Uma vez que os genes *Lepr* e *Nestin* são expressos no tecido pancreático e nosso modelo de nocaute condicional usa o promotor de ambos para promover a deleção do GHR (KEDEES et al., 2007). No entanto estudos anteriores demonstraram que a expressão do gene *Nestin* não acontece na porção endócrina do pâncreas. Além disso, Cady e colaboradores (2017) mostraram que a ablação de GHR em células *LepR* não reduz a expressão gênica de *Ghr* no pâncreas.

Conforme descrevemos anteriormente, uma condição comumente observada na gestação é resistência à leptina (AUGUSTINE e GRATTAN, 2008). Ao avaliarmos a sensibilidade a este hormônio observamos que notavelmente, a ablação do GHR em células que expressam o *LepR* aumentou a responsividade da leptina no VMH, mas não em outras áreas hipotalâmicas. Sabe-se que o VMH apresenta grande número de neurônios responsivos à leptina e ao GH, sendo uma importante área para ação central destes hormônios (SCOTT et al., 2009; BROWN et al., 2010; FURIGO et al., 2017). Além disso, a resistência à leptina durante a gestação parece afetar mais significativamente este núcleo (LADYMAN e GRATTAN, 2005). Apesar de observarmos maior ativação de pSTAT3 no VMH das fêmeas grávidas GHR *LepR* não observamos o efeito fisiológico de redução da ingestão alimentar. Notou-se aumento da expressão gênica de *SOCS3* e *SOCS1*, que podem ter sido em decorrência da maior ativação de STAT3 o que pode indicar maior responsividade à leptina no hipotálamo.

Além da maior responsividade à leptina observada apenas no grupo GHR *LepR*, outra alteração observada especificamente neste grupo foi a redução do crescimento da ninhada em comparação a ninhada das fêmeas controle. A demanda metabólica foi similar para todas as fêmeas uma vez que todas as ninhadas foram padronizadas para o número total de 5 filhotes. Durante a gravidez, os animais aumentam a ingestão alimentar não só para satisfazer a demanda energética dos fetos, como também para depósito de gordura como reservatório de energia para lactação (LADYMAN et al., 2010 e SARWER et al., 2006). Uma vez que as fêmeas do grupo GHR *LepR* tinham menor adiposidade corporal desde o período pré-gestacional, este pode ter sido o fator que contribuiu para menor desenvolvimento da ninhada. Outro fator é a possível deleção do GHR na glândula mamária, uma vez que há expressão de *Lepr* também neste tecido, embora de forma semelhante ao que

ocorre no pâncreas o gene *Lepr* não é expresso em células secretórias de leite, apenas em células basais e mioepiteliais de camundongos (BUONFIGLIO et al., 2016). Diante destes achados destacamos a importância da ação central do GH na regulação metabólica da gestação para preparar o organismo materno de forma a atender as demandas metabólicas da prole.

7 CONCLUSÃO

SUBPROJETO 1

Nossos resultados demonstraram que a lactação é necessária para os efeitos metabólicos e alterações neuro-anatômicas no período pós-gestacional tardio observados em fêmeas selvagens que passaram por experiência reprodutiva. Adicionalmente, a acetilação de histonas em populações neuronais hipotalâmicas possivelmente sugere um mecanismo epigenético como responsável pelas adaptações metabólicas decorrentes da experiência reprodutiva. Além disso, demonstramos o papel fundamental desempenhado pela sinalização cerebral STAT5 nestas alterações observadas induzidas pela gestação e lactação a longo prazo, embora também indiquem a participação de mecanismos independentes da via STAT5. Considerando que a experiência reprodutiva induz alterações metabólicas permanentes no organismo materno, o que pode estar envolvido na incidência futura de doenças crônicas e outros problemas de saúde, nossos resultados fornecem novas pistas para a compreensão dos mecanismos moleculares por trás dessas adaptações metabólicas.

SUBPROJETO 2

Nossos achados sugerem que a ação central do GH regula a homeostase energética e glicêmica durante a gestação. Tais dados indicam que a sinalização central do GH é responsável por parte da alteração no balanço energético da gestação, particularmente na ingestão de alimentos e mobilização dos depósitos adiposos, assim como a instalação do estado de resistência à insulina característico deste período. Estes resultados, entretanto, não descartam o papel primário de outros hormônios da gestação, como a prolactina, nem a possibilidade do GH agir em outros tecidos.

Os resultados da presente tese resultaram na publicação de dois artigos científicos:

TEIXEIRA, PDS; RAMOS-LOBO, AM; FURIGO, IC; DONATO, J. Brain STAT5 modulates long-term metabolic and epigenetic changes induced by pregnancy and lactation in female mice. **Endocrinology** 2019.

TEIXEIRA, PDS; COUTO, GC; FURIGO, IC; LIST, EO; KOPCHICK, JJ; DONATO, J.
Central growth hormone action regulates metabolism during pregnancy and lactation.
American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 2019.

8 REFERÊNCIAS

- AHIMA, R.S.; PRABAKARAN, D.; FLIER, J.S. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, p.1020-1027, 1998.
- AMORIM, A.R.; ROSSNER, S.; NEOVIUS, M.; LOURENCO, P.M.; LINNE, Y. Does excess pregnancy weight gain constitute a major risk for increasing long-term BMI? **Obesity**, v.15, n.5, p.1278–1286, 2007.
- ANDERSON, G.M.; BEIJER, P.; BANG, A.S.; FENWICK, M.A.; BUNN, S.J.; GRATTAN, D.R. Suppression of prolactin-induced signal transducer and activator of transcription 5b signaling and induction of suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat during late pregnancy and lactation. **Endocrinology**, v.147, p.4996–5005, 2006.
- ARABIN, B.; STUPIN, J.H. Overweight and Obesity before, during and after Pregnancy Part 2: Evidence-based Risk Factors and Interventions. **Geburtshilfe Frauenheilkd.**, v.74, n.7, p.646–655, 2014.
- AUGUSTINE, R.A.; GRATTAN, D.R. Induction of Central Leptin Resistance in Hyperphagicm Pseudopregnant Rats by Chronic Prolactin Infusion. **Endocrinology**, v.149, n.3, p.1049-1055, 2008.
- AUGUSTINE, R.A.; GRATTAN, D.R. Induction of central leptin resistance in hyperphagic pseudopregnant rats by chronic prolactin infusion. **Endocrinology**, v.149, n.3, p.1049:1055, 2008.
- BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L.V.; KOH, G.Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C.F.; JEFFREY I. Gordon. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **PNAS**, v.101, n.44, p.15718-15723, 2004.
- BARBOUR, L.A.; SHAO, J.; QIAO, L.; PULAWA, L.K.; JENSEN, D.R.; BARTKE, A.; GARRITY, M.; DRAZNIN, B.; FRIEDMAN, J.E. Human placental growth hormone causes severe insulin resistance in transgenic mice. **Am J Obstet Gynecol.**, v.186, n.3, p.512-7, 2002.
- BARNARD, R.; WATERS, M.J. The serum GH binding protein: pregnant with possibilities. **J. Endocrinol.** 153 (1997) 1–14.
- BARSEGHIAN, G.; LEVINE, R.; EPPS, P. Direct effect of cortisol and cortisone on insulin and glucagon secretion. **Endocrinology**, v.111, n.5, p.1648-51, 1982.
- BELL, A.W.; BAUMAN, D.E. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v.2, p.265-278, 1997.
- BEN-JONATHAN, N. Dopamine: A prolactin-inhibiting hormone. **Endocr Rev**, v.6, p.564-589, 1985.
- BEN-JONATHAN, N.; HNASKO, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. **Endocr Rev**, v.22, p.724-763, 2001.
- BLISSETT, J.; HARRIS, G.; KIRK, J. Effect of growth hormone therapy on feeding problems and food intake in children with growth disorders. **Acta Paediatr**, v.89, p.644–649, 2000.

- BOHELN, T.M.; SILVEIRA, M.A.; ZAMPIERI, T.T.; FRAZÃO, R.; DONATO, J. JR. Fatness rather than leptin sensitivity determines the timing of puberty in female mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.423, n.5, p.11-21, 2016.
- BOHLOOLY-Y, M.; OLSSON, B.; BRUDER, C.E.G. et al. Growth Hormone overexpression in the Central Nervous System results in hyperphagia-induced obesity associated with insulin resistance and dyslipidemia. **Diabetes**, v.54, n.1, p.51-62, 2005.
- BOURET, S.G.; SIMERLY, R.B. Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. **Endocrinology**, v.145, p.2621-2626, 2004.
- BROOKS, A.J.; WATERS, M.J. The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v.6, p.515–525, 2010.
- BROWN, R.S.; KOKAY, I.C.; HERBISON, A.E.; GRATTAN, D.R. Distribution of prolactin responsive neurons in the mouse forebrain. **J. Comp. Neurol.** v.518, 92-102, 2010.
- BROWN, R.S.E.; HERBISON, A.E.; GRATTAN, D.R. Differential Changes in Responses of Hypothalamic and Brainstem Neuronal Populations to Prolactin During Lactation in the Mouse. **Biology of reproduction**, v.82, p.826-836, 2011.
- BROWN, R.S.E.; PIET, R.; HERBISON, A.E.; GRATTAN, D.R. Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons. **Neuroendocrinology**, v.153, n.2, p.2375-2384, 2012.
- BUONFIGLIO, D.C.; RAMOS-LOBO, A.M.; FREITAS, V.M.; ZAMPIERI, T.T.; NAGAISHI, V.S.; MAGALHÃES, M.; CIPOLLA-NETO, J.; CELLA, N.; DONATO, J. JR. Obesity impairs lactation performance in mice by inducing prolactin resistance. **Sci Rep.**, v.6, n.22421, 2016.
- BUONFIGLIO, D.C.; RAMOS-LOBO, A.M.; SILVEIRA, M.A.; FURIGO, I.C.; HENNIGHAUSEN, L.; FRAZÃO, R.; DONATO, J. JR. Neuronal STAT5 signaling is required for maintaining lactation but not for postpartum maternal behaviors in mice. **Hormones and behavior**, v.71, p.60-68, 2015.
- BYRNES, E.M., BABB, J.A., BRIDGES, R.S. Differential expression of oestrogen receptor α following reproductive experience in young and middle-aged female rats. **J. Neuroendocrinol.**, v.21, p.550–557, 2009.
- CADY, G.; LANDERYOU, T.; GARRATT, M.; KOPCHICK, J.J.; QI, N. et al. Hypothalamic growth hormone receptor (GHR) controls hepatic glucose production innutrient-sensing leptin receptor (LepRb) expressing neurons. **Molecular Metabolism**, v.6, p.393e405, 2017.
- CARON, E.; SACHOT, C.; PREVOT, V.; BOURET, S.G. Distribution of Leptin-Sensitive Cells in the Postnatal and Adult Mouse Brain. **Journal of Comparative Neurology.**, v.518, p.459–476, 2010.
- CARRÉ, N.; BINART, N. Prolactin and adipose tissue. **Biochimie.**, v.97, p.16-21, 2014.
- CATALANO PM, HOEGH M, MINIMUM J, et al. Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. **Diabetologia**, v.49, p.1677–1685, 2006.
- CHAMPAGNE, F.A.; WEAVER, I.C.; DIORIO, J.; DYMOV, S.; SZYF, M.; MEANEY, M.J. Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- α 1b promoter and estrogen receptor- α expression in the medial preoptic area of female offspring. **Endocrinology**, v.147, p.2909-2915, 2006.

CHEUNG, K.L.; LAFAYETTE, R.A. Renal physiology of pregnancy. **Adv Chronic Kidney Dis**, v.20, n.3, p.209–214, 2013.

CIOFI, P.; CROWLEY, W.R.; PILLEZ, A.; SCHMUED, L.L.; TRAMU, G.; MAZZUCA, M. Plasticity in expression of immunoreactivity for neuropeptide Y, enkephalins and neurotensin in the hypothalamic tubero-infundibular dopaminergic system during lactation in mice. **J Neuroendocr**, v.3, p.599-602, 1993.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. **Lancet**, v.360, n.9328, p.187-95, 2002.

CRESPI, E.J.; UNKEFER, M.K. Development of food intake controls: Neuroendocrine and environmental regulation of food intake during early life. **Hormones and Behavior**, v.66, p.74–85, 2014.

DA SILVA, R.P.; ZAMPIERI, T.T.; PEDROSO, J.A.B.; NAGAISHI, V.S.; RAMOS-LOBO, A.M.; FURIGO, I.C.; CÂMARA, N.O.; FRAZÃO, R.; DONATO, J.JR. Leptin resistance is not the primary cause of weight gain associated with reduced sex hormone levels in female mice. **Endocrinology**, v.155, n.11, p.4226-4236, 2014.

DE FANTI, B.A.; HAMILTON, J.S.; HORWITZ, B.A. Meal-induced changes in extracellular 5-HT in medial hypothalamus of lean (Fa/Fa) and obese (fa/fa) Zucker rats. **Brain Res**, v.902, p.164–170, 2001.

DENIS, R.G.P.; WILLIAMS, G.; VERNON, R.G. Regulation of serum leptin and its role in the hyperphagia of lactation in the rat. **J Endocrinol**, v.176, p.193-203, 2003.

DENROCHE, C.H.; HUYNH, F.K.; KIEFFER, T.J. The role of leptin in glucose homeostasis. **J Diabetes Investig**, v.28, n.3, p.115–129, 2012.

DIETRICH, M.O.; ZIMMER, M.R.; BOBER, J.; HORVATH, T.L. Hypothalamic AgRP Neurons Drive Stereotypic Behaviors beyond Feeding. **Cell**, v. 160, p.1222-1232, 2015.

DUARTE-GUTERMAN, P.; LEUNER, B.; GALEA, L.A.M. The long and short term effects of motherhood on the brain. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 2019.

FARLAND, L.V.; ELIASSEN, A.H.; TAMIMI, R.M.; SPIEGELMAN, D.; MICHELS, K.B.; MISSMER, S.A. History of breast feeding and risk of incident endometriosis: prospective cohort study. **BMJ**, v.358, n.3778, 2017.

FRANKENNE, F.; CLOSSET, J.; GOMEZ, F.; SCIPPO, M. L.; SMAL, J.; HENNEN, G. The Physiology of Growth Hormones (GHs) in Pregnant Women and Partial Characterization of the Placental GH Variant. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.66, n.6, 1988.

FREEMAN, M.E.; KANYICKSKA, B.; LERANT, A.; NAGY, G. Prolactin: Structure, function and regulation of secretion. **Physiol Rev**, v.80, p.1523-1631, 2000.

FREEMARK, M. Regulation of maternal metabolism by pituitary and placental hormones: roles in fetal development and metabolic programming. **Horm Res Paediatr**, v.65, s.3, p.41–49, 2006.

FREEMARK, M.; AVRIL, I.; FLEENOR, D.; DRISCOLL, P.; PETRO, A.; OPARA, E. et al.; KELLY, P.A. Target Deletion of the PRL Receptor: Effects on Islet Development, Insulin Production, and Glucose Tolerance. **Endocrinology**, v.143, n.4, p.1378-1385, 2002.

FURIGO, I.C.; KIM, K.W.; NAGAISHI, V.S.; RAMOS-LOBO, A.M.; DE ALENCAR, A.; PEDROSO, J.A.; METZGER, M.; DONATO, J.JR. Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- α and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. **Brain Res.**, v.1566, p.47-59, 2014.

FURIGO, I.C.; METZGER, M.; TEIXEIRA, P.D.; SOARES, C.R.; DONATO, J.JR. Distribution of growth hormone-responsive cells in the mouse brain. **Brain Structure & Function**, v.222, n.1, p.341e363, 2017.

GEHLERT, D.R.; THOMPSON, L.K.; HEMRICK-LUECKE, S.K.; SHAW, J. Monoaminergic compensation in the neuropeptide Y deficient mouse brain. **Neuropeptides**, v.42, p.367–375, 2008.

GONZÁLEZ, C.; ALONSO, A.; ALVAREZ, N.; DÍAZ, F.; MARTÍNEZ, M.; FERNÁNDEZ, S.; PATTERSON, A.M. Role of 17 β -estradiol and/or progesterone on insulin sensitivity in the rat: implications during pregnancy. **J Endocrinol.** v.166, n.2, p.283-91, 2000.

GRATTAN, D. R.; STEYN, F. J.; KOKAY, I. C.; ANDERSON, G. M.; BUNN, S. J. Pregnancy-induced adaptation in the neuroendocrine control of prolactin secretion. **J. Neuroendocrinol.**, v.20, p.497-507, 2008.

GRATTAN, D.R.; KOKAY, L.C. Prolactin: A pleiotropic neuroendocrine hormone. **J Neuroendocrinol**, v.20, p.752-763, 2008.

GUNDERSON, E.P.; STERNFELD, B.; WELLONS, M.F.; WHITMER, R.A.; CHIANG, V.; QUESENBERRY, C.P.JR.; LEWIS, C.E.; SIDNEY, S. Childbearing may increase visceral adipose tissue independent of overall increase in body fat. **Obesity** (Silver Spring), v.16, n.5, p.1078–1084, 2008.

HILL, J.O.; WYATT, H.R.; PETERS, J.C. The Importance of Energy Balance. **Eur Endocrinol.**, v.9, n.2, p.111–115, 2013.

HIRSCHBERG, A.L. Sex hormones, appetite and eating behaviour in women. **Maturitas**, v.71, p.248–256, 2012.

HOJVAT, S.; BAKER, G.; KIRSTEINS, L.; LAWRENCE, A.M. Growth hormone (GH) immunoreactivity in the rodent and primate CNS: distribution, characterization and presence posthypophysectomy. **Brain Research**, v.239, n.2, p.543e557, 1982.

HOYDA, T.D.; SMITH, P.M.; FERGUSON, A.V. Gastrointestinal hormone actions in the central regulation of energy metabolism: potential sensory roles for the circumventricular organs. **International Journal of Obesity**, v.33, p.S16–S21, 2009.

HRUBY, A.; HU, F.B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Pharmacoeconomics.**, v.33, n.7, p.673–689, 2015.

HUANG, C.; SNIDER, F.; CROSS, J.C. Prolactin Receptor Is Required for Normal Glucose Homeostasis and Modulation of beta-Cell Mass during Pregnancy. **Endocrinology**, v.150, p.1618-1626, 2009.

Institute of Medicine - IOM; National Research Council (2009) **Pregnancy Weight Guidelines**; Washington: National Academies Press (US); 2009.

JÄGER, S.; JACOBS, S.; KRÖGER, J.; FRITSCH, A.; SCHIENKIEWITZ, A.; RUBIN, D.; BOEING, H.; SCHULZE, M.B. Breast-feeding and maternal risk of type 2 diabetes: a prospective study and meta-analysis. **Diabetologia**, v.57, n.7, p.1355–1365, 2014.

JOHNSTONE, L. E., HIGUCHI, T. Food intake and leptin during pregnancy and lactation. **Prog. Brain Res.**, v.133, p.215-227, 2001.

JORDAN, S.J.; NA, R.; JOHNATTY, S.E.; WISE, L.A. et al. Breastfeeding and Endometrial Cancer Risk: An Analysis from the Epidemiology of Endometrial Cancer Consortium. **Obstet Gynecol.**, v.129, n.6, p.1059–1067, 2017.

KASTRUP, Y.; LE GREVÈS, M.; NYBERG, F.; BLOMQVIST, A. Distribution of growth hormone receptor mRNA in the brain stem and spinal cord of the rat. **Neuroscience**, v.130, n.2, p.419e425, 2005.

KATO, Y.; MURAKAMI, Y.; SOHMIYA, M.; NISHIKI, M. Regulation of human growth hormone secretion and its disorders. **Intern Med**, v.41, p.7-13, 2002.

KEDEES, M.H.; GUZ, Y.; VUGUIN, P.M.; VARGAS, C.; CUI, L.; STEINER, D.F.; CHARRON, M.J.; TEITELMAN, G. Nestin Expression in Pancreatic Endocrine and Exocrine Cells of Mice Lacking Glucagon Signaling. **Dev Dyn**, v.234, n.4, 1126-1133, 2007.

LADYMAN, S.R.; GRATTAN, D.R. Region-Specific reduction in leptin-induced phosphorylation of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (STAT3) in the rat hypothalamus is associated with leptin resistance during pregnancy. **Endocrinology**, v.145, n.8, p.3704-3711, 2004.

LADYMAN, S.R.; GRATTAN, D.R. Suppression of Leptin Receptor Messenger Ribonucleic Acid and Leptin Responsiveness in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus during Pregnancy in the Rat. **Endocrinology**, v.146, p.3868-3874, 2005.

LILLYCROP, K.A.; BURDGE, G.C. Epigenetic changes in early life and future risk of obesity. **Int J Obes (Lond)**, v.35, n.1, p.72-83, 2011.

LIST, E.O.; BERRYMAN, D.E.; FUNK, K.; JARA, A.; KELDER, B.; WANG, F.; STOUT, M.B.; ZHI, X.; SUN, L.; WHITE, T.A.; LEBRASSEUR, N.K.; PIRTSKHALAVA, T.; TCHKONIA, T.; JENSEN, E.A.; ZHANG, W.; MASTERNAK, M.M.; KIRKLAND, J.L.; MILLER, R.A.; BARTKE, A.; KOPCHICK, J.J. Liver-specific GH receptor gene-disrupted (LiGHRKO) mice have decreased endocrine IGF-I, increased local IGF-I, and altered body size, body composition, and adipokine profiles. **Endocrinology**, v.155, p.793-1805, 2014.

LIU, Y.E.; PU, W.; WANG, J.; KANG, J.X.; SHI, Y.E. Activation of Stat5 and induction of a pregnancy-like mammary gland differentiation by eicosapentaenoic and docosapentaenoic omega-3 fatty acids. **FEBS Journal**, v.274, p.3351–3362, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{ΔΔCT} method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LUKE B, HEDIGER ML, NUGENT C, NEWMAN RB, MAULDIN JG, WITTER FR, O'SULLIVAN MJ. Body mass index – specific weight gains associated with optimal birth weights in twin pregnancies. **Journal of Reproductive Medicine**, v.48, n.4, p.217–224, 2003.

MANNAN, M.; DOI, S.A.; MAMUN, A.A. Association between weight gain during pregnancy and postpartum weight retention and obesity: a bias-adjusted meta-analysis **Nutr Rev**, v.71, p.343-352, 2013.

MANNAN, M.; O'CALLAGHAN, M.; WILLIAMS, G.; NAJMAN, J.; CALLAWAY L. Association between gestational weight gain and postpartum diabetes: evidence from a community based large cohort study. **PLoS One**, v.8, 2013.

MAZANCOURT, P.; CARNEIRO, E.M.; ATWATER, I.; BOSCHERO, A.C. Prolactin treatment increases GLUT2 but not the G protein subunit content in cell membranes from cultured neonatal rat islets. **FEBS Lett.** v.343, p.137–40, 1994.

MCCARTHY, M.I. Genomics, Type 2 Diabetes, and Obesity **N Engl J Med**, v.363, p.2339–50, 2010.

MEGUID, M.M.; FETISSOV, S.O.; VARMA, M.; SATO, T.; ZHANG, L.; FANELLI, R.F. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. **Nutrition**, v.16, p.843–857, 2000.

MORTON, G.J.; MEEK, T.H.; SCHWARTZ, M.W. Neurobiology of food intake in health and disease. **Nat Rev Neurosci**, v.15, p.367–378, 2014.

NAEF, L.; WOODSIDE, B. Prolactin/leptin interactions in the control of food intake in rats. **Endocrinology**, v.148, p.5977–5983, 2007.

NEHRING, I. SCHMOLL, S.; BEYERLEIN, A.; HAUNER, H.; VON KRIES, R. Gestational weight gain and long-term postpartum weight retention: a meta-analysis. **Am J Clin Nutr**, v.94, p.1225–31, 2011.

NORMAN, J.E.; REYNOLDS, R.M. The consequences of obesity and excess weight gain in pregnancy. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.70, n.4, p.450:456, 2011.

NUMAN, M.; WOODSIDE, B. Maternity: Neural Mechanisms, Motivational Processes, and Physiological Adaptations. **Behavioral Neuroscience**, v.124, n.6, p.715–741, 2010.

OLSON CM1, STRAWDERMAN MS, HINTON PS, PEARSON TA. Gestational weight gain and postpartum behaviors associated with weight change from early pregnancy to 1 y postpartum. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v.27, n.1, p.117–27, 2003.

PALACÍN, M.; LASUNCIÓN, M.A.; ASUNCIÓN, M.; HERRERA, E. Circulating metabolite utilization by periuterine adipose tissue in situ in the pregnant rat. **Metabolism**, v.40, p.534–539, 1991.

PAPPER, Z.; JAMESON, N.M.; ROMERO, R.; WECKLE, A.L.; MITTAL, P.; BENIRSCHKE, K.; SANTOLAYA-FORGAS, J.; UDDIN, M.; HAIG, D.; GOODMAN, M. et al. Ancient origin of placental expression in the growth hormone genes of anthropoid primates. **PNAS**, v.106, p.17083–17088, 2009.

PEDROSO, J.A.; BUONFIGLIO, D.C.; CARDINALI, L.I.; FURIGO, I.C.; RAMOS-LOBO, A.M.; TIRAPEGUI, J.; ELIAS, C.F.; DONATO, J. JR. Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity. **Mol Metab**, v.3, n.6, p.608–18, 2014.

PELLEYMOUNTER, M.A.; CULLEN, M.J.; BAKER, M.B.; HECHT, R.; WINTERS, D.; BOONE, T.; COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v.269, p.540–543, 1995.

PRAGER, D.; BRAUNSTEIN, G. Pituitary disorders during pregnancy. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.24, n.1, 1995.

RAMOS-LOBO, A.M.; DONATO, J. Jr. The role of leptin in health and disease, **Temperature**, v.4, n.3, p.258–29, 2017.

RAWLINGS, J.S.; ROSLER, K.M.; HARRISON, D.A. The JAK/STAT signaling pathway. **J. Cell Sci.**, v.117, p. 1281, 2004.

- RIMAN, T.; PERSSON, I.; NILSSON, S. Hormonal aspects of epithelial ovarian cancer: review of epidemiological evidence. **Clinical Endocrinology**, v.49, p.695–707, 1998.
- ROONEY, B.L. e SCHAUBERGER, C.W. Excess Pregnancy Weight Gain and Long-Term Obesity: One Decade Later. **Obstet. Gynecol.**, v.100, n.2, p.245-252, 2002.
- ROONEY, B.L.; SCHAUBERGER, C.W.; MATHIASON, M.A. Impact of perinatal weight change on long-term obesity and obesity-related illnesses. **Obstetrics and Gynecology**, v.106, n.6, p.1349–1356, 2005.
- RYAN, E.A.; ENNS, L. Role of gestational hormones in the induction of IR. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.67, n.2, p.341–47, 1988.
- SALES, V.M.; FERGUSON-SMITH, A.C.; PATTI, M.E. Epigenetic Mechanisms of Transmission of Metabolic Disease Across Generations. **Cell Metab.**, v.25, n.3, p.559–571, 2017.
- SALTIEL, A.R.; KAHN, R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, p.799-806, 2001.
- SCHOLL, T.O.; HEDIGER, M.L.; SCHALL, J.I.; ANCES, I.G.; SMITH, W.K. Gestational weight gain, pregnancy outcome, and postpartum weight retention. **Obstet Gynecol.** v.86, n.3, p.423-7, 1995.
- SILVA, R.P.; ZAMPIERI, T.T.; PEDROSO, J.A.; NAGAISHI, V.S.; RAMOS-LOBO, A.M.; FURIGO, I.C.; CAMARA, N.O.; FRAZAO, R.; DONATO, J. Leptin resistance is not the primary cause of weight gain associated with reduced sex hormone levels in female mice. **Endocrinology**, v.155, p.4226-4236, 2014.
- SILVEIRA, M.A.; FURIGO, I.C.; ZAMPIERI, T.T.; BOHLEN, T.M.; DE PAULA, D.G.; FRANCI, C.R.; DONATO JR., J.; FRAZAO, R. STAT5 signaling in kisspeptin cells regulates the timing of puberty. **Mol. Cell Endocrinol.**, v.448, p.55-65, 2017.
- SJOEHOLM, A.; BRIDGES, R.S.; GRATTAN, D.R.; ANDERSON, G.M. Region-, Neuron-, and Signaling Pathway-Specific Increases in Prolactin Responsiveness in Reproductively Experienced Female Rats. **Endocrinology**, v.152, p.1979-1988, 2011.
- SMITH, M.S.; GROVE, K.L. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: Lactation as a model. **Front Neuroendocrinol**, v.23, p.225-256, 2002.
- SNEL, Y.E.; BRUMMER, R.J.; DOERGA, M.E.; ZELISSEN, P.M.; KOPPESCHAAR, H.P. Energy and macronutrient intake in growth hormone-deficient adults: the effect of growth hormone replacement. **Eur J Clin Nutr**, v.49, p.492–500, 1995.
- SOHLSTROM, A.; FORSUM, E. Changes in adipose tissue volume and distribution during reproduction in Swedish women as assessed by magnetic resonance imaging. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.61, n.2, p.287–295, 1995.
- SONAGRA, A.D.; BIRADAR, S.M.; DATTATREYA, K.; MURTHY, J. “Normal Pregnancy- A State of Insulin Resistance.” **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.8, n.11, p.1-3, 2014.
- TRUJILLO, M.L.; SPUCH, C.; CARRO, E.; SEÑARÍS, R. Hyperphagia and Central Mechanisms for Leptin resistance during Pregnancy. **Endocrinology**, v.152, n.4, p.1355–1365, 2011.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDI, E.R.; GORDON, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v.444, 2006.

UDAGAWA, J.; HATTA, T.; HASHIMOTO, R.; OTANI, H. Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development. **Congenit Anom.**, v.47, n.3, p.77-83, 2007.

VERNON, R.G.; DENIS, R.G.P.; SOENSEN, A.; WILLIAMS, G. Leptin and the adaptations of lactation in rodents and ruminants. **Horm Metab Res**, v.34, p.678-685, 2002.

WADA, T.; HORI, S.; SUGIYAMA, M.; FUJISAWA, E.; NAKANO, T.; TSUNEKI, H.; NAGIRA, K.; SAITO, S.; SASAOKA, T. Progesterone inhibits glucose uptake by affecting diverse steps of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.298, n.4, p.E881-8, 2010.

WAGATSUMA, K.; TANI-ICHI, S.; LIANG, B.; SHITARA, S.; ISHIHARA, K.; ABE, M.; MIYACHI, H.; KITANO, S.; HARA, T.; NANNO, M.; ISHIKAWA, H.; SAKIMURA, K.; NAKAO, M.; KIMURA, H.; IKUTA, K. STAT5 Orchestrates Local Epigenetic Changes for Chromatin Accessibility and Rearrangements by Direct Binding to the TCRgamma Locus. **J Immunol.**, v.195, n.4, p.1804-1814, 2015.

WALKER, L.O.; STERLING, B.S.; KIM, M.; ARHEART, K.L.; TIMMERMAN, G.M. Trajectory of weight changes in the first 6 weeks postpartum. **J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.** v.35, n.4, p.472-81, 2006.

WINGELHOFFER, B.; NEUBAUER, H.A.; VALENT, P.; HAN, X.; CONSTANTINESCU, S.N.; GUNNING, P.T.; MULLER, M.; MORIGGL, R. Implications of STAT3 and STAT5 signaling on gene regulation and chromatin remodeling in hematopoietic cancer. **Leukemia**, v.32, n.8, p.1713-1726, 2018.

WOODSIDE, B. Prolactin and the hyperphagia of lactation. **Physiol Behav**, v.91, p.375-382, 2007.

WOODSIDE, B.; BUDIN, R.; WELLMAN, M.K.; ABIZAID, A. Many mouths to feed: The control of food intake during lactation. **Front Neuroendocrinol**, v.33, p.301-314, 2012.

YANG, J.J.; LARSEN, C.M.; GRATTAN, D.R.; ERSKINE, M.S. Mating-induced neuroendocrine responses during pseudopregnancy in the female mouse. **J Neuroendocrinol.** v.21, n.1, p.30-9, 2009.

ZALBAHAR, N.; JAN MOHAMED, H.J.B.; LOY, S.L.; NAJMAN, J.; MCINTYRE, H.D.; MAMUN A. Association of parental body mass index before pregnancy on infant growth and body composition: evidence from a pregnancy cohort study in Malaysia **Obes Res Clin Pract**, v.10, p.S35-S47, 2016.

ZAMPIERI, T.T.; DA SILVA, T.E.; DE PAULA ROMEU, D.; DA SILVA TORRÃO, A.; DONATO, J. JR. SOCS3 expression within leptin receptor-expressing cells regulates food intake and leptin sensitivity but does not affect weight gain in pregnant mice consuming a high-fat diet. **Physiol Behav.** v.157, p.109-15, 2016.

ZAMPIERI, T.T.; RAMOS-LOBO, A.M.; FURIGO, I.C.; PEDROSO, J.A.; BUONFIGLIO, D.C.; DONATO, J.JR. SOCS3 deficiency in leptin receptor-expressing cells mitigates the development of pregnancy-induced metabolic changes. **Molecular Metabolism**, v.4, n.3, p.237-245, 2015.

ZENG, Z.; LIU, F.; LI, S. Metabolic adaptations in Pregnancy: a review. **Ann Nutr Metab.**, v.70, p.59-65, 2017.

ANEXO

ANEXO 1. Sequência de primers utilizados para determinação de expressão gênica por PCR em tempo real.

Gene de interesse	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
<i>Actb</i>	GCTCCGGCATGTGCAAAG	CATCACACCCTGGTGCCTA
<i>Agrp</i>	CTTTGGCGGAGGTGCTAGAT	AGGACTCGTGCAGCCTTACAC
<i>Cartpt</i>	CAGTCACACAGCTTCCCGAT	CAGATCGAAGCGTTGCAAGA
<i>Cish</i>	TCGGGAATCTGGGTGGTACT	TAGGAATGTACCCTCCGGCA
<i>Dnmt1</i>	CCGGAACTCACTTGGACGA	TTTGGCAGCTGGATCTCTGG
<i>Dnmt3a</i>	ATTGATGAGCGCACAAGGGA	GTGACATTGAGGCTCCCACA
<i>Dnmt3b</i>	TCCTGGCATGTAACCCAGTG	TCTTTGAAGCCATCACGGGC
<i>Esr1</i>	GCAGATAGGGAGCTGGTTCA	TGGAGATTCAAGTCCCCAAA
<i>Gapdh</i>	GGGTCCCAGCTTAGGTTTCAT	TACGGCCAAATCCGTTTACA
<i>Ghr (all isoforms)</i>	ATCAATCCAAGCCTGGGGAC	ACAGCTGAATAGATCCTGGGG
<i>Hcrt</i>	GACAGCAGTCGGGCAGAG	GGCACCATGAACTTTCCTTC
<i>Hdac3</i>	GGAGCTGGACACCCAATGAA	GGCCTGGTAAGGCTTGAAGA
<i>Hdac5</i>	GCAGCCCTTGATGAAGCAG	CTCCAGTGTTTGCTCTGGATCTC
<i>Hdac8</i>	CTGATGTTGGCCTGGGGAAA	AGTTCTGGTGAAACAGGCTCT
<i>Lepr (isoform b)</i>	TGTCCTACTGCTCGGAACAC	GCTCAAATGTTTCAGGCTTTTGG
<i>Npy</i>	CCGCCCCGCCATGATGCTAGGTA	CCCTCAGCCAGAATGCCCAA
<i>Pomc</i>	ATAGACGTGTGGAGCTGGTGC	GCAAGCCAGCAGGTTGCT
<i>Prlr (all isoforms)</i>	CAGTAAATGCCACGAACGAA	GAGGAGGCTCTGGTTCAACA
<i>Socs1</i>	TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)	TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)
<i>Socs3</i>	TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)	TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)
<i>Stat5a</i>	CGCTGGACTCCATGCTTCTC	GACGTGGGCTCCTCACACTGA
<i>Stat5b</i>	GGAATCCGTCCTTGATACCG	TCCATCGTGTCTTCCAGATCG
<i>Th</i>	TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)	TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)

APÊNDICES

PRODUÇÃO CIENTÍFICA COMPLEMENTAR

Concomitante à execução desta tese, foram realizados e publicados os seguintes trabalhos:

FURIGO, I.C.; **TEIXEIRA, P.D.S.**; DE SOUZA, G.O.; COUTO, G.C.L.; ROMERO, G.G.; PERELLÓ, M.; FRAZÃO, R.; ELIAS, L.L.; METZGER, M.; LIST, E.O.; KOPCHICK, J.J.; DONATO, J. Growth hormone regulates neuroendocrine responses to weight loss via AgRP neurons. **Nature Communications**, v. 10, p. 1-11, 2019.

RAMOS-LOBO, A.M.; **TEIXEIRA, P.D.S.**; FURIGO, I.C.; MELO, H.M.; LYRA E SILVA, N.M.; DE FELICE, F.G.; DONATO, J. Long-term consequences of the absence of leptin signaling in early life. **eLife**, 2019.

FURIGO, I.C.; SUZUKI, M.F.; OLIVEIRA, J.E.; RAMOS-LOBO, A.M.; **TEIXEIRA, P.D. S.**; PEDROSO, J.A.; DE ALENCAR, A.; ZAMPIERI, T.T.; BUONFIGLIO, D.C.; QUARESMA, P.G.F.; PRADA, P.O.; BARTOLINI, P.; SOARES, C.R.J.; DONATO, J. Suppression of Prolactin Secretion Partially Explains the Antidiabetic Effect of Bromocriptine in ob/ob Mice. **Endocrinology**, v. 160, p. 193-204, 2019.

RAMOS-LOBO, A.M.; FURIGO, I.C.; **TEIXEIRA, P.D.S.**; ZAMPIERI, T.T.; WASINSKI, F.; BUONFIGLIO, D.C.; DONATO, J. Maternal metabolic adaptations are necessary for normal offspring growth and brain development. **Physiological Reports**, v. 6, p. e13643, 2018.

FURIGO, I.C.; MELO, H.M.; LYRA e SILVA, N.M.; RAMOS-LOBO, A.M.; **TEIXEIRA, P.D.S.**; BUONFIGLIO, D.C.; WASINSKI, F.; LIMA, E.R.; HIGUTI, E.; PERONI, C.N.; BARTOLINI, P.; SOARES, C.R.; METZGER, M.; FELICE, F.G.; DONATO, J. Brain STAT5 signaling modulates learning and memory formation. **Brain Structure & Function**, v. 223, p. 2229-2241, 2018.

RAMOS-LOBO, A.M.; **TEIXEIRA, P.D.S.**; FURIGO, I.C.; DONATO, J. SOCS3 ablation in SF1 cells causes modest metabolic effects during pregnancy and lactation. **Neuroscience**, v. 17, p. 30701-7, 2017.

PEDROSO, J.A.B.; SILVEIRA, M.A.; LIMA, L.B.; FURIGO, I.C.; ZAMPIERI, T.T.; RAMOS-LOBO, A.M.; BUONFIGLIO, D.C.; **TEIXEIRA, P.D.S.**; FRAZAO, R.; DONATO, J. Changes in leptin signaling by SOCS3 modulate fasting-induced hyperphagia and weight regain in mice. **Endocrinology**, v. 10, p. 3901-3914, 2016.

FURIGO, I.C.; METZGER, M.; TEIXEIRA, P.D.S.; SOARES, C.R.J.; DONATO, J. Distribution of growth hormone-responsive cells in the mouse brain. **Brain Structure & Function** (Print), v. 222, p. 341-363, 2016.