UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

GISELE CRISTINA LOPES COUTO

**A IMPORTÂNCIA DA AÇÃO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO
SOBRE OS NEURÔNIOS NPY/AgRP DO HIPOTÁLAMO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

GISELE CRISTINA LOPES COUTO

**A IMPORTÂNCIA DA AÇÃO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO
SOBRE OS NEURÔNIOS NPY/AgRP DO HIPOTÁLAMO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Donato Junior

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)

Couto, Gisele Cristina Lopes

A importância da ação do hormônio do crescimento
sobre os neurônios NPY/AgRP do hipotálamo / Gisele
Cristina Lopes Couto; orientador José Donato
Junior. -- São Paulo, 2019.

78 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Obesidade . 2. Metabolismo. 3. Hipotálamo. 4.
Ingestão alimentar . 5. GH. I. Donato Junior, José,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gisele Cristina Lopes Couto

Título da Dissertação: A importância do hormônio de crescimento sobre os neurônios NPY/AgRP do hipotálamo

Orientador(a): Prof. Dr. José Donato Junior

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada/...../....., considerou

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

Examinador(A): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(A): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Ação do hormônio do crescimento no sistema nervoso: relevância para as funções neurais e na doença"**, registrado sob o protocolo nº **73/2017**, 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 **07/07/2017** 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 com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) José Donato Júnior**

- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*

- Membros da Equipe: *Priscila Dryelle Sousa Teixeira, Isadora Clivatti Furigo (Pós-Doutorando), João Alfredo Balivar Pedrosa (Pós-Doutorando), Frederick Wasinski (Pós-Doutorando), Gisele Cristina Colto, Ana Maria P. Campo (Técnico de Laboratório), Renata Frazão (Pesquisador Colaborador), Leandro Bueno Lima (Pós-Doutorando), Tabata Bahlen, Lucas Brecht Palos das Santos (Iniciação Científica), Igor Tomaz (Iniciação Científica), Gabriel Orefice de Souza (Iniciação Científica), Fernanda Machado (Pós-Graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. 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 **"The role of growth hormone in the brain: relevance for neural functions and in disease"**, protocol nº **73/2017**, 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 **7/7/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) José Donato Júnior**

- Team members: *Priscila Dryelle Sousa Teixeira, Isadora Clivatti Furigo (Postdoctoral Researcher), João Alfredo Balivar Pedrosa (Postdoctoral Researcher), Frederick Wasinski (Postdoctoral Researcher), Gisele Cristina Colto, Ana Maria P. Campo (Laboratory Technician), Renata Frazão (Collaborator Researcher), Leandro Bueno Lima (Postdoctoral Researcher), Tabata Bahlen, Lucas Brecht Palos das Santos (Undergraduate Student), Igor Tomaz (Undergraduate Student), Gabriel Orefice de Souza (Undergraduate Student), Fernanda Machado (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. 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
Mus musculus	C57BL/6 selvagem	Macho/Male	até 8 meses/months	170 (4)
Mus musculus	GHR-flox/Nestin-Cre	Macho/Male	até 20 meses/months	280 (6)
Mus musculus	db/db	Macho/Male	até 8 meses/months	30 (4)
Mus musculus	ob/ob	Macho/Male	até 8 meses/months	40 (4)
Mus musculus	lit/lit	Macho/Male	até 8 meses/months	30 (1)

Dedico esse trabalho primeiramente à Deus por sempre conduzir o meu caminho, a minha mãe Ivone Lopes por sempre acreditar em mim, me direcionar e por me ensinar a ser a melhor pessoa que eu possa ser, aos meus irmãos Ana Maria e Benedito que sempre me apoiaram e me incentivaram a continuar, ao meu pai Benedito Couto pelo apoio, a minha amiga Gabriela Fullin que foi a pessoa responsável por me mostrar que existia essa possibilidade e me receber em sua família por esse tempo, foi muito especial, ao meu esposo Leonardo Gepp por me apoiar incondicionalmente e não me deixar desistir no meio da caminhada.

Amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em especial ao meu Orientador José Donato Junior, por ter me aceito e me direcionado nessa caminhada, sendo sempre muito prestativo e compreensivo em todos os momentos.

E a todos os amigos do laboratório que me ajudaram em todos os momentos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À FAPESP pelo expressivo apoio financeiro cedido, o qual foi primordial para o desenvolvimento da dissertação do meu mestrado. Processo: 2017/04006-4.

Minha eterna gratidão!

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano. Mas o que seria do oceano se não infinitas gotas?”

Isaac Newton

RESUMO

Couto, G. C. L. **A importância da ação do hormônio do crescimento sobre os neurônios NPY/AgRP do hipotálamo.** 2019. – f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O hormônio do crescimento (GH) age sobre tecidos periféricos e está relacionado com várias funções do organismo como, o controle do metabolismo, crescimento somático e processos celulares. Existem evidências que o GH pode exercer efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC). Neurônios que co-expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada à agouti (AgRP) estão localizados na parte ventromedial do núcleo arqueado do hipotálamo (ARH). Com intuito de estudar a ação do GH especificamente em neurônios NPY/AgRP, iremos utilizar o sistema Cre-LoxP que permite a manipulação gênica de maneira tecido-específica. Sendo assim, inativamos o receptor de GH em neurônios NPY/AgRP em camundongos fêmeas (GHR/AgRP KO). Como já é bem sabido, essa população de neurônios é conhecida como um potente estimulador do apetite, objetivamos verificar se a falta do receptor de GH (GHR), pode impactar fatores metabólicos. Na validação do modelo observamos que os neurônios NPY/AgRP são responsivos ao GH. As fêmeas GHR/AgRP KO não apresentam diferença no peso corporal. Além disso, não foram observadas diferenças na avaliação metabólica, como, tolerância à glicose, sensibilidade à insulina ou na resposta à leptina. Assim como não observamos diferenças significativa no gasto energético. Quando desafiadas à restrição alimentar, as fêmeas GHR/AgRP KO apresentam maior dificuldade de sustentar a glicemia e perdem mais peso que as fêmeas controles. Por outro lado, a resposta contra regulatória à hipoglicemia é similar entre os animais GHR/AgRP KO e os controles. Ainda, quando expostas ao estresse por contenção, as fêmeas GHR/AgRP KO apresentaram consumo alimentar similar aos animais do grupo controle. Um segundo grupo foi gerado com o intuito de analisarmos o equilíbrio energético e homeostase da glicose durante a gestação e lactação. Os grupos responderam de forma similar tanto ao que se refere ao equilíbrio energético, quanto em relação à glicemia. Por fim, após os aspectos relacionados ao metabolismo energético, utilizando a técnica de ensaio de flexão de três pontos, que analisa parâmetros relacionados ao metabolismo ósseo, observamos que o grupo controle e GHR/AgRP KO não apresentaram diferenças significantes nos parâmetros ósseos analisados. Nossos resultados sugerem que o GH exerce efeito sobre o metabolismo via neurônios NPY/AgRP apenas durante situações de estresse crônico como por exemplo, em situação de privação alimentar.

Palavras-chave: Obesidade. Metabolismo. Hipotálamo. Ingestão alimentar. GH.

ABSTRACT

Couto, G. C. L. **The importance of the action of growth hormone on the hypothalamus NPY/AgRP neurons.** 2019. - f. Dissertation (Master in Science) Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Growth hormone (GH) acts on peripheral tissues and is related to various functions of the organism such as metabolism control, somatic growth and cellular processes. There is evidence that GH may exert effects on the central nervous system (CNS). Neurons co-expressing the neuropeptide Y (NPY) and related protein agouti (AgRP) are located in the ventromedial part of the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH). In order to study the action of GH specifically on NPY / AgRP neurons, we will use the Cre-LoxP system that allows a genetic manipulation in a tissue-specific manner. Thus, we inactivate the GH receptor in NPY / AgRP neurons in female animals (GHR / AgRP KO). It is well established that this population of neurons is known as a potent stimulator of appetite, so we aim to verify if the lack of the GH receptor (GHR) can impact metabolic factors. In the validation of the model we observed that NPY / AgRP neurons are responsive to GH. GHR / AgRP KO females shown no difference in body weight. In addition, no differences were observed in metabolic evaluation, such as glucose tolerance, insulin sensitivity or leptin response. As well as we didn't observe significant differences in energy expenditure. When challenged with dietary restriction, GHR / AgRP KO females presented greater difficulty in sustaining glycemia and lost more weight than control females. On the other hand, the counter-regulatory response to hypoglycemia is similar between the GHR / AgRP KO and control animals. Also, when exposed to containment stress, the GHR / AgRP KO females presented similar food consumption to the control animals. A second group was generated with the purpose of analyzing the energy balance and glucose homeostasis during pregnancy and lactation. The groups responded similarly to both energy balance and glycemia. Finally, after the aspects related to energy metabolism, using the three-point flexural test technique, which analyzes parameters related to bone metabolism, we observed that the control and GHR / AgRP KO groups didn't present significant differences in the analyzed bone parameters. Our results suggest that GH exerts an effect on the metabolism via NPY / AgRP neurons only during situations of chronic stress such as food deprivation.

Keywords: Obesity. Metabolism. Hypothalamus. Food intake. GH.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. As concentrações médias ($\pm$ SE) de GH plasmática em homens (painel superior) e mulheres (painel inferior) durante a infusão iv de soro fisiológico normal (símbolos abertos) ou antagonista de GHRH (símbolos fechados)	24
Figura 2. Modelos experimentais (cruzamento).....	33
Figura 3. Neurônios AgRP como alvos diretos do GH.....	40
Figura 4. Fosforilação do STAT5 em todos os grupamentos responsivos ao GH, exceto nos neurônios NPY/AgRP.....	41
Figura 5. Acompanhamento do peso corporal de camundongos fêmeas controles e com deleção do GHR em células AgRP. Fêmeas controle (n = 40); fêmeas AgRP GHR/AGRP KO (n = 21)	42
Figura 6. Acompanhamento do consumo alimentar (A) de camundongos fêmeas controle e com deleção do GHR em células AgRP. Fêmeas controle (n = 10); Fêmeas GHR/AGRP KO (n = 10)	43
Figura 7. Monitoramento metabólico em sistema OXYMAX/CLAMS. Fêmeas controle: (n = 8); Fêmeas GHR/AGRP KO: (n = 8)	44
Figura 8. Aferição da adiposidade (A), SC (subcutâneo), PU (periuterino), PO (periovariano) e RP (retroperitonal) e crescimento longitudinal (B) realizada na eutanásia dos animais controle e com deleção do GHR em células AgRP. Fêmeas controle (n = 10); Fêmeas AgRP GHR/AGRP KO (n = 10)	45
Figura 9. Homeostase glicêmica – Teste de tolerância à glicose (GTT) (A) e área sob a curva; teste de resistência à insulina (ITT) (B) e área sob a curva. Fêmeas controle (n = 10); Fêmeas AgRP GHR/AGRP KO (n = 10)	45 e 46
Figura 10. Teste 2-deoxi-D-glicose e área sob à curva - Para verificar a resposta contra regulatória a hipoglicemia. Fêmeas controle (n = 10); Fêmeas GHR/AGRP KO (n = 10)	47

Figura 11. Teste de sensibilidade à leptina. Peso corporal (A) e consumo de ração (B). Fêmeas controle (n = 10); Fêmeas AgRP GHR/AGRP KO (n = 10)48

Figura 12. Teste biomecânico. Ensaio de flexão de três pontos (EFTP). No gráfico (A) avaliamos força (F2), rigidez, resiliência e tenacidade dos fêmures. No gráfico (B) força, rigidez, resiliência e tenacidade das tíbias. GHR/AGRP KO (n = 8); Controles (n = 5)49

Figura 13. Crescimento ósseo: Figura (A) tamanho fêmur (cm). Figura (B) tamanho da tíbia (cm) GHR/AgRP KO (n = 8); Controles (n = 5)50

Figura 14. Restrição alimentar (R.A) e Realimentação (R) – Peso corporal (A); Adiposidade (B) onde subcutâneo (SC), periuterina (PU), periovariana (PO) e retroperitoneal (RP); Glicemia (C) e área sob à curva (D).Fêmeas controle (n = 10); Fêmeas GHR/AGRP KO (n = 10).....51

Figura 15. Protocolo de estresse induzido por contenção. Peso corporal (A) e Consumo alimentar (B): Fêmeas controle (n = 5), fêmeas controle contenção (n = 5), fêmeas GHR/AgRP KO (n = 5) e fêmeas GHR/AGRP KO contenção (n = 5).52

Figura 16. Equilíbrio energético durante a gravidez e lactação. Peso corporal (A) e peso filhotes (B) Consumo alimentar (C) e adiposidade (C) onde subcutâneo (SC), periuterina (PU), periovariana (PO) e retroperitoneal (RP). GHR/AGRP KO (n = 10); Controles (n = 8)53

Figura 17. Homeostase da glicose durante a gravidez. Teste de tolerância à glicose (GTT) (A) e área sob à curva. Teste de tolerância à insulina (ITT) (B). GHR/AGRP KO (n = 3); Controles (n = 5)54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Fatores que afetam a secreção e inibição de GH.....	25
Quadro 2. Efeitos da deficiência do GH.....	28
Quadro 3. Esquema do fluxo de experimentos da fase 1.....	38
Quadro 4. Esquema do fluxo de experimentos da fase 2.....	38
Quadro 5. Esquema do fluxo de experimentos da fase 3.....	39
Quadro 6. Esquema do fluxo de experimentos da fase 4.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRP – peptídio relacionado ao agouti

ARH – núcleo arqueado do hipotálamo

CART – transcrito regulado por cocaína e anfetamina

DNA – ácido desoxirribonucleico

GH – Hormônio do crescimento

GHR – receptor do hormônio do crescimento

GTT – teste de tolerância à glicose

i.p. – intraperitoneal

IGF – fator de crescimento semelhante à insulina

ITT – teste de tolerância à insulina

Kcal – quilocaloria

KO – Nocaute

NPY – neuropeptídio Y

PBS – tampão fosfato salino

PCR – do inglês polimerase chain reaction

Periov. – Periovariano

Periut. – Periuterino

POMC – pró-opiomelanocorticotropina

RER – coeficiente respiratório

Retrop. – Retroperitoneal

RNA – ácido ribonucleico

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

s.c. – subcutâneo

SNC – sistema nervoso central

STAT – sinal de transdução e ativador de transcrição

VCO₂ – dióxido de carbono produzido

VO₂ – volume de oxigênio consumido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	NÚCLEO ARQUEADO DO HIPOTÁLAMO (ARH)	19
1.2	HORMÔNIOS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DO METABOLISMO VIA ARH	21
1.2.1	LEPTINA	21
1.2.2	INSULINA	22
1.2.3	GHRELINA	22
1.3	HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH)	23
1.3.1	SECREÇÃO, RECEPTORES E VIAS DE SINALIZAÇÃO	23
1.3.2	AÇÕES FISIOLÓGICAS DO GH	26
1.3.3	AÇÃO DO GH NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)	28
2	OBJETIVO DO TRABALHO	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	ANIMAIS	32
3.2	IDENTIFICAÇÕES DAS MUTAÇÕES GÊNICAS	33
3.3	CONFIRMAÇÃO DA DELEÇÃO CONDICIONAL	33
3.4	BALANÇO ENERGÉTICO	34
3.5	CONTROLE GLICÊMICO	34
3.5.1	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)	34
3.5.2	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)	34
3.5.3	RESPOSTA CONTRA-REGULATÓRIA À HIPOGLICEMIA (2-DEOXI-D-GLICOSE)	35
3.6	TESTE DE SENSIBILIDADE À LEPTINA	35
3.7	AVALIAÇÃO DA BIOMECÂNICA ÓSSEA: ENSAIO DE FLEXÃO DE	

TRÊS PONTOS (EFTP).....	35
3.8 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DO GHR EM NEURÔNIOS NPY/AgRP EM SITUAÇÕES EM QUE O GH É ALTAMENTE SECRETADO.....	36
3.8.1 RESTRIÇÃO ALIMENTAR.....	36
3.8.2 PROTOCOLO DE ESTRESSE INDUZIDO POR CONTENÇÃO.....	36
3.9 AVALIAÇÃO DO EQUILÍBRIO ENERGÉTICO DURANTE A GRAVIDEZ E A LACTAÇÃO.....	37
3.10 AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE GLICÊMICA E COLETA DE AMOSTRA DURANTE A GRAVIDEZ.....	37
3.11 RESUMO DO DELINIAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 AVALIAÇÃO DO BALANÇO ENERGÉTICO.....	41
4.1.1 CONSUMO ALIMENTAR E PESO CORPORAL BASAL.....	42
4.1.2 CALORIMETRIA INDIRETA E ATIVIDADE LOCOMOTORA VOLUNTÁRIA.....	43
4.1.3 ADIPOSIDADE E CRESCIMENTO LONGITUDINAL.....	44
4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT) E TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT).....	45
4.2.1 RESPOSTA CONTRA-REGULATÓRIA À HIPOGLICEMIA.....	46
4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE À LEPTINA.....	47
4.4 ANÁLISE DA BIOMECÂNICA ÓSSEA.....	48
4.4.1 TESTE BIOMECÂNICO: ENSAIO DE FLEXÃO DE TRÊS PONTOS (EFTP).....	48
4.4.2 CRESCIMENTO ÓSSEO.....	49
4.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DO GHR EM NEURÔNIOS	

NPY/AgRP EM SITUAÇÕES EM QUE O GH É ALTAMENTE SECRETADO.....	50
4.5.1 RESTRIÇÃO ALIMENTAR.....	50
4.5.2 PROTOCOLO DE ESTRESSE INDUZIDO POR CONTENÇÃO.....	51
4.6 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO NO PERÍODO GESTACIONAL.....	52
4.6.1 AVALIAÇÃO DE EQUILÍBRIO ENERGÉTICO DURANTE A GRAVIDEZ E A LACTAÇÃO.....	52
4.6.2 AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE DA GLICOSE DURANTE A GRAVIDEZ.....	53
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO.....	59
7 REFERÊNCIAS.....	60
8 APÊNDICE: PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	66

1 INTRODUÇÃO

O cérebro regula muitos aspectos da homeostase energética, ajustando a ingestão alimentar e o gasto de energia em resposta a uma variedade de sinais nutricionais e outros. Esse processo é altamente complexo e envolve várias regiões cerebrais que vão do córtex ao tronco encefálico, mas o maior interesse se concentra no hipotálamo (Williams *et al.*, 2001).

O hipotálamo é a região essencial do sistema nervoso central (SNC) que entre outras ações, regula a ingestão alimentar e o balanço energético (Woods *et al.*, 1998). Lesões hipotalâmicas descritas na literatura nos forneceram essas evidências. Estudos clássicos mostram que foram realizadas lesões nas regiões lateral ou ventromedial do hipotálamo, o que produzia marcantes efeitos no controle da ingestão alimentar, no peso corporal e na atividade simpática (Nagamine *et al.*, 2003; King, 2006).

A regulação do balanço energético pelo SNC é indispensável para homeostase energética em mamíferos e desregulações dos mecanismos finos de detecção de nutrientes no cérebro podem levar a várias doenças metabólicas, como a obesidade e o diabetes tipo 2 (Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2017).

Como já é sabido, o SNC e mais especificamente o hipotálamo têm um importante papel regulador nos tecidos periféricos na saúde, na doença, e também pode ter um papel na regulação da homeostase óssea via neurônios localizados no núcleo arqueado (ARH) (Dietrich *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2015).

1.1 Núcleo Arqueado do Hipotálamo

O ARH é formado por um conjunto de neurônios localizados próximos à base do terceiro ventrículo. Esta é uma área de integração entre os diversos sinais oriundos da periferia e do tronco cerebral, determinando ações que visam adequar o balanço energético do organismo (Luquet *et al.*, 2005).

Esse núcleo apresenta ao menos dois grupos celulares importantes para a regulação do balanço energético. Um grupo sintetiza o transcrito regulado de cocaína e anfetamina (CART) e a proopiomelancortina (POMC), que é um precursor de vários peptídeos, entre eles o hormônio estimulador de melanócito alfa (α -MSH).

Esses centralmente têm efeitos anorexígenos, ou seja, reduzem a ingestão alimentar (Lenard e Berthoud, 2008). O segundo grupo celular sintetiza a proteína agouti-relacionada (AgRP), que provoca aumento do apetite. A α -MSH e AgRP deflagram suas ações sobre o comportamento alimentar por meio de efeitos antagônicos no receptor 4 da melanocortina (MC4-R), localizados nos neurônios pós-sinápticos. Assim, a α -MSH é um agonista deste receptor, enquanto o AgRP age como um antagonista, impedindo os efeitos anorexígenos do α -MSH. O neuropeptídeo Y (NPY) é co-expresso pelos neurônios AgRP do ARH e também tem potentes propriedades orexígenas (Lenard e Berthoud, 2008).

Os neurônios POMC/CART e NPY/AgRP fazem parte do sistema central das melanocortinas, que é o mais importante e bem descrito neurocircuito que regula a ingestão alimentar e o balanço energético. Esses neurônios se projetam para alvos pós-sinápticos, que geralmente expressam o MC4-R, para influenciar vários aspectos do metabolismo, incluindo células no núcleo paraventricular, área hipotalâmica lateral e hipotálamo ventromedial (Lenard e Berthoud, 2008).

Os hormônios insulina e leptina têm influência sobre a atividade dos neurônios POMC na regulação da homeostase energética. No entanto, estes hormônios parecem ter efeitos distintos nas subpopulações de células POMC no ARH induzindo alterações agudas na atividade dos neurônios hipotalâmicos através dos canais sensíveis ao potássio (K_{ATP}) (Donato, 2012).

A insulina suprime agudamente a produção hepática de glicose através de sua ação direta no hepatócito, assim como seu transporte pela barreira hematoencefálica, via ativação de circuitos neurais do ARH. A ativação do substrato do receptor de insulina (IRS) e fosfatidil-inositol 3-cinase (PI3K) pela insulina, seguida da ativação dos (K_{ATP}) são etapas necessárias para a transmissão de sinais eferentes para o fígado (Pocai *et al.*, 2005). Além da ação da insulina no SNC, a ação do neurotransmissor α -MSH sobre o controle glicêmico já é bem descrito, onde, este se liga aos receptores de melanocortina 3 e 4 (MC3R e MC4R). Além disso, a deficiência de MC4R pode resultar em síndrome metabólica, gerando hiperinsulinemia e hiperglicemia (Huszar *et al.*, 1997).

O SNC é descrito como regulador da homeostase glicêmica, isso porque neurônios do hipotálamo tem grande importância nas mudanças hormonais e de substratos circulantes, processando informações para vias de projeções mantendo a homeostase glicêmica e energética. Nesse sentido a ação de hormônios sobre os neurônios NPY/AgRP também pode afetar a homeostasia glicêmica. Por exemplo, sua ativação aguda provoca resistência à insulina através da diminuição da captação de glicose estimulada pela insulina no tecido adiposo marrom (BAT) (Coppari *et al.*, 2005; Donato, 2012; Steculorum *et al.*, 2016).

Além das ações dos neurônios NPY/AgRP sobre a regulação do controle do metabolismo energético, foi descrito que eles podem desempenhar um importante papel no metabolismo ósseo como mostrado no trabalho do grupo (Kim *et al.*, 2015). Nesse estudo eles mostram que a integridade do circuito neural do AgRP hipotalâmico é um regulador da massa óssea, pois quando esse circuito é prejudicado os animais apresentaram em sua maioria uma redução da massa óssea.

1.2 Hormônios envolvidos na regulação do metabolismo via ARH

1.2.1 Leptina

A leptina é um hormônio peptídico, derivado de adipócitos, produto da expressão do gene *ob*. Esse hormônio apresenta distintas ações, incluindo a influência sobre a homeostase energética e a função neuroendócrina, tendo seu receptor expresso em uma grande variedade de tecidos, embora sua função no hipotálamo seja considerada a mais importante (Pelleymounter *et al.*, 1995; Stanley *et al.*, 2005). Ela envia sinais para o hipotálamo sobre as reservas de energia corporais, a fim de ajustar a ingestão e o balanço energético de maneira apropriada (Frederich *et al.*, 1995). Além dessas ações, foram descritos efeitos neurotróficos, contribuindo para o crescimento de axônios do ARH para outras regiões que controlam o equilíbrio energético (Kamitakahara *et al.*, 2018).

No ARH a leptina tem potentes efeitos sobre os neurônios dessa região, com a função de aumentar neuropeptídeos anorexígenos POMC/CART, conseqüentemente, antagoniza a atividade dos neurônios orexígenos NPY/AgRP (Friedman e Halaas, 1998; Grill, 2006; Morton *et al.*, 2006). Estas evidências fundamentam que os efeitos da leptina sobre o balanço energético são mediados

por neurônios dessa região que suprimem a ingestão alimentar e controlam o gasto energético (Friedman e Halaas, 1998).

1.2.2 Insulina

A insulina é um polipeptídeo produzido pelas células beta pancreáticas nas ilhotas de Langerhans (Porte *et al.*, 2002). Exerce ações metabólicas, neurotróficas, neuromodulatórias e neuroendócrinas, participando da plasticidade sináptica, regulação da ingestão de alimento e peso corporal. Além disso, a resistência à insulina é associada ao sobrepeso e a obesidade, bem como intolerância à glicose e dislipidemias (Pliquett *et al.*, 2006).

No cérebro, a insulina atua suprimindo a atividade dos neurônios produtores de NPY e aumentando a atividade dos neurônios produtores de POMC, sendo, portanto, um hormônio de efeito anorexígeno. Interessantemente, a concentração de glicose diminui antes do início da maioria das refeições, e essa redução é causada pela insulina, sendo um estímulo para a ingestão alimentar (Schwartz *et al.*, 2000).

1.2.3 Grelina

A grelina é um hormônio peptídico formado por 28 aminoácidos e produzido no estômago, foi descoberto em 1999 como um peptídeo liberador de GH, sendo um ligante endógeno natural para o receptor de secretagogo de GH (GHS-R), localizados em grande parte na hipófise, no hipotálamo e em outras regiões cerebrais. Portanto, a ação da grelina sobre os GHS-R produz potente liberação de GH (Poher *et al.*, 2018).

Além do seu papel como estimulador da liberação de GH, é conhecido como o mais potente estimulador regulador do apetite e peso corporal. A grelina reduz a lipólise e promove diretamente o ganho de peso, acúmulo de gordura e adipogênese. Além disso, reduz a secreção de insulina e induz hiperglicemia (Broglio *et al.*, 2001).

Sugere-se que a grelina seja um importante sistema sinalizador entre a periferia (sistema digestório) e o cérebro, com implicações na homeostase energética (Nakazato *et al.*, 2001). Quando injetada em ratos, estimula

intensamente a ingestão alimentar, induzindo o ganho de peso. Isso porque os neurônios NPY/AgRP do ARH expressam o GHS-R e são ativados por concentrações séricas aumentadas de grelina (Chen *et al.*, 2004).

1.3 GH

O GH também é conhecido como somatotropina ou hormônio somatotrófico (Baumann, 1991). Em sua forma principal contém 191 aminoácidos e tem um peso molecular de 22 kilodaltons (kDa) (Møller e Jørgensen, 2009). Ele é secretado de forma pulsátil por somatotrofos da glândula hipófise anterior em resposta aos efeitos estimuladores e inibidores do hormônio liberador de GH (GHRH) e da somatostatina (SST), respectivamente. Esses neurohormônios são secretados por neurônios hipotalâmicos nos vasos porta hipofisários que se conectam à hipófise (Adams *et al.*, 2015).

1.3.1 Secreção, receptores e vias de sinalização.

A secreção de GH tem um padrão pulsátil o que é crítico para sua função fisiológica, essa secreção é regulada por interações complexas, mediadas por influências neurais e periféricas. Estes reguladores da liberação de GH definem a quantidade de GH liberado durante um único evento de secreção e frequência com que esses eventos ocorrem (Steyn *et al.*, 2016).

Em roedores, a secreção do GH é sexualmente dimórfica sendo que machos apresentam altos picos de secreção e um baixo nível entre os picos, já as fêmeas tem níveis basais de GH entre os pulsos mais elevados e mais frequentes, porém de amplitudes mais baixa. (Adams *et al.*, 2015). Em humanos também existe diferenças entre os sexos em termo de regularidade do pulso, amplitude do ritmo diurno, e a magnitude da secreção basal, como mostrado na figura abaixo (Jessup *et al.*, 2003).

Figura.1. As concentrações médias ($\pm$ SE) de GH plasmática em seis homens (painel superior) e cinco mulheres (painel inferior) durante a infusão endovenosa de soro fisiológico normal (símbolos abertos) ou antagonista de GHRH (símbolos fechados) (Jessup SK et al., 2003).

Essa secreção é controlada pela ação de neuromediadores hipotalâmicos. Nesse sentido, enquanto a SST, produzida predominantemente no núcleo periventricular do hipotálamo inibe tal secreção, o GHRH, exerce função estimuladora (Mayo *et al.*, 1996; Moutoussamy *et al.*, 1998).

A atividade de neurônios que expressam SST ou GHRH em vários núcleos hipotalâmicos, como periventricular, ventromedial e núcleo arqueado, essa atividade é regulada, em parte, pela retroalimentação negativa do GH. Há evidências que se o GH age diretamente no cérebro para governar sua própria secreção, então as regiões do cérebro que contém SST e GHRH podem expressar o gene do receptor de GH (GHR) (Ikeno *et al.*, 2009). Esse papel secretor parece desempenhar uma função importante na regulação do crescimento corporal e atividades metabólicas do tecido hepático e adiposo (Ikeda *et al.*, 1998).

Outros fatores que podem influenciar a liberação de GH são os ácidos graxos livres, a leptina e a grelina, os quais devem coordenar a liberação do GH de acordo com a situação metabólica do organismo. Fatores ambientais também são importantes para esse controle como o estado nutricional, atividade física intensa

e o estresse, sendo esses dois últimos potentes reguladores da liberação de GH (Smith *et al.*, 1997; Iwatsubo *et al.*, 1968).

	ESTIMULADORES	INIBIDORES
Neurogênico	Estágio I e IV do sono	Sono REM
	Estresse	
	Drogas α -adrenérgica (clonidina)	
	Antagonista β adrenérgico	Agonista β -adrenérgico
	L-dopa	
Metabólico	Hipoglicemia	Hiperglicemia
	queda de níveis séricos de ácidos graxos	Aumento sérico de níveis de ácidos graxos
	Aminoácidos (arginina)	Obesidade
Hormonais	Hormônio liberador de GH	Somatostatina
	Estrógenos	Hipotiroidismo
	Vasopressina	Altas doses de corticoides
	Hormônio tireoidiano	

Quadro 1. Fatores que afetam a secreção e inibição de GH.

Na literatura, já está bem descrito o efeito do GH sobre o aumento da síntese proteica celular. Esse hormônio estimula o transporte de aminoácidos através da membrana celular, aumenta a formação de RNA mensageiro e dos ribossomos no interior das células. Além disso, o GH possibilita a menor utilização de glicose pelas células para produção de energia, promovendo assim, um efeito poupador de glicose no organismo. Portanto, sugere-se que esse hormônio tem efeito antagônico ao da insulina e pode ser responsável pelo controle de diversas vias metabólicas (Møller e Jørgensen, 2009).

O GH ativa o seu receptor em vários órgãos, promovendo o crescimento somático e tecidual, bem como efeitos diversos no metabolismo (Nyberg, 2000).

A maioria das células NPY no ARH expressa o GHR, sugerindo que os neurônios NPY/AgRP são afetados pelo nível plasmático do GH (Kamegai *et al.*, 1996). A estrutura desse receptor é do tipo I dos receptores de citocinas (Moutoussamy *et al.*, 1998). Tanto em humanos quanto em roedores, o GH e o GHR estão presentes em regiões conhecidas por participarem na regulação do comportamento alimentar, balanço energético e metabolismo da glicose, essas áreas são o hipotálamo, hipocampo e amígdala (Cady *et al.*, 2017; Furigo *et al.*, 2017).

As ações do GH se dão através da ligação ao seu receptor, essa ligação recruta e ativa a proteína Janus quinase 2 (JAK2), se auto-fosforilando, bem como resíduos tirosina do GHR. Essas tirosinas fosforiladas formam regiões de ligação para diversos fatores, incluindo os transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) (Herrington *et al.*, 2000).

A principal via de sinalização que é recrutada pela ativação do complexo GHR/JAK2 é composta pelo fator de transcrição STAT5. No caso, a JAK2 fosforila o STAT5 que se dimeriza e migra para o núcleo, atuando como importante regulador da transcrição de múltiplos genes influenciados pelo GH, incluindo o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (Moutoussamy *et al.*, 1998).

Um dos mais importantes efeitos do GH envolve a ativação da síntese do IGF-1. Esse efeito pode ocorrer em vários tecidos, nos quais o IGF-1 pode ter efeito autócrino ou parácrino. Contudo, o fígado é o principal órgão alvo do GH para produzir e liberar o IGF-1 na corrente sanguínea e, portanto, promover efeitos sistêmicos (Darnell *et al.*, 1994).

1.3.2 Ações fisiológicas do GH

O GH tem ação sobre os tecidos periféricos e está relacionado a múltiplas funções biológicas envolvidas com o crescimento somático, metabolismo e processos celulares, como a divisão e regeneração celular (Lichanska e Waters, 2008; Møller e Jørgensen, 2009). Sua principal função é a manutenção da massa magra corporal, aumentando a síntese proteica, por meio do transporte de

aminoácidos pelas membranas celulares, assim como a transcrição gênica (Møller e Jørgensen, 2009).

A produção ou inibição do GH depende de vários fatores metabólicos, como por exemplo o estado de baixo peso, como a anorexia nervosa, que resulta em níveis elevados de GH circulante, enquanto a obesidade está associada a uma redução na secreção de GH. Já na acromegalia, que é caracterizada pelo excesso de GH, está associada a uma diminuição da massa gorda (Berryman *et al.*, 2004).

O GH também pode atuar sobre o controle glicêmico uma vez que ele é um hormônio que antagoniza os efeitos periféricos da insulina sobre o metabolismo da glicose. A exposição aguda ou crônica ao GH promove resistência à insulina, que se dá em termos do aumento da produção endógena de glicose e diminuição da captação de glicose pelos músculos (Møller e Jørgensen, 2009).

A ação catabólica do GH é oposta aos efeitos induzidos pela insulina, provocando aumento da lipólise e da glicose sanguínea (glicogenólise e gliconeogênese). Em contrapartida, sua ação anabólica é semelhante à da insulina, regulando a excreção de nitrogênio corporal, bem como sua distribuição, e potencializa a ação de fatores de crescimento para a proliferação celular (Møller e Jørgensen, 2009).

Acredita-se que a supressão da atividade do piruvato desidrogenase na forma ativa (PDHa) está subjacente à resistência da insulina induzida por GH, semelhante a observada durante o jejum (Nellemann *et al.*, 2014). Essa mudança na sensibilidade à insulina pode ser mediada diretamente pela ligação do GH ao seu receptor (Rose e Clemmons, 2002).

A deficiência de GH está associada a um risco aumentado de obesidade, resistência à insulina e diabetes, e esses perfis metabólicos adversos e aumento da adiposidade em adultos deficientes de GH apresentam melhoras quando tratados com GH exógeno. Esses tratamentos com GH ou IGF-1 são eficazes na redução de hiperfagia, obesidade, hiperinsulinemia e hipertensão (Tuersunjiang *et al.*, 2017).

Essa deficiência do GH pode ocorrer desde o nascimento ou em adultos devido a anormalidades endócrinas ou mesmo durante o envelhecimento. Os efeitos mais proeminentes da ausência desse hormônio são sobre o crescimento corporal e o metabolismo (Carroll *et al.*, 1998). Periféricamente, essa deficiência está associada à alta incidência de cirrose não alcoólica, gerada pela esteatose hepática, mesmo em condições plasmáticas normais de ácidos graxos livres e em obesidade mínima (Carroll *et al.*, 1998).

Em adultos, as alterações metabólicas da deficiência de GH incluem algumas anormalidades da composição corpórea como aumento da massa gorda, diminuição da massa muscular e diminuição da densidade óssea, alterações na função renal e taxa metabólica basal e na qualidade de vida, podendo causar também diminuição do desempenho cardíaco (Jallad e Bronstein, 2008), como mostrado no Quadro 2.

Deficiência de GH	
Composição corporal	↑ da gordura corporal, ↓ da massa muscular e ↓ do volume líquido extracelular.
Densidade óssea	↑ o risco de osteopenia e osteoporose
Relação com a insulina	Descontrole na secreção de insulina, causando mudanças referentes a sensibilidade da insulina.
Relação com a homeostase glicêmica	Pode afetar a homeostase e levar a alterações do controle glicêmico.
Comprometimento do bem-estar psicológico	↑ o risco de depressão
Função renal	↑ o risco de insuficiência renal
Taxa metabólica basal	↑ a sensação de sono e cansaço
Relação com o Exercício	↑ da sensação de fadiga

Quadro 2. Efeitos da deficiência do GH. Dados obtidos do estudo de (Jallad e Bronstein, 2008).

1.3.3 Ação do GH no sistema nervoso

Os hormônios presentes na circulação sistêmica podem exercer efeitos diferentes no SNC. O acesso de peptídeos ao cérebro é limitado pela barreira hematoencefálica, mas a presença de GH no líquido cefalorraquidiano (LCR) indica que ele é capaz de atravessar essa barreira, porém os mecanismos pelo qual isso ocorre não são totalmente esclarecidos (Burman *et al.*, 1996). Várias regiões do

cérebro podem ser afetadas pelo GH, incluindo estruturas límbicas relacionadas com o bem-estar e áreas hipotalâmicas associadas a regulação da secreção hormonal (Nyberg, 2000).

No SNC, a deficiência de GH está associada a algumas disfunções neurológicas como depressão, problemas de interação social, prejuízo de memória e cognição. Além disso, a redução da secreção de GH que ocorre com a idade parece contribuir para a diminuição das funções cognitivas (Ashpole *et al.*, 2015).

A presença de GHR em áreas específicas do encéfalo de humanos e ratos é forte indício da atuação do GH no SNC (Lai *et al.*, 1991; Zhai *et al.*, 1994). Corroborando com isso, estudos mostraram que a reposição de GH foi capaz de melhorar capacidades psicológicas em pacientes adultos e crianças com deficiência desse hormônio. Outros estudos ainda mostraram que a terapia com GH afeta os níveis de hormônios e neurotransmissores no líquido cefalorraquidiano (Nyberg, 2000).

Nosso grupo de pesquisa realizou recentemente mapeamento detalhado da distribuição de células responsivas ao GH no SNC de camundongos (Furigo *et al.*, 2017). Os resultados desse estudo indicam a presença numerosa de células responsivas ao GH em várias áreas cerebrais, estando em destaque regiões envolvidas com o controle do metabolismo energético e glicêmico. Foi observado grande presença dessas células no ARH, núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), dorsomedial (DMH), área hipotalâmica lateral (LHA), núcleo pré-mamilar ventral (PMv) e núcleo do trato solitário (NTS) (Furigo *et al.*, 2017). Portanto, esse estudo do nosso grupo sugere que a ação do GH é mais ampla e complexa do que havia sido imaginada anteriormente.

A presença de células responsivas ao GH no ARH não garante a presença do GHR em todos os grupamentos neuronais que formam esse núcleo. Contudo, trabalhos anteriores indicaram que a grande maioria dos neurônios NPY/AgRP do ARH apresentam expressão do GHR (Kamegai *et al.*, 1996). Além disso, estudos demonstraram que a deficiência do GHR previne os efeitos orexígenos da grelina (Egecioglu *et al.*, 2006). Sabe-se que os neurônios NPY/AgRP do ARH são os principais alvos da grelina que afetam mecanismos neurais que regulam o balanço energético, homeostase glicêmica e outros efeitos metabólicos (Wang *et al.*, 2014).

Assim, a ampla presença de GHR nessa população neural específica abre a questão se o GH não poderia afetar o metabolismo ao atuar diretamente sobre os neurônios NPY/AgRP do ARH.

Com o objetivo de estudar a ação do GH especificamente em neurônios NPY/AgRP do ARH, utilizamos o sistema Cre-LoxP que permite a manipulação gênica de maneira tecido-específica. Assim, produzimos camundongos que apresentam inativação do GHR exclusivamente em neurônios NPY/AgRP do ARH. Esses animais foram estudados quanto a possíveis alterações no controle do balanço energético, na homeostase glicêmica e durante situações que produzem aumento fisiológico do GH (por exemplo, na restrição alimentar e durante a hipoglicemia).

2 OBJETIVO

Visto a ampla presença do GHR em neurônios NPY/AgRP do ARH e o fato dessas células serem críticas reguladoras do balanço energético e da homeostase glicêmica, o objetivo desse estudo foi investigar a importância da sinalização do GH nessa população de neurônios.

Para tanto, produzimos camundongos deficientes do GHR apenas em neurônios NPY/AgRP e estudamos as possíveis alterações metabólicas apresentadas por esses animais *in vivo*, tanto em condições normais, quanto em desafios em que se observa marcante secreção do GH.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo nº 73/2017).

3.1 Animais

Os animais deficientes do GHR em neurônios NPY/AgRP foram produzidos, utilizando a tecnologia Cre/LoxP, que consiste na combinação de duas mutações gênicas que permitem uma inativação tecido específica de genes de interesse. Assim, utilizamos animais que carregam a sequência para codificar a enzima Cre-recombinase, cuja expressão é controlada por promotores de genes de interesse. Esses animais foram cruzados com os que possuem o gene a ser inativado flanqueado por sítios LoxP. A enzima Cre inativa permanentemente o gene flanqueado pelos sítios LoxP. Assim, o cruzamento de camundongos Cre/LoxP gera animais cujos genes flanqueados são inativados apenas nas células de interesse, ou seja, aquelas que expressam a enzima Cre.

Os dois modelos utilizados para a realização desse estudo foram os camundongos AgRP^{cre} e os GHR^{Flox}. Os camundongos AgRP^{cre} foram importados pela Jackson Laboratory e os camundongos GHR^{Flox} foram obtidos por meio de colaboradores internacionais (Dr. John Kopchick and Dr. Edward List, Ohio University). Os animais foram mantidos no biotério em condições ambientais padrão, com ciclo claro/escuro de 12h/12h, a temperatura de 22-25°C, com acesso a água e ração de roedor padrão.

Utilizamos camundongos que foram produzidos da seguinte forma, os animais AgRP^{cre} e GHR^{Flox} foram cruzados entre si para gerar animais carregando as duas mutações em heterozigose. Posteriormente, uma nova rodada de cruzamentos ocorreu para gerar camundongos homozigotos para a mutação GHR^{Flox}, sendo que alguns carregam o alelo AgRP^{cre} (animais nocautes condicionais) e outros não (animais controle). Camundongos GHR^{Flox/Flox}/AgRP^{cre} foram então cruzados com camundongos GHR^{Flox/Flox}, gerando todos os animais que foram utilizados no presente trabalho.

Figura 2. Modelos experimentais (cruzamento).

3.2 Identificações das mutações gênicas

Quando os animais completaram 28 dias de vida, foram separados de suas progenitoras (desmamados) e um pequeno pedaço da cauda foi coletado para a análise genética, sendo que marcações em suas orelhas puderam identificar os animais dentro de sua caixa. Desse pequeno pedaço da cauda foi extraído o DNA, com o qual foram feitos ciclos de PCR utilizando primers específicos para identificar as mutações AgRP^{cre} e GHR^{Flox} . O produto do PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose onde o peso molecular mensurado em kilodaltons (kDa) das bandas geradas confirmaram se o animal expressava ou não a mutação.

Todos os modelos animais do estudo foram avaliados desde o nascimento até aproximadamente 5 meses de vida. Os cruzamentos dos animais foram realizados de forma a obtermos animais que possuem a deleção de GHR nos neurônios NPY/AgRP, bem como animais sem deleção, que foram os controles dos experimentos. Realizamos experimentos para estudarmos o controle glicêmico e o balanço energético dos animais geneticamente modificados.

3.3 Confirmação da deleção condicional

Para a validação do modelo, utilizamos uma estratégia bem estabelecida em nosso laboratório (Furigo et al., 2017). Fizemos uma injeção i.p. de GH (20 $\mu\text{g/g}$) e após 90 minutos os animais foram perfundidos para análise histológica do encéfalo. Assim pudemos avaliar a capacidade da injeção de GH de induzir fosforilação do STAT5 no encéfalo e especificamente nos neurônios NPY/AgRP.

3.4 Balanço energético

Foi acompanhado a evolução do peso corporal, consumo alimentar e o gasto energético dos animais. Inicialmente os animais foram pesados utilizando balança digital, três vezes na semana, para que pudéssemos verificar a curva de ganho de peso dos animais durante as 4 primeiras semanas de vida. Após o desmame, que ocorreu com 28 dias de vida os animais receberam as marcações nas orelhas e passaram a ser pesados uma vez por semana, durante o período de 12 semanas. Após isso, os camundongos foram individualizados para que pudéssemos avaliar o consumo alimentar, a atividade locomotora, a ingestão de água, e também o consumo de oxigênio (VO_2), volume de gás carbônico produzido (VCO_2) e o coeficiente respiratório, que é a relação entre VCO_2/VO_2 . Para isso, utilizamos o sistema de medida de calorimetria indireta (Oxymax/Clams, Columbus Instruments).

Após a eutanásia, foram coletados os depósitos de gordura dos territórios subcutâneo, retroperitoneal, periuterino e periovariano para estimativa da adiposidade corporal.

3.5 Controle glicêmico

Os animais foram individualizados após 12 semanas de acompanhamento semanal de peso corporal e foram submetidos a testes de tolerância à glicose e resistência à insulina para caracterização da homeostase glicêmica.

3.5.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Foi administrada uma injeção intraperitoneal de solução de glicose (2g/kg) e a glicemia foi aferida utilizando um glicosímetro portátil (Jonhson & Jonhson), por meio da retirada de uma gotícula de sangue da cauda do animal nos tempos 0 que é antes da dose de glicose, e depois de 20, 40, 60, 90 e 120 minutos após a injeção.

3.5.2 Teste de tolerância à insulina (ITT)

Este consiste em protocolo semelhante ao do teste anterior, tendo como diferença que é injetado insulina. Foi usada a dose de 1UI/kg e os tempos de aferição da glicemia também foram os mesmos, no período basal e após a injeção.

3.5.3 Resposta contra regulatória à hipoglicemia (2-deoxi-D-glicose)

Neste paradigma os animais são sujeitos a uma condição que simula hipoglicemia. Para tanto, induzimos essa condição por meio de uma injeção de 2deoxi-D-glicose. Esse teste consiste na injeção intraperitoneal dessa substância, na dose de 500mg/Kg do animal, essa substância é um análogo da glicose e inibe competitivamente pela utilização dela pela célula. Isso simula uma condição de glicopenia, o que faz com que o SNC reaja como se o animal estivesse hipoglicêmico, produzindo uma resposta contra regulatória que poderá ser mensurada por meio do aumento da glicemia do animal. Estas medições foram feitas utilizando glicosímetro (Jonhson & Jonhson), em uma gota de sangue retirada da cauda do animal nos tempos 0 antes da injeção de 2 deoxi-D-glicose e nos tempos 20, 40, 60, 90, 120 e 180 minutos após a injeção.

3.6 Teste de sensibilidade à leptina

Esse teste consiste de 2 etapas. Na primeira, é administrada uma solução controle PBS i.p volume similar à dose de leptina e medidos peso corporal e consumo alimentar dos animais no momento da administração da solução 3 horas antes do ciclo escuro, 4 horas após a injeção (1 hora após o ciclo escuro iniciar), 10 horas e 24 horas após a administração da solução. Após um dia de intervalo, foi realizado o mesmo protocolo, porém tratando os animais com leptina recombinante de camundongo numa dose de 2,5 µg/g do animal.

3.7 Avaliação da biomecânica óssea: Ensaio de flexão de três pontos (EFTP)

Para que fosse possível analisar se haveria alguma alteração nos parâmetros biomecânicos ósseos dos animais deficientes de GHR nos neurônios AgRP, optamos por realizar o teste biomecânico do fêmur e da tíbia através do ensaio de flexão de três pontos (EFTP). O ensaio foi realizado em sistema para teste de materiais Instron, modelo 3344 (Instron Corporation, MA, USA) tendo uma célula de carga máxima de 100 kgf. Tanto os fêmures quanto as tíbias foram coletados, dissecados e mantidos em salina a -20° C até que fossem feitas as análises. O ensaio consiste em apoiar as extremidades dos fêmures e tíbias em dois roletes, com diâmetro de 3 mm, sendo a distância entre eles de 8 mm.

Perpendicularmente ao eixo longitudinal foi aplicada uma força no ponto médio entre as extremidades do osso, no sentido ântero-posterior no fêmur e na tíbia no sentido latero-medial, em uma velocidade constante de 0,5 cm/min até que houvesse a ruptura do osso.

O próprio equipamento possui um software que monitora e registra a força aplicada, onde é possível analisar alguns parâmetros biomecânicos. Entre os pontos analisados estão, força máxima ou carga máxima (N) que corresponde à força máxima à qual o osso é capaz de resistir, rigidez óssea (N/mm) que determina a fase elástica, a resiliência (mJ) que é definida como a capacidade de um material de retornar à sua forma original e a tenacidade (J) que é a capacidade que o osso tem de resistir a uma ruptura.

3.8 Avaliação dos efeitos da deficiência do GHR em neurônios NPY/AgRP em situações fisiológicas em que o GH é altamente secretado

3.8.1 Restrição alimentar

Os animais foram submetidos a um teste de restrição alimentar, no qual foi fornecido o equivalente a 40% do consumo alimentar regular daquele animal durante 1 semana (Zhao *et al.*, 2010). Posteriormente os animais receberam ração *ad libitum* por 5 dias. Foram avaliados o peso corporal e o consumo de ração, bem como a glicemia, diariamente, durante todo esse período.

3.8.2 Protocolo de estresse induzido por contenção

Nesse teste foi utilizado tubos de 50 ml tipo Falcon com tampa e um orifício na extremidade de aproximadamente 6 mm para passagem de ar. Os animais foram introduzidos nos tubos com extremidade anterior voltada para o fundo do tubo. Antes da indução ao estresse os animais foram mantidos em jejum de 23 horas, após esse período foram introduzidos nos tubos, a tampa rosqueada fechada, e o tubo mantido em posição horizontal em cima de um suporte adaptado e nesse ambiente permaneceram por mais 1 hora, completando assim 24 horas de jejum sendo a última hora de contenção e jejum. Após esse período, os animais foram retirados dos tubos e retornaram às suas caixas e a realimentação feita, sendo acompanhados o consumo e o peso nos pontos, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24 e 48 horas.

3.9 Avaliação do equilíbrio energético durante a gravidez e a lactação

Neste teste foram colocados machos selvagens na gaiola da fêmea controle ou AgRP GHR/AGRP KO. A presença do plug copulatório foi verificada diariamente e quando visualizado considerou-se o primeiro dia de gravidez. O consumo e o peso corporal também foram verificados diariamente durante todo o período de gravidez (aproximadamente 19 dias) e lactação (21 dias). As fêmeas que não acasalaram dentro de 3 semanas foram retiradas do estudo. Além disso, o tamanho da ninhada foi padronizado para 5 filhotes no dia do nascimento para garantir demandas metabólicas comparáveis durante a lactação. Por fim, três semanas após o desmame, as fêmeas foram eutanasiadas para determinar a adiposidade através da soma dos pesos dos seguintes depósitos de gordura (subcutânea, uterina, ovariana e retroperitoneal).

3.10 Avaliação da homeostase da glicose e coleta da amostra durante a gravidez

Esse protocolo foi utilizado para avaliar mudanças na homeostase da glicose durante a gravidez. As fêmeas foram submetidas ao GTT e ITT nos dias 13 ou 14 e 16 ou 17 da gravidez, respectivamente. No dia 18 da gravidez, foram eutanasiadas para coletar o soro e o hipotálamo. A adiposidade corporal e o número de embriões também foram avaliados nesses animais.

3.11 Resumo do delineamento experimental

A seguir está descrito um resumo de como foram as análises as quais os animais foram submetidos no período basal de experimento, bem como durante os desafios aos quais foram submetidos, foram divididos em cinco fases.

Na fase 1 (Quadro 3) realizamos o acompanhamento e testes basais, que foram compostos pela pesagem dos animais machos e fêmeas. As pesagens foram realizadas a cada três dias desde o nascimento até os 28 dias de vida, após o desmame passaram a ser pesados uma vez por semana. Quando completaram 12 semanas de vida os animais foram individualizados e então submetidos aos testes basais, GTT, ITT, CLAMS, HTT e sensibilidade à leptina, após os testes foi

realizada a eutanásia, para a retirada dos depósitos de gordura para a aferição da adiposidade.

Quadro 3. Esquema do fluxo de experimentos da fase 1.

GTT (teste de tolerância à glicose), ITT (teste de tolerância à insulina), CLAMS (Comprehensive lab animal monitoring - aparelho de medida de calorimetria indireta), RER (coeficiente respiratório que será medido no CLAMS), VO2 (consumo de oxigênio medido no CLAMS), HTT (teste de tolerância à hipoglicemia induzida por 2 deoxi-D-glicose).

A fase 2 (Quadro 4) foi composta de experimentos que realizados em situações onde o GH é altamente secretado, fizemos o protocolo de restrição alimentar, ofertando 40% do que os animais costumam ingerir por um período de cinco dias, seguido por 2 dias de realimentação, durante todo o teste acompanhamos o peso corporal e a glicemia dos animais, ao final fizemos a eutanásia desse grupo. Em seguida com um novo grupo, o protocolo de estresse induzido por contenção, que foi realizado um jejum de 24hr, sendo a última hora acrescida da contenção física e em seguida foi realizado a realimentação, acompanhamos o consumo alimentar e peso corporal por um período de 48hr. Ao final os animais foram eutanasiados.

Quadro 4. Esquema do fluxo de experimentos da fase 2.

Na fase 3 (Quadro 5) analisamos parâmetros relacionados ao equilíbrio energético durante a gestação e a lactação, visto que esse é um período de grandes alterações fisiológicas e do metabolismo energético. Acompanhamos o

peso corporal e consumo alimentar das fêmeas (mães) durante todo o período de gestação e durante o período de lactação (mães e filhotes), a pesagem foi realizada diariamente. Ao final realizamos a eutanásia e coletamos os depósitos de gordura para verificar a adiposidade. Um novo grupo foi formado para que fosse possível analisar a homeostase glicêmica durante a gestação, fizemos os testes de GTT no 13º e ITT no 15º e a eutanásia no 17º dia gestação.

Quadro 5. Esquema do fluxo de experimentos da fase 3.

Por fim, realizamos o teste biomecânico na fase 4 (Quadro 6), com o ensaio de flexão de três pontos, para verificar se os animais apresentavam alguma alteração relacionada ao metabolismo ósseo.

Quadro 6. Esquema do fluxo de experimentos da fase 4.

EFTP (ensaio de flexão de três pontos); N.A (naso anal)

3.12 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o programa GraphPad Prism 7.0. Os dados foram inicialmente avaliados conforme sua homogeneidade e distribuição normal. Utilizamos o t-test de duas vias não pareado para comparação entre os dados do grupo controle e dos animais deficientes do GHR em neurônios

AgRP/NPY. Foi considerado $p < 0,05$ como resultados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

Para confirmar se a deleção do GHR em neurônios AgRP ocorreu conforme previsto, utilizamos uma validação já bem estabelecida em nosso laboratório, que consiste em injetar GH em camundongos AgRP^{Cre}/tdTomatoreporter, permitindo assim visualizar a expressão de pSTAT5 em neurônios AgRP.

Podemos notar que um grande percentual de neurônios AgRP (que expressam a proteína repórter tdTomato) apresentam marcação nuclear para o pSTAT5, indicando que também são responsivos ao GH (Figura 3). Assim, pudemos confirmar que uma parte significativa desses neurônios é afetada pelos níveis circulantes de GH. Já no caso dos animais nocautes, vimos fosforilação do STAT5 em todos os grupamentos responsivos ao GH, exceto nos neurônios AgRP, devido a deleção condicional do GHR (Figura 4).

Figura 3. Neurônios AgRP são alvos diretos do GH.

Figura 4. Fosforilação do STAT5 em todos os grupamentos responsivos ao GH, exceto nos neurônios AgRP.

4.1 Avaliação do balanço energético

Após confirmarmos a deleção do GHR em neurônios AgRP, iniciamos os testes para avaliação do balanço energético em situações consideradas normais. O primeiro ponto a ser analisado foi o balanço energético. Fizemos o acompanhamento do peso corporal pesando os animais três vezes por semana nos primeiros 28 dias de vida e uma vez nas semanas subsequentes (5 a 10 semanas). Podemos observar no gráfico abaixo que as fêmeas sem o GHR em neurônios AgRP não apresentaram diferença na evolução do peso corporal quando comparadas aos controles (Figura 5).

Figura 5. Acompanhamento do peso corporal de camundongos fêmeas controle e com deleção do GHR em células AgRP. Fêmeas controle (n = 40); Fêmeas GHR/AgRP KO (n = 21).

4.1.1 Consumo alimentar

A fim de traçar um perfil de consumo alimentar e verificar se as fêmeas controles e os animais GHR/AgRP KO apresentavam alguma diferença, acompanhamos diariamente, por um período de quatro dias, onde aferimos o consumo alimentar. Observamos que os grupos não apresentaram diferenças nas médias de consumo alimentar (Figura 6).

Figura 6. Acompanhamento do consumo alimentar (A) de camundongos fêmeas controle e com deleção do GHR em células AgRP. Fêmeas controle (n = 10); Fêmeas GHR/AGRP KO (n = 10).

4.1.2 Calorimetria Indireta e atividade locomotora voluntária

Após traçarmos os perfis de consumo alimentar e peso corporal, submetemos os animais ao teste de calorimetria indireta para verificar o gasto energético e analisar se haveria alguma diferença entre os grupos. Para tanto, foi aferido o consumo de oxigênio (VO_2), o coeficiente respiratório (RER) que é a relação entre VCO_2/VO_2 e a atividade locomotora, com esses parâmetros é possível prever o gasto energético dos animais. As fêmeas GHR/AgRP KO e as controles não apresentaram diferenças nos parâmetros analisados, como o VO_2 (Figura 7A), o RER (Figura 7B) e atividade locomotora (Figura 7C) em ambos os períodos escuro (ativo) e claro (repouso), o que indica que os grupos não apresentam diferença no gasto energético e no substrato usado para gerar energia em situação basal.

Figura 7. Monitoramento metabólico em sistema OXYMAX/CLAMS. Consumo oxigênio VO₂ (A); Coeficiente respiratório RER (B) Atividade locomotora (C). Fêmeas controle (n = 8); Fêmeas GHR/AGRP KO (n = 8).

4.1.3 Adiposidade e crescimento longitudinal

Após a eutanásia, foi determinada a adiposidade, por meio da coleta dos depósitos de gordura dos territórios subcutâneo, retroperitoneal, periuterino e periovariano, bem como o crescimento longitudinal, através do comprimento naso-anal das fêmeas GHR/AgRP KO e controle. Observa-se que os grupos possuem a adiposidade e comprimento similar (Figura 8-B).

Figura 8. Aferição da adiposidade (A), SC (subcutâneo), PU (periuterino), PO (periovariano) e RP (retroperitoneal) e crescimento longitudinal (B) realizada na eutanásia dos animais controle e com deleção do GHR em células AgRP. Fêmeas controle (n = 10); Fêmeas AgRP GHR/AGRP KO (n = 10).

4.2 Teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina

Após o monitoramento metabólico, passamos a avaliar a homeostase glicêmica. Realizamos os testes de tolerância à glicose e à insulina. No teste de tolerância a glicose, não foram observadas diferenças entre os grupos nos tempos 20, 40, 60, 90 e 120 min (Figura 9A), bem como na área sob a curva. O mesmo foi observado no teste de sensibilidade à insulina e na área sob a curva (Figura 9B).

Figura 9. Homeostase glicêmica – Teste de tolerância à glicose (GTT) (A) e área sob a curva; teste de resistência à insulina (ITT) (B) e área sob a curva. Fêmeas controle (n = 10); Fêmeas AgRP GHR/AGRP KO (n = 10).

4.2.1 Resposta contra regulatória à hipoglicemia

Para finalizar essa etapa de acompanhamento dos animais, simulamos uma condição de glicopenia, através do teste de 2-deoxi-D-glicose, o que faz com que o SNC reaja como se o animal estivesse hipoglicêmico, produzindo uma resposta contra regulatória que poderá ser mensurada por meio do aumento da glicemia. Pudemos verificar que as fêmeas GHR/AgRP KO apresentaram resposta contra-regulatória prejudicada no tempo 20 min do teste, porém essa diferença foi perdida nos tempos subsequentes de 40, 60, 90, 120 e 180 min (Figura 10). A área sob a curva da glicemia durante esse teste não apresentou diferença.

Figura 10. Teste 2-deoxi-D-glicose e área sob à curva - Para verificar a resposta contra regulatória a hipoglicemia. Fêmeas controle (n = 10); Fêmeas GHR/AGRP KO (n = 10).

4.3 Teste de sensibilidade à leptina.

Também foi realizado o teste para verificar a sensibilidade à leptina. O teste avalia a resposta aguda desse hormônio e foram realizadas mensurações do peso corporal e consumo alimentar em três pontos diferentes após injeções subcutânea do hormônio ou PBS. A variação dos parâmetros analisados refere-se à diferença dos valores obtidos 4 h, 14 h e 24 h após a administração da leptina em comparação aos mesmos valores quando foi feita a injeção de PBS. Não houve diferença significativa entre os grupos no peso corporal (Figura 11A) e no consumo alimentar (Figura 11B), o que indica que as fêmeas GHR/AgRP KO não apresentaram resistência à leptina.

Figura 11. Teste de sensibilidade à leptina. Peso corporal (A) e consumo de ração (B). Fêmeas controle (n = 10); Fêmeas AgRP GHR/AGRP KO (n = 10).

4.4 Análise da biomecânica óssea

4.4.1 Teste Biomecânico: Ensaio de flexão de três pontos (EFTP)

Após analisar os parâmetros relacionados ao metabolismo energético, partimos para análise de parâmetros biomecânicos ósseo, através do ensaio de flexão de três pontos (EFTP), pois como descrito na literatura, os neurônios AgRP parecem ter um papel regulador significativo no metabolismo ósseo (Kim *et al.*, 2015). Nesse teste, os animais controles e GHR AgRP KO responderam de forma similar nos parâmetros relacionados a força F2 (N), rigidez (N/mm), resiliência (mJ) dos fêmures (Figura 12A). Os grupos apresentaram diferença significativa na tenacidade (mJ) do fêmur, mostrando que o fêmur dos animais GHR AgRP KO é mais resistente à fratura, porém esse resultado não se repetiu no que diz respeito às tíbias (Figura 12B).

Figura 12. Teste biomecânico. Ensaio de flexão de três pontos (EFTP). No gráfico (A) avaliamos força (F2), rigidez, resiliência e tenacidade dos fêmures. No gráfico (B) força, rigidez, resiliência e tenacidade das tíbias. GHR/AGRP KO (n = 8); Controles (n = 5).

4.4.2 Crescimento ósseo

Por fim, analisamos os tamanhos dos fêmures e das tíbias dos animais para verificar se a deficiência do receptor de GH poderia de alguma forma afetar o tamanho desses ossos. Tanto os animais controles como os deficientes do receptor de GH não apresentaram diferenças no tamanho do fêmur (Figura 13A) e da tíbia (Figura 13B).

Figura 13. Crescimento ósseo: Figura (A) tamanho fêmur (cm). Figura (B) tamanho da tíbia (cm) GHR/AgRP KO (n = 8); Controles (n = 5).

4.5 Avaliação dos efeitos da deficiência do GHR em neurônios NPY/AgRP em situações fisiológicas em que o GH é altamente secretado

4.5.1 Restrição alimentar

No teste de restrição alimentar, foi fornecido o equivalente a 40% do consumo alimentar normal. As fêmeas GHR/AgRP KO perderam mais peso que as controles, principalmente nos três últimos dias de restrição (Figura 14A). Em relação à adiposidade, as fêmeas deficientes de GHR apresentaram menor quantidade de gordura, tendo uma diferença significativa no depósito periuterino (Figura 14B). O grupo GHR/AgRP KO teve uma maior dificuldade em sustentar a glicemia durante o teste, especialmente no sexto dia de restrição em comparação ao grupo controle. Já na recuperação, não houve diferença entre os grupos (Figura 14C). A área sob a curva da glicemia também não apresentou diferença.

Figura 14. Restrição alimentar (R.A) e Realimentação (R) – Peso corporal (A); Adiposidade (B) onde subcutâneo (SC), periuterina (PU), periovariana (PO) e retroperitoneal (RP); Glicemia (C) e área sob à curva (D). Fêmeas controle (n = 10); Fêmeas GHR/AgRP KO (n = 10).

4.5.2 Protocolo de estresse induzido por contenção

Para finalizar a avaliação da deficiência de GHR em neurônios NPY/AgRP em situações em que o GH é altamente secretado, realizamos um protocolo para induzir o estresse através de contenção física. Nesse teste, acompanhamos o peso corporal e o consumo alimentar 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24 e 48 horas após o estresse de contenção física, em animais previamente submetidos ao jejum de vinte e quatro horas. Nesse parâmetro não houve diferença referente ao peso corporal dos animais (Figura 15A). O estresse de contenção reduziu o consumo alimentar a partir de 8 horas de realimentação (Figura 15B). Contudo, as fêmeas GHR/AgRP KO e as controles não tiveram diferença.

Figura 15. Protocolo de estresse induzido por contenção. Peso corporal (A) e Consumo alimentar (B): Fêmeas controle (n = 5), fêmeas controle contenção (n = 5), fêmeas GHR/AgRP KO (n = 5) e fêmeas GHR/AGRP KO contenção (n = 5).

4.6 Avaliação do metabolismo no período gestacional

4.6.1 Avaliação do equilíbrio energético durante a gravidez e a lactação

O período gestacional é de grande desafio metabólico para o organismo, pois há aumento da ingestão alimentar e balanço energético positivo, fazendo com que ocorra aumento de peso e depósito de gordura corporal (Scholl *et al.*, 1995). A fim de complementar os dados e verificar se a falta de GHR pode de alguma forma interferir nessa situação avaliamos o equilíbrio energético, acompanhando o peso

corporal e o consumo alimentar, durante todo o período de gestação e lactação de camundongos fêmeas GHR/AgRP KO e controle. Foi acompanhado também o peso dos filhotes durante o período de lactação. Pode-se observar que o peso corporal é similar entre os grupos (Figura 16A), assim como o peso da prole (Figura 16B) e consumo alimentar (Figura 16C). A adiposidade também não apresentou diferença entre as fêmeas controle e as GHR AgRP KO (Figura 16D).

Figura 16. Equilíbrio energético durante a gravidez e lactação. Peso corporal (A) e peso filhotes (B) Consumo alimentar (C) e adiposidade (D) onde subcutâneo (SC), periuterina (PU), periovariana (PO) e retroperitoneal (RP). GHR/AGRP KO (n = 10); Controles (n = 8).

4.6.2 Avaliação da homeostase da glicose durante a gravidez.

Durante a gestação ocorre um quadro de alterações hormonais, incluindo uma resistência à insulina transitória (Sonagra *et al.*, 2014). Portanto, para investigar se a deficiência do GHR pode alterar a modulação central da sensibilidade a esse hormônio ou prejudicar a homeostase glicêmica, submetemos as fêmeas grávidas aos testes de GTT e ITT. No teste de tolerância à glicose (Figura 17A) que foi realizado no 13º/14º de gestação, assim como a sensibilidade à insulina (Figura 17B) que foi realizado no dia 15º/16º de gestação, as fêmeas GHR/AgRP KO e as controles responderam de forma similar.

Figura 17. Homeostase da glicose durante a gravidez. Teste de tolerância à glicose (GTT) (A) e área sob a curva. Teste de tolerância à insulina (ITT) (B). GHR/AGRP KO (n = 3); Controles (n = 5).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo compreender qual é a importância do GH no metabolismo via neurônios NPY/AgRP em camundongos fêmeas, visto que essa população de neurônios é conhecida por afetar mecanismos neurais que regulam o balanço energético, homeostase glicêmica e outros parâmetros metabólicos (Wang *et al.*, 2014). Assim, a ampla presença de GHR nessa população neural, nos levou a questionar qual é a ação do GH no metabolismo via neurônios NPY/AgRP.

Para que isso fosse possível, geramos animais deficientes de GHR exclusivamente em neurônios NPY/AgRP do ARH. Essa área é conhecida por controlar o metabolismo e ingestão alimentar e está sob influência de diversos hormônios, inclusive o GH (Furigo *et al.*, 2017). A ativação dos neurônios NPY/AgRP induz não somente o aumento da ingestão alimentar, mas também a resistência à insulina e ainda parecem ter um papel regulador no metabolismo ósseo (Kim *et al.*, 2015; Steculorum *et al.*, 2016).

Realizamos testes *in vivo*, começando pela avaliação do balanço energético frente a situações onde os animais não estavam expostos a nenhum tipo de estresse. Os grupos GHR/AgRP KO e controle não mostraram alterações significantes no crescimento ou no metabolismo basal. Essa falta de diferença entre os grupos é interessante, pois estudos mostraram que os NPY/AgRP é um importante regulador da secreção de GH, e em consequência afetariam o crescimento somático (Minami *et al.*, 1998; Steyn *et al.*, 2016). Assim, acreditamos que outras populações de neurônios possam estar envolvidas com esse controle ou que o eixo somatotrófico não é afetado pela falta de sinalização de GH nessa população de neurônios.

A fim de verificar se a ablação do GHR em neurônios NPY/AgRP seria capaz de afetar o consumo alimentar das fêmeas, fizemos o acompanhamento diário de consumo, tanto nos animais sem o receptor de GH quanto os animais controle apresentaram o mesmo perfil de consumo. Esse resultado sugere que em situação basal, a ausência de receptor de GH em neurônios AgRP não alterou o consumo alimentar, mesmo essa população neuronal sendo descrita como os maiores responsáveis pelo comportamento alimentar (Steculorum *et al.*, 2016). Como

descrito no trabalho de (Porte *et al.*, 2002) a ação da insulina e da leptina sobre os neurônios AgRP modulam o consumo alimentar, o que não vimos nos nossos resultados, indicando que a ação do GH nesse aspecto, em fêmeas, pode não ter tal efeito. No entanto, foi demonstrado por nosso grupo que a injeção intracerebroventricular de GH aumentou o consumo alimentar em 24h de machos controle demonstrando um efeito orexígeno do GH em neurônios AgRP, em machos (Furigo *et al.*, 2019).

Seguimos para o teste de tolerância à glicose e à insulina, pois a homeostase glicêmica é um dos fatores que poderiam ser afetados pela falta de GH atuando em neurônios do ARH (Donato, 2012). Os grupos responderam de forma similar não apresentando alterações na tolerância à glicose ou na sensibilidade à insulina, mostrando que o GH via essa população de neurônios não é capaz de afetar a homeostase glicêmica em situação basal, mesmo sendo descrito como importante regulador da glicose, antagonizando os efeitos da insulina (Møller e Jørgensen, 2009; Steculorum *et al.*, 2016). Assim, o GH deve agir em outros tecidos ou populações neuronais para regular o balanço energético.

Avaliamos em seguida a sensibilidade à leptina, uma vez que alguns estudos indicam que esse hormônio pode modular a secreção de GH, seus receptores estão amplamente distribuídos no ARH e que neurônios que expressam o receptor de leptina, também expressam o de GH (Cady *et al.*, 2017). Com essa informação, verificamos se a deleção do GHR poderia de alguma forma afetar a sensibilidade à leptina que por consequência, afetaria a secreção de GH e o consumo alimentar, visto que a leptina tem um papel inibidor dos neurônios NPY/AgRP (Friedman e Halaas, 1998). Porém, nossos resultados apontam que mesmo sem o receptor de GH, os grupos não apresentaram resistência à leptina.

Para analisar se a falta de GHR em neurônios NPY/AgRP poderia interferir na homeostase glicêmica em uma suposta deficiência de nutrientes, submetemos os animais GHR/AgRP KO e os controles ao teste de 2-deoxi-D-glicose (2DG), causando glicoprivação (Garfield *et al.*, 2014). Observamos que a resposta contra regulatória gerada pela 2DG foi menor nos animais GHR/AgRP KO fêmeas. Uma menor indução da ingestão alimentar pela 2DG também foi observada nos machos no trabalho recentemente publicado (Furigo *et al.*, 2019). As fêmeas apresentaram

uma diferença significativa no ponto 20 min do teste, embora essa diferença foi perdida nos pontos seguintes. Esse resultado indica que outros mecanismos regulatórios, podem ter compensado a diferença observada no início do teste.

Vários fatores podem alterar a liberação de GH entre eles, hipoglicemia, atividade física intensa, estresse e estado nutricional (Iwatsubo *et al.*, 1968). A perda de peso por exemplo, desencadeia importantes respostas metabólicas e o estado nutricional também é descrito como um fator importante para a regulação da secreção desse hormônio (Berryman *et al.*, 2004). Visto essas informações realizamos o protocolo de restrição alimentar, pois estudos demonstraram que esse protocolo é capaz de induzir grandes modulações dos níveis plasmáticos de GH (Zhao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012). Nossos resultados mostraram que fêmeas com a deleção de GHR apresentaram glicemia menor que fêmeas controle, quando submetidas à restrição alimentar, evidenciado no sexto dia de restrição, além de perderem peso de forma mais pronunciada. Dados semelhantes foram obtidos por nosso grupo em machos com a mesma deleção, os quais apresentaram, além de maior queda na glicemia, um gasto energético maior que os animais controles (Furigo *et al.*, 2019). Dessa maneira, sugerimos que na situação de restrição calórica, o GH deve ser importante para controlar o gasto energético, modulando uma economia de energia via neurônios AgRP, para garantir a sobrevivência do organismo nessa situação de estresse. Mesmo em machos a resposta sendo mais pronunciada, observamos que as fêmeas tiveram uma queda maior de glicemia, nos levando a acreditar que essas diferenças podem ser devido ao ARH, ser parte no SNC que apresenta diferenças sexualmente dimórficas.

Outro protocolo utilizado para estimular o aumento de liberação de GH foi o estresse induzido por contenção (Gnacinska, 1993). Acompanhamos o peso corporal e o consumo alimentar pelas 48 horas seguintes ao teste e os resultados mostraram que tanto o grupo GHR/AgRP KO quanto o controle não apresentaram diferença no peso corporal. Já em relação ao consumo alimentar, os animais tiveram uma redução a partir de 8 horas da realimentação, isso aconteceu de uma forma geral, independente da mutação. Indicando que talvez esse protocolo em específico, não tenha sido o suficiente para aumentar a secreção de GH e consequentemente desencadear alguma resposta metabólica.

O período gestacional é um grande desafio metabólico. Considerando isso geramos um grupo para avaliar o equilíbrio energético durante a gestação e lactação, pois nesse período há um aumento da ingestão alimentar e a presença de um balanço energético positivo (Scholl *et al.*, 1995). Acompanhamos o consumo alimentar e o peso corporal das mães durante a gestação e também dos filhotes na lactação, os grupos responderam de forma similar. Esse resultado indica que o GH, mesmo sendo um dos hormônios altamente produzidos na gestação, não causa alterações metabólicas via neurônios NPY/AgRP. Assim, as adaptações metabólicas nessa fase devem ser desencadeadas por outros hormônios, como por exemplo a prolactina que possui estrutura muito similar ao GH e ativa a mesma via de sinalização (Ladyman *et al.*, 2017).

Um segundo grupo foi gerado para avaliar a homeostase glicêmica durante o período de gestação. A literatura apresenta a gestação como um período onde ocorre um quadro de alterações hormonais, grávidas apresentam uma transitória resistência à insulina (Sonagra *et al.*, 2014). Realizamos o teste de tolerância à glicose e à insulina durante a gestação e tanto o grupo GHR/AgRP KO quanto as fêmeas controles responderam de forma similar, mostrando que o GH não parece afetar a homeostase da glicemia via neurônios NPY/AgRP.

O GH é um hormônio importante para controle do crescimento e mineração óssea e os neurônios NPY/AgRP vem sendo descritos por terem um importante papel regulador no metabolismo ósseo (Xue *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015). Frente a essa informação, realizamos o teste biomecânico para analisar alguns parâmetros, os grupos apresentaram uma diferença significativa na tenacidade do fêmur dos animais GHR/AgRP KO, o que indica que o fêmur dos animais desse grupo necessita de mais força até que se rompam, sendo então mais resistentes a fratura. Entretanto, não se observa diferença em nenhum outro parâmetro e nem ao que se diz respeito às tíbias. O crescimento ósseo foi verificado através das medidas dos tamanhos dos fêmures e tíbias, os resultados dos dois grupos foram similares. Isso mostra que o GH não parece ter um impacto ao que se refere a força, resiliência, rigidez, tenacidade e crescimento ósseo, via neurônios AgRP ou outros fatores agem sobre esses neurônios para a formação óssea.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o GH parece não exercer ações importantes via neurônios NPY/AgRP no controle do metabolismo como por exemplo, na homeostase glicêmica, no crescimento somático, na adiposidade, no gasto energético, na formação e crescimento ósseo e no consumo alimentar em situações basais, quando as fêmeas não estão expostas ao estresse. Em situações agudas como, o estresse de contenção ou situações compreendidas como estresse fisiológico como a gestação, o GH também não gera respostas metabólicas via essa população de neurônios. Contudo, nossos resultados mostram um novo papel fisiológico para o GH, o de sinalizar ao cérebro em resposta a um grande estresse como o da privação alimentar, de que é necessário desencadear respostas adaptativas para que o organismo conserve energia, o que é essencial para a sobrevivência e no nosso trabalho pudemos ver que essa resposta é perdida quando inativamos o receptor desse hormônio nessa população neural.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. M. et al. Somatostatin is essential for the sexual dimorphism of GH secretion, corticosteroid-binding globulin production, and corticosterone levels in mice. **Endocrinology**, v. 156, n. 3, p. 1052-65, Mar 2015.
- ASHPOLE, N. M. et al. Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging brain. **Exp Gerontol**, v. 68, p. 76-81, Aug 2015.
- BAUMANN, G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. **Endocr Rev**, v. 12, n. 4, p. 424-49, Nov 1991.
- BERRYMAN, D. E. et al. Comparing adiposity profiles in three mouse models with altered GH signaling. **Growth Horm IGF Res**, v. 14, n. 4, p. 309-18, Aug 2004.
- BORON; WF; EL., B. **Fisiologia Médica**. 2015.
- BROGLIO, F. et al. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 10, p. 5083-6, Oct 2001.
- BURMAN, P. et al. Growth hormone treatment affects brain neurotransmitters and thyroxine [see comment]. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 44, n. 3, p. 319-24, Mar 1996.
- CADY, G. et al. Hypothalamic growth hormone receptor (GHR) controls hepatic glucose production in nutrient-sensing leptin receptor (LepRb) expressing neurons. **Mol Metab**, v. 6, n. 5, p. 393-405, May 2017.
- CARROLL, P. V. et al. Growth hormone deficiency in adulthood and the effects of growth hormone replacement: a review. Growth Hormone Research Society Scientific Committee. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, n. 2, p. 382-95, Feb 1998.
- CHEN, H. Y. et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. **Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 260712, Jun 2004.
- COPPARI, R. et al. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. **Cell Metab**, v. 1, n. 1, p. 63-72, Jan 2005.
- CRUCIANI-GUGLIELMACCI, C. et al. Brain Ceramide Metabolism in the Control of Energy Balance. **Front Physiol**, v. 8, p. 787, 2017.
- DARNELL, J. E.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, v. 264, n. 5164, p. 1415-21, Jun 1994.
- DIETRICH, M. O. et al. AgRP neurons mediate Sirt1's action on the melanocortin system and energy balance: roles for Sirt1 in neuronal firing and synaptic plasticity. **J Neurosci**, v. 30, n. 35, p. 11815-25, Sep 2010.

DONATO, J. The central nervous system as a promising target to treat diabetes mellitus. **Curr Top Med Chem**, v. 12, n. 19, p. 2070-81, 2012.

DURAN-ORTIZ, S.; NOBOA, V.; KOPCHICK, J. J. Disruption of the GH receptor gene in adult mice and in insulin sensitive tissues. **Growth Horm IGF Res**, v. 38, p. 3-7, 02 2018.

EGECIOGLU, E. et al. Growth hormone receptor deficiency results in blunted ghrelin feeding response, obesity, and hypolipidemia in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 290, n. 2, p. E317-25, Feb 2006.

FREDERICH, R. C. et al. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nat Med**, v. 1, n. 12, p. 1311-4, Dec 1995.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763-70, Oct 1998.

FURIGO, I. C. et al. Distribution of growth hormone-responsive cells in the mouse brain. **Brain Struct Funct**, v. 222, n. 1, p. 341-363, 01 2017.

FURIGO, I. C. et al. Growth hormone regulates neuroendocrine responses to weight loss via AgRP neurons. **Nat Commun**, v. 10, n. 1, p. 662, Feb 2019.

GARFIELD, A. S. et al. A parabrachial-hypothalamic cholecystokinin neurocircuit controls counterregulatory responses to hypoglycemia. **Cell Metab**, v. 20, n. 6, p. 1030-7, Dec 2014.

GNACINSKA, G. Growth hormone and prolactin levels in stress-induced food intake dysregulation. **Rom J Endocrinol**, v. 31, n. 3-4, p. 107-13, 1993.

GRATTAN, D. R. et al. Pregnancy-induced adaptation in the neuroendocrine control of prolactin secretion. **J Neuroendocrinol**, v. 20, n. 4, p. 497-507, Apr 2008.

GRILL, H. J. Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14 Suppl 5, p. 216S221S, Aug 2006.

HERRINGTON, J. et al. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. **Oncogene**, v. 19, n. 21, p. 2585-97, May 2000.

HOUSSAY, B. The hypophysis and metabolism. **N Engl J Med**, v. 214:, p. 961–985, 1936.

HUSZAR, D. et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. **Cell**, v. 88, n. 1, p. 131-41, Jan 1997.

IKEDA, A. et al. Obesity and insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. **Endocrinology**, v. 139, n. 7, p. 3057-63, Jul 1998.

IKENO, Y. et al. Reduced incidence and delayed occurrence of fatal neoplastic diseases in growth hormone receptor/binding protein knockout mice. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 64, n. 5, p. 522-9, May 2009.

IWATSUBO, H.; MIYAI, K.; OKADA, Y. [Effect of stress and exercise on the secretion of growth hormone]. **Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi**, v. 44, n. 9, p. 987-92, Dec 1968.

JALLAD, R. S.; BRONSTEIN, M. D. [Growth hormone deficiency in adulthood: how to diagnose and when to treat?]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 5, p. 861-71, Jul 2008.

JESSUP, S. K. et al. Sexual dimorphism of growth hormone (GH) regulation in humans: endogenous GH-releasing hormone maintains basal GH in women but not in men. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 10, p. 4776-80, Oct 2003.

KAMEGAI, J. et al. Growth hormone receptor gene is expressed in neuropeptide Y neurons in hypothalamic arcuate nucleus of rats. **Endocrinology**, v. 137, n. 5, p. 2109-12, May 1996.

KAMITAKAHARA, A. et al. A critical period for the trophic actions of leptin on AgRP neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. **J Comp Neurol**, v. 526, n. 1, p. 133-145, Jan 2018.

KIM, J. G. et al. AgRP Neurons Regulate Bone Mass. **Cell Rep**, v. 13, n. 1, p. 814, Oct 2015.

KING, B. M. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. **Physiol Behav**, v. 87, n. 2, p. 221-44, Feb 2006.

LAI, Z. N. et al. Characterization of putative growth hormone receptors in human choroid plexus. **Brain Res**, v. 546, n. 2, p. 222-6, Apr 1991.

LENARD, N. R.; BERTHOUD, H. R. Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16 Suppl 3, p. S11-22, Dec 2008.

LI, R. L. et al. Profound hypoglycemia in starved, ghrelin-deficient mice is caused by decreased gluconeogenesis and reversed by lactate or fatty acids. **J Biol Chem**, v. 287, n. 22, p. 17942-50, May 2012.

LICHANSKA, A. M.; WATERS, M. J. New insights into growth hormone receptor function and clinical implications. **Horm Res**, v. 69, n. 3, p. 138-45, 2008.

LIST, E. O. et al. Endocrine parameters and phenotypes of the growth hormone receptor gene disrupted (GHR^{-/-}) mouse. **Endocr Rev**, v. 32, n. 3, p. 356-86, Jun 2011.

LUQUET, S. et al. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 683-5, Oct 2005

MAYO, K. E. et al. The growth-hormone-releasing hormone receptor: signal transduction, gene expression, and physiological function in growth regulation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 805, p. 184-203, Dec 1996.

MINAMI, S. et al. Growth hormone inhibits its own secretion by acting on the hypothalamus through its receptors on neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus and somatostatin neurons in the periventricular nucleus. **Endocr J**, v. 45 Suppl, p. S19-26, Apr 1998.

MØLLER, N.; JØRGENSEN, J. O. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. **Endocr Rev**, v. 30, n. 2, p. 152-77, Apr 2009.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289-95, Sep 2006.

MOUTOUSSAMY, S.; KELLY, P. A.; FINIDORI, J. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. **Eur J Biochem**, v. 255, n. 1, p. 1-11, Jul 1998.

NAGAMINE, I. et al. Changes in single unit activity in the lateral hypothalamic area of goats during feeding. **J Anim Sci**, v. 81, n. 2, p. 529-36, Feb 2003.

NAKAZATO, M. et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 194-8, Jan 2001.

NELLEMAN, B. et al. Growth hormone-induced insulin resistance in human subjects involves reduced pyruvate dehydrogenase activity. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 210, n. 2, p. 392-402, Feb 2014.

NYBERG, F. Growth hormone in the brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. **Front Neuroendocrinol**, v. 21, n. 4, p. 330-48, Oct 2000.

PELLEYMOUNTER, M. A. et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 540-3, Jul 1995.

PLIQUETT, R. U. et al. The effects of insulin on the central nervous system-focus on appetite regulation. **Horm Metab Res**, v. 38, n. 7, p. 442-6, Jul 2006.

POCAI, A. et al. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. **Nature**, v. 434, n. 7036, p. 1026-31, Apr 2005

POHER, A. L.; TSCHÖP, M. H.; MÜLLER, T. D. Ghrelin regulation of glucose metabolism. **Peptides**, v. 100, p. 236-242, Feb 2018.

PORTE, D.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Leptin and insulin action in the central nervous system. **Nutr Rev**, v. 60, n. 10 Pt 2, p. S20-9; discussion S6884, 85-7, Oct 2002.

ROGERO; M M, M. R., TIRAPEGUI J. **Nutrição: Fundamentos e Aspectos Atuais**. 2005. 306,307.

ROSE, D. R.; CLEMMONS, D. R. Growth hormone receptor antagonist improves insulin resistance in acromegaly. **Growth Horm IGF Res**, v. 12, n. 6, p. 418-24, Dec 2002.

SCHOLL, T. O. et al. Gestational weight gain, pregnancy outcome, and postpartum weight retention. **Obstet Gynecol**, v. 86, n. 3, p. 423-7, Sep 1995.

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

SMITH, R. G. et al. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. **Endocr Rev**, v. 18, n. 5, p. 621-45, Oct 1997.

SONAGRA, A. D. et al. Normal pregnancy- a state of insulin resistance. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 11, p. CC01-3, Nov 2014.

STANLEY, S. et al. Hormonal regulation of food intake. **Physiol Rev**, v. 85, n. 4, p. 1131-58, Oct 2005.

STECULORUM, S. M. et al. AgRP Neurons Control Systemic Insulin Sensitivity via Myostatin Expression in Brown Adipose Tissue. **Cell**, v. 165, n. 1, p. 125138, Mar 2016.

STEYN, F. J. et al. Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion. **Compr Physiol**, v. 6, n. 2, p. 687-735, Mar 2016.

TUERSUNJIANG, N. et al. Maternal obesity programs reduced leptin signaling in the pituitary and altered GH/IGF1 axis function leading to increased adiposity in adult sheep offspring. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e 0181795, 2017.

WALLENIIUS, K. et al. Liver-derived IGF-I regulates GH secretion at the pituitary level in mice. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4762-70, Nov 2001.

WANG, Q. et al. Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. **Mol Metab**, v. 3, n. 1, p. 64-72, Feb 2014.

WANG, Q. et al. Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. **Mol Metab**, v. 3, n. 1, p. 64-72, Feb 2014.

WILLIAMS, G. et al. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. **Physiol Behav**, v. 74, n. 4-5, p. 683-701, 2001 Nov-Dec 2001.

WOODS, S. C. et al. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. **Science**, v. 280, n. 5368, p. 1378-83, May 1998.

XUE, P. et al. Effects of growth hormone replacement therapy on bone mineral density in growth hormone deficient adults: a meta-analysis. **Int J Endocrinol**, v. 2013, p. 216107, 2013.

ZHAI, Q. et al. Characterization of growth hormone binding sites in rat brain. **Acta Paediatr Suppl**, v. 406, p. 92-5, Dec 1994.

ZHAO, T. J. et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 16, p. 7467-72, Apr 2010.

8 APÊNDICE: PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Furigo IC¹, Teixeira PDS¹, de Souza GO¹, Couto GCL¹, Romero GG^{1,2}, Perelló M², Frazão R³, Elias LL⁴, Metzger M¹, List EO⁵, Kopchick JJ⁵, J D Jr⁶. Growth hormone regulates neuroendocrine responses to weight loss via AgRP neurons. ***Nature Communications*** volume 10, **Article number: 662 (2019)**

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08607-1>

OPEN

Growth hormone regulates neuroendocrine responses to weight loss via AgRP neurons

Isadora C. Furigo¹, Priscila D.S. Teixeira¹, Gabriel O. de Souza¹, Gisele C.L. Couto¹,
Guadalupe García Romero^{1,2}, Mario Perelló², Renata Frazão², Lucila L. Elias³, Martin Metzger¹, Edward O. List⁴,
John J. Kopchick⁵ & J. Donato Jr¹

Weight loss triggers important metabolic responses to conserve energy, especially via the fall in leptin levels. Consequently, weight loss becomes increasingly difficult with weight regain commonly occurring in most dieters. Here we show that central growth hormone (GH) signaling also promotes neuroendocrine adaptations during food deprivation. GH activates agouti-related protein (AgRP) neurons and GH receptor (GHR) ablation in AgRP cells mitigates highly characteristic hypothalamic and metabolic adaptations induced by weight loss. Thus, the capacity of mice carrying an AgRP-specific GHR ablation to save energy during food deprivation is impaired, leading to increased fat loss. Additionally, administration of a clinically available GHR antagonist (pegvisomant) attenuates the fall of whole-body energy expenditure of food-deprived mice, similarly as seen by leptin treatment. Our findings indicate GH as a starvation signal that alerts the brain about energy deficiency, triggering key adaptive responses to conserve limited fuel stores.

Several energy-saving adaptations are triggered by the hypothalamus during food deprivation, including increases in skeletal muscle work efficiency, and inhibition of thermogenesis, thyroid and reproductive axes^{1–7}. The fall in leptin levels is a starvation signal that plays a critical role inducing endocrine and autonomic adaptations during situations of negative energy balance^{1–4}. Accordingly, the prevention of declining leptin levels via exogenous leptin treatment attenuates starvation-induced suppression of gonadal and thyroid axes in mice and humans^{1,3}. In addition, leptin administration reverses the effects of sustained weight reduction on energy expenditure^{2,4}. However,

leptin replacement does not completely prevent the neuroendocrine adaptations induced by weight loss^{1,3,5}, indicating the existence of critical additional, but still unknown, starvation signals. The identification of other cues that induce such adaptive responses is imperative since the long-term efficacy of obesity treatments is low, in part due to body's defense mechanisms that decrease energy expenditure during weight loss⁷.

In the present study, we investigated the central effects of growth hormone (GH) on energy homeostasis as GH fulfills several requisites of an energy-deficiency signal to the brain. For example, GH secretion increases during situations of nutrient

¹ Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, São Paulo, SP 05508-000, Brazil. ² Laboratory of Neurophysiology, Multidisciplinary Institute of Cell Biology, Calle 526 y Camino General Belgrano, La Plata, BA 1900, Argentina.

² Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, São Paulo, SP 05508-900, Brazil.

³ Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil.

⁴ Edison Biotechnology Institute and Heritage College of Osteopathic Medicine, Ohio University, Konneker Research Center 206A, Athens, OH 45701, USA.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.D.Jr (email: jdonato@icb.usp.br)

deficiency, such as hypoglycemia⁸ or food deprivation^{3, 8–10}. Additionally, GH receptor (GHR) is widely expressed in hypothalamic areas implicated in energy balance regulation, including the arcuate nucleus (ARH)¹¹. However, the functional role of central GH signaling for energy homeostasis has not been fully defined. Here, we uncovered the importance of brain GH signaling for the regulation of energy homeostasis under normal conditions and during food deprivation. Our findings indicate that although GH does not play an important role modulating the energy balance in ad libitum fed animals, GH is a key cue that

signals energy deficiency to the brain, triggering neuroendocrine responses to conserve body energy stores.

Results

GH activates AgRP neurons to produce orexigenic responses. To identify GH response neurons, C57BL/6 mice received intraperitoneal (i.p.) injection of either phosphate-buffered saline (PBS) or GH and their brains were processed to detect the

Fig. 1 Orexigenic effect of growth hormone (GH) via activation of agouti-related protein (AgRP) neurons. **a, b** Photomicrographs showing the hypothalamic distribution of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) phosphorylation (pSTAT5) 90 min after an intraperitoneal (i.p.) injection of phosphate-buffered saline (PBS) or porcine GH (20 μ g/g body weight (b.w.)). 3V third ventricle, ARH arcuate nucleus, DMH dorsomedial nucleus, fx fornix, LHA lateral hypothalamic area, VMH ventromedial nucleus. Scale Bar = 200 μ m. **c** More than 90% of AgRP neurons (red) in the ARH are responsive to porcine GH as indicated by the co-expression of pSTAT5 (green). Yellow represents double-labeled cells. Scale Bar = 50 μ m.

d Intracerebroventricular (i.c.v.) infusion of porcine GH (6 μ g in 2 μ L) increased food intake (0.5 h: $t_{(8)} = 1.258$, $P = 0.244$; 1 h: $t_{(8)} = 2.075$, $P = 0.0717$; 2 h: $t_{(8)} = 1.425$, $P = 0.1919$; 4 h: $t_{(8)} = 1.518$, $P = 0.1675$; 24 h: $t_{(8)} = 2.801$, $P = 0.0232$; $n = 9$), compared to the infusion of artificial cerebrospinal fluid (aCSF). **e** The i.c.v. infusion of porcine GH reduced energy expenditure ($t_{(5)} = 3.193$, $P = 0.0242$, $n = 6$; paired t-test) of C57BL/6 mice. **f** Hypothalamic gene expression in C57BL/6 mice that received i.p. infusion of either PBS or porcine GH (AgRP: $t_{(15)} = 2.723$, $P = 0.0157$; neuropeptide Y (NPY): $t_{(15)} = 2.144$, $P = 0.0488$; proopiomelanocortin (POMC): $t_{(14)} = 0.5188$, $P = 0.612$; $n = 9$; unpaired t-test). **g** Representative whole-cell patch-clamp recording of a GH responsive AgRP neuron. Dashed line indicates the resting membrane potential. Porcine GH (5 μ g/mL) was applied to the bath for approximately 5 min. **h, i** Increased resting membrane potential ($t_{(2)} = 4.768$, $P = 0.0413$; paired t-test) and firing rate ($t_{(2)} = 3.001$, $P = 0.0477$; paired t-test) of GH-responsive AgRP neurons ($n = 3$). **j** AgRP growth hormone receptor knockout (GHR KO) mice showed very few GH-induced pSTAT5 (green) in AgRP neurons (red). Scale Bar = 50 μ m. All results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$

Fig. 2 Hypothalamic changes induced by weight loss are attenuated in agouti-related protein (AgRP) growth hormone receptor knockout (GHR KO) mice. **a** AgRP GHR KO mice show reduced number of c-Fos-positive cells after 24 h of fasting in the arcuate nucleus (ARH) ($t_{(8)} = 2.348$, $P = 0.0443$, $n = 5$) and in AgRP neurons ($t_{(7)} = 6.62$, $P = 0.0003$), but not in non-AgRP cells ($t_{(7)} = 0.6529$, $P = 0.5347$). **b, c** Representative photomicrographs showing fasting-induced c-Fos expression (green) and the co-localization with AgRP neurons (red). Scale Bar = 50 μ m. **d** Hypothalamic mRNA expression of neuropeptide Y (NPY) (main effect of food restriction (F.R.) [$F_{(1, 27)} = 16.44$, $P = 0.0004$], main effect of GHR ablation [$F_{(1, 27)} = 9.036$, $P = 0.0057$] and interaction [$F_{(1, 27)} = 4.215$, $P = 0.0499$]; $n = 7-8$). **e** Hypothalamic mRNA expression of AgRP (main effect of F.R. [$F_{(1, 27)} = 54.67$, $P < 0.0001$], main effect of GHR ablation [$F_{(1, 27)} = 11.64$, $P = 0.002$] and interaction [$F_{(1, 27)} = 6.417$, $P = 0.0174$]; $n = 7-8$). **f** Hypothalamic mRNA expression of proopiomelanocortin (POMC) (main effect of F.R. [$F_{(1, 26)} = 9.582$, $P = 0.0047$], main effect of GHR ablation [$F_{(1, 26)} = 2.813$, $P = 0.1055$] and interaction [$F_{(1, 26)} = 1.399$, $P = 0.2476$]; $n = 6-8$). The effects of F.R. were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA). All results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$

phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 (pSTAT5), a marker of GHR activation¹¹. We observed that GH robustly induced pSTAT5 in several hypothalamic nuclei, whereas few pSTAT5-positive cells were found in PBS-injected mice (Fig. 1a, b). Since agouti-related protein (AgRP) neurons in the ARH are major regulators of energy homeostasis¹², we investigated whether they are responsive to GH. We found that $91.2 \pm 3.0\%$ of AgRP neurons presented pSTAT5 after i.p. GH injection (Fig. 1c), suggesting that GH acts on AgRP cells. Although intracerebroventricular (i.c.v.) administration of GH caused no significant changes in food intake during the first 4 h of measurement, C57BL/6 mice exhibited increased food intake and reduced energy expenditure 24 h after the injection (Fig. 1d, e). GH injection also increased hypothalamic AgRP and neuropeptide Y (NPY) messenger RNA (mRNA) levels, whereas proopiomelanocortin (POMC) expression remained unaffected (Fig. 1f). Thus, GH injection mimicked the effects induced by chemogenetic activation of AgRP neurons¹³. To confirm that GH activates AgRP neurons, whole-cell patch-clamp recordings were performed in brain slices of AgRP-reporter mouse (Supplementary Fig. 1). We found that 25% of ARH AgRP neurons (3 out of 12 recorded cells from 5 mice) were depolarized by GH (Fig. 1g), increasing the resting membrane potential and action potential frequency of responsive cells, compared to baseline (Fig. 1h, i). In order to determine whether the effect of GH is direct in AgRP cells (independent of action potential-mediated synaptic transmission), a new set of recordings was performed in the presence of the voltage-gated sodium channel antagonist tetrodotoxin (TTX; 1 μ M) and synaptic blockers (20

μ M 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), 50 μ M 2-amino-5-phosphonopentanoate (AP-5) and 50 μ M picrotoxin). We also found that GH application in the presence of TTX and synaptic blockers depolarized 25% of ARH AgRP neurons (3 out of 12 recorded cells from 4 mice), changing in $+7.7 \pm 1.4$ mV their resting membrane potential ($t_{(2)} = 5.277$, $P = 0.0341$). Altogether, these findings indicate that exogenous administration of GH induces an orexigenic response via activation of AgRP neurons.

GHR ablation in AgRP neurons causes no metabolic imbalances. To study in detail the importance of GH signaling in AgRP neurons, we generated mice carrying an AgRP-specific GHR ablation. As expected, AgRP GHR knockout (KO) mice did not show GH-induced pSTAT5 in AgRP neurons (Fig. 1j), while a normal pSTAT5 distribution was observed in other neuronal populations (Supplementary Fig. 2). AgRP GHR KO mice displayed a similar body weight, food intake, energy expenditure, respiratory quotient, ambulatory activity, adiposity, lean body mass, body length, glucose tolerance and insulin sensitivity compared to control animals (Supplementary Fig. 3a-h and Supplementary Fig. 4a, b). GHR ablation in AgRP cells also did not affect leptin sensitivity (Supplementary Fig. 5), ghrelin-induced food intake or ghrelin-induced c-Fos expression in the ARH (Supplementary Fig. 6a-d). These results suggest that GHR expression in AgRP neurons is unnecessary for the regulation of energy homeostasis under normal circumstances or for the response to key hormones that rely on AgRP neurons to modulate energy homeostasis. Thus, endogenous fluctuations of

plasma GH levels likely do not play an important role modulating the energy balance in ad libitum fed mice.

GH triggers neuroendocrine adaptations during weight loss. AgRP neurons express c-Fos during food deprivation as an indicator of increased cell activity^{14, 15}. Notably, the amount of fasting-induced c-Fos-positive cells in the ARH was reduced in AgRP GHR KO mice (Fig. 2a–c), despite the number of ARH AgRP cells remained unchanged (Supplementary Fig. 7). We then introduced an AgRP-tdTomato genetic background to our mouse model to study if the ablation of GHR in AgRP cells impairs fasting-induced increments of c-Fos in AgRP neurons. We found that the number AgRP neurons positive for c-Fos was smaller in fasted AgRP GHR KO mice as compared to fasted control mice, while the number of non-AgRP cells positive for c-Fos remained unchanged between the groups (Fig. 2a–c). This observation suggests that AgRP neurons are unable to appropriately sense food deprivation without GH signaling. Since AgRP neurons are critically involved in neuroendocrine adaptations induced by weight loss^{12, 16, 17}, control and AgRP GHR KO mice were further studied either in ad libitum or during 60% food restriction (F.R.). Two days of F.R. (40% of the normal intake) was sufficient to increase hypothalamic NPY and AgRP expression in control mice, whereas GHR ablation in AgRP neurons prevented these effects (Fig. 2d, e). F.R. reduced hypothalamic POMC expression, but AgRP-specific GHR ablation did not significantly affect this response (Fig. 2f). Next, we assessed whether AgRP GHR KO mice exhibit a normal endocrine response to weight loss. F.R. reduced serum T4 and testosterone concentrations in control mice, whereas AgRP GHR KO mice showed a blunted suppression of these hormones (Fig. 3a, b). Additionally, F.R. increased serum corticosterone concentration in control mice, but this increase was prevented in AgRP GHR KO mice (Fig. 3c). While F. R. also reduced serum leptin levels (Fig. 3d) and increased serum GH concentration (Fig. 3e), GHR ablation in AgRP cells caused no significant effects in these responses. F.R. or GHR ablation in AgRP cells did not affect circulating prolactin levels (Supplementary Fig. 8). We also assessed interscapular brown adipose tissue uncoupling protein-1 (UCP-1) mRNA. F.R. suppressed UCP-1 expression in control mice, whereas this reduction was attenuated in AgRP GHR KO animals (Fig. 3f). Altogether, our findings strongly indicate that GH signaling in AgRP neurons is required for the induction of key neuroendocrine responses that conserve energy during F.R.

Energy-conserving effects of GH signaling in AgRP neurons. To test if the lack of adaptive responses to energy deficits significant impacts on energy balance, we recorded the whole-body energy expenditure of both groups of mice during 60% F.R. Control mice decreased their energy expenditure during F.R. (Fig. 4a and Supplementary Fig. 9), which is in accordance with the adaptive responses that conserve energy during this situation⁷. However, the decrease in energy expenditure of AgRP GHR KO mice during F.R. was significantly smaller, as compared to control mice, suggesting that they did not save energy as efficiently as control mice (Fig. 4a and Supplementary Fig. 9). Consequently, AgRP GHR KO mice exhibited a higher rate of weight loss (Fig. 4b), which was predominantly due to fat mass loss (Fig. 4c), but also to lean mass loss (Fig. 4d). No differences between groups were observed in the respiratory quotient or ambulatory activity during F.R. (Supplementary Fig. 10). Since GH secretion during F.R. is

essential to preserve blood glucose^{9, 10}, we daily monitored glycemia and found that AgRP GHR KO mice exhibited lower glycemia during the initial days of F.R. when compared to control animals (Fig. 4e).

As GH secretion displays sexual dimorphism^{18–20}, we also determined whether AgRP GHR KO females show blunted neuroendocrine responses to F.R. As seen in males, AgRP GHR KO females showed an attenuated increase in hypothalamic AgRP and NPY mRNA levels during F.R., whereas POMC gene expression was not affected by GHR ablation (Supplementary Fig. 11a–c). In contrast to our observations in male mice, the decrease in energy expenditure of AgRP GHR KO females during F.R. was similar as seen in control females (Supplementary Fig. 11d). However, AgRP GHR KO females exhibited increased weight loss (Supplementary Fig. 11e) and decreased glycemia (Supplementary Fig. 11f) during F.R., as compared to control females, which is similar to our observations in control vs. AgRP GHR KO males.

To test whether GH signaling in AgRP neurons regulates energy homeostasis in other conditions of nutrient deficiency, control and AgRP GHR KO male mice received i.p. injection of 2deoxy-D-glucose (2DG), which causes glucoprivation²¹. The counter-regulatory response triggered by 2DG was similar between the groups (Supplementary Fig. 12). However, control mice exhibited the expected 2DG-induced hyperphagia²², while this response was prevented in AgRP GHR KO mice (Fig. 4f).

GHR ablation in leptin receptor cells or the entire brain. Since distinct leptin receptor (LepR)-expressing neurons are known to be involved in the metabolic adaptations that conserve energy during F.R.^{6, 13, 16, 17, 23}, we generated mice carrying GHR ablation either in LepR cells (Fig. 5a–c and Supplementary Fig. 13) or the entire brain (nestin-derived cells; Fig. 5d and Supplementary Fig. 14). Thus, we investigated whether GHR ablation in a large number of neuronal populations produces additional effects on the metabolic adaptations induced by weight loss. In contrast to AgRP GHR KO mice, both LepR GHR KO and brain GHR KO mice exhibited increased body weight and length (Fig. 5e, f). However, LepR GHR KO mice showed reduced body adiposity and serum leptin levels compared to control animals, whereas brain GHR KO mice had higher lean body mass and upregulation of hypothalamic GH-releasing hormone expression (GHRH; Fig. 5g–j). Thus, central GHR ablation likely impaired GH negative feedback, leading to increased body growth, especially in brain GHR KO mice. Despite these changes, food intake, energy expenditure, respiratory quotient, ambulatory activity and leptin sensitivity were not affected in these mice (Supplementary Fig. 15a–e).

Next, we investigated whether LepR GHR KO and brain GHR KO mice were able to reduce their energy expenditure during F.R. As seen in AgRP GHR KO mice, both LepR GHR KO and brain GHR KO mice showed defects in their ability to save energy during F.R. (Fig. 6a), leading to a greater weight loss (Fig. 6b). Notably, a sharp decline in energy expenditure of LepR GHR KO mice was observed during the last days of F.R. (Fig. 6a), which may reflect an early depletion of their body energy reserves since these mice had lower adiposity (Fig. 5g). Hence, some LepR GHR KO mice became lethargic during F.R. and had to be killed and removed from the study (Supplementary Fig. 16). As seen in AgRP GHR KO mice, GHR ablation in LepR-expressing cells prevented the F.R.-induced suppression of UCP-1 expression in the brown adipose tissue (BAT; Fig. 6c). LepR GHR KO mice also exhibited lower glycemia during F.R. (Fig. 6d) and attenuated

2DG-induced hyperphagia compared to control or brain GHR KO mice (Fig. 6e). Thus, we confirmed the ability of central GH signaling to promote energy saving adaptations during F.R. in different mouse models; however, GHR ablation in broader neural populations did not produce additional effects as compared to AgRP GHR KO mice, emphasizing a crucial role of AgRP neurons mediating GH responses.

Pegvisomant increases the metabolic rate of food-deprived mice. To assess whether the energy-conserving effects of GH can be pharmacologically manipulated, we tested in mice the effects of a clinically available GHR antagonist (pegvisomant). Initially, we determined whether pegvisomant treatment inhibits GH signaling in mice. We found that C57BL/6 mice treated with two daily i.p. injections of pegvisomant during four consecutive days showed reduced plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

whereas leptin-treated mice showed a reduction in glycemia, especially during the last days of F.R. (Fig. 7e).

Discussion

Clinical trials have indicated that leptin administration failed as an efficient therapeutical approach to treat obesity^{24–26}, although it attenuates the neuroendocrine and metabolic changes induced by weight loss^{1–5}. Actually, many researchers agree that leptin's main role is to signal starvation (via falling leptin levels) and consequently produce appropriate behavioral and metabolic responses that increase the chances of survival^{27, 28}. Our findings point out that GH is an additional cue that signals energy deficiency to the brain, triggering key adaptive responses to conserve body energy stores (Fig. 7f). These findings help to explain why leptin replacement does not completely reverse the

Fig. 3 Neuroendocrine changes induced by weight loss are attenuated in agouti-related protein (AgRP) growth hormone receptor knockout (GHR KO) mice. **a** Serum concentration of T4 (main effect of food restriction (F.R.) [$F_{(1, 53)} = 46.18$, $P < 0.0001$], main effect of GHR ablation [$F_{(1, 53)} = 2.796$, $P = 0.1004$] and interaction [$F_{(1, 53)} = 4.953$, $P = 0.0303$]). **b** Serum concentration of testosterone (main effect of F.R. [$F_{(1, 38)} = 2.36$, $P = 0.1327$], main effect of GHR ablation [$F_{(1, 38)} = 1.086$, $P = 0.3039$] and interaction [$F_{(1, 38)} = 3.949$, $P = 0.0541$]). **c** Serum concentration of corticosterone (main effect of F.R. [$F_{(1, 49)} = 16.13$, $P = 0.0002$], main effect of GHR ablation [$F_{(1, 49)} = 1.072$, $P = 0.3055$] and interaction [$F_{(1, 49)} = 4.13$, $P = 0.0476$]). **d** Serum concentration of leptin (main effect of F.R. [$F_{(1, 41)} = 140.3$, $P < 0.0001$], main effect of GHR ablation [$F_{(1, 41)} = 3.803$, $P = 0.058$] and interaction [$F_{(1, 41)} = 0.0023$, $P = 0.9617$]). **e** Serum concentration of growth hormone (GH) (main effect of F.R. [$F_{(1, 20)} = 9.486$, $P = 0.0059$], main effect of GHR ablation [$F_{(1, 20)} = 0.0157$, $P = 0.9013$] and interaction [$F_{(1, 20)} = 0.2558$, $P = 0.6186$]). **f** UCP-1 mRNA expression in the interscapular brown adipose tissue (BAT; main effect of F.R. [$F_{(1, 38)} = 7.158$, $P = 0.0109$], main effect of GHR ablation [$F_{(1, 38)} = 5.196$, $P = 0.0283$] and interaction [$F_{(1, 38)} = 1.449$,

$P = 0.2361$]; $n = 11–15$). The data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA). All results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$

levels (Fig. 7a) and higher GHRH mRNA in the hypothalamus (Fig. 7b), as compared to PBS-treated mice. These results show that pegvisomant impairs GH signaling; thus, this drug acts as a GHR antagonist in mice. Next, C57BL/6 mice were subjected to 60% F.R. while receiving two daily i.p. injections of either pegvisomant or mouse recombinant leptin. Pegvisomant attenuated the decline in energy expenditure during F.R. to the same magnitude than leptin (Fig. 7c). However, this prevention was observed only in the second day of F.R. in both groups and did not affect significantly the weight loss (Fig. 7c, d). In addition, pegvisomant treatment did not change the glycemia during F.R.,

neuroendocrine adaptations induced by weight loss^{1, 3, 5}, since both GH and leptin play a role informing the brain about energy deficiency.

Our study also presents further evidence that AgRP neurons are fundamental for integrating information of various starvation signals to modulate energy homeostasis¹². Current results not only show that the activity of AgRP neurons is influenced by plasma GH levels but also highlight the brain as a key target of GH signaling.

We observed that ~90% of AgRP cells increased pSTAT5 levels in response to a systemic injection of GH. However, just 25% of ARH AgRP neurons depolarized after GH stimulus in an

ex vivo setting. Methodological or biological factors may explain this quantitative difference. For instance, technical procedures inherent to the experimental approach, such as brain slicing, may impair the ex vivo responsiveness of AgRP neurons. Also, it is possible that the signaling pathway or electrical effects of GH on AgRP neurons may differ. In line with this possibility, it has been shown that only a percentage of LepR-expressing neurons, including POMC and AgRP neurons, change their resting membrane potential after leptin application^{29, 30}. Our findings also suggest that the genomic actions of GH, presumably via STAT5 or STAT5-associated transcription factors, may have a more relevant physiological role than its effects on resting membrane potential. Indeed, knockout mice for Stat5a/b genes exhibit similar defects as those caused by GH deficiency, at least in terms of body and tissue growth^{31–33}.

Here, c-Fos expression in ARH AgRP neurons was measured after 24 h of fasting, while the importance of endogenous GH signaling in AgRP cells for the neuroendocrine responses to weight loss was evaluated in calorie-restricted mice that received 40% of their normal intake. Such F.R. protocol was chosen for the current study because it was previously shown to induce robust increments of plasma GH levels^{9, 10}. Furthermore, 2 days of F.R. produced similar neuroendocrine effects in mice than those caused by an acute fast, including suppression of thyroid and reproductive axes, increased glucocorticoid secretion, increase in hypothalamic AgRP and NPY expression and decreased POMC

possible to speculate that changes in autonomic innervation or hormonal milieu could have affected leptin synthesis and secretion by adipose tissue. In fact, POMC and AgRP neurons modulate autonomic nerve activity in various tissues, including fat depots³⁴, and these neurons can regulate fasting-induced fall in leptin levels, independently of changes in fat mass³⁵.

Some differences were observed between our conditional knockout models. While AgRP GHR KO mice showed no changes in growth or basal metabolism, both LepR GHR KO and brain GHR KO mice displayed increased weight gain over time, associated with a higher body length. The lack of difference in the growth of AgRP GHR KO mice, as compared to control mice, is interesting since previous studies suggested that NPY plays a role regulating GH secretion and consequently somatic growth^{36–38}. Thus, other populations of NPY neurons may be involved with this control or simply GHR expression does not affect how ARH AgRP/NPY neurons modulate the somatotrophic axis. On the other hand, GHR ablation in the entire brain was expected to increase GH secretion due to impaired GH negative feedback. Indeed, we observed a significant increase in GHRH mRNA levels in the hypothalamus of brain GHR KO mice. A recent study showed that ~45% of ARH GHRH-positive neurons are responsive to leptin³⁹. Thus, GHR ablation in LepR cells probably increased body length by affecting GH negative feedback in a subpopulation of ARH GHRH neurons. LepR GHR KO mice also showed decreased

Fig. 4 Energy-conserving effects of growth hormone (GH) signaling in agouti-related protein (AgRP) neurons. **a** Reduction in energy expenditure (VO_2) during food restriction (F.R.) compared to baseline (F.R. 1, $t_{(22)} = 3.296$, $P = 0.0033$; F.R. 2, $t_{(21)} = 2.913$, $P = 0.0083$; F.R. 3, $t_{(21)} = 3.223$, $P = 0.0041$; F.R. 4, $t_{(21)} = 3.144$, $P = 0.0049$; $n = 11$ – 12 ; unpaired t-test). **b** Changes in body weight (main effect of F.R. [$F_{(5, 225)} = 1525$, $P < 0.0001$], main effect of growth hormone receptor (GHR) ablation [$F_{(1, 45)} = 7.077$, $P = 0.0108$] and interaction [$F_{(5, 225)} = 3.251$, $P = 0.0074$]; control = 25; AgRP GHR KO = 22). **c** Body fat mass (main effect of F.R. [$F_{(5, 60)} = 29.23$, $P < 0.0001$], main effect of GHR ablation [$F_{(1, 12)} = 11.27$, $P = 0.0057$] and interaction [$F_{(5, 60)} = 2.079$, $P = 0.0805$]; control = 5; AgRP GHR KO = 9). **d** Lean body mass (main effect of F.R. [$F_{(5, 60)} = 526.9$, $P < 0.0001$], main effect of GHR ablation [$F_{(1, 12)} = 3.429$, $P = 0.0888$] and interaction [$F_{(5, 60)} = 3.026$, $P = 0.0168$]). **e** Blood glucose changes during F.R. (main effect of time [$F_{(5, 158)} = 88.32$, $P < 0.0001$], main effect of GHR ablation [$F_{(1, 158)} = 19.45$, $P < 0.0001$] and interaction [$F_{(5, 158)} = 1.463$, $P = 0.205$]; $n = 14$ – 15) and Fisher's least significant difference (LSD) post-hoc test (* $P < 0.01$). **f** Food intake after intraperitoneal (i.p.) injection of either phosphate-buffered saline (PBS) or 2-deoxy-D-glucose (2DG; 0.5 mg/kg body weight (b.w.)); $n = 9$ – 10). The effects of F.R. or 2DG were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA). All results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. expression^{1, 15}.

Additionally, AgRP GHR KO mice showed no change in serum leptin levels compared to control animal, while they lost more fat mass during F.R. Although the reasons for the lack of difference in circulating leptin levels in animals with different degrees of adiposity are unknown, it is

adiposity, although no differences in food intake and energy expenditure were observed in this model. Since the reason for the lower body fat mass in LepR GHR KO mice is unknown, we believe that it is likely related to a larger number of cells affected by GHR deletion, including peripheral cells that also express the

Fig. 5 Consequences of growth hormone receptor (GHR) ablation in leptin receptor (LepR)-expressing cells or the entire brain. **a–c** A high percentage of LepR neurons (red) in the arcuate nucleus (ARH; $t_{(5)} = 28.42$, $P < 0.0001$), lateral hypothalamic area (LHA; $t_{(5)} = 6.777$, $P = 0.0011$), dorsomedial nucleus (DMH; $t_{(5)} = 10.51$, $P = 0.0001$) and ventral premammillary nucleus (PMv; $t_{(5)} = 14.6$, $P < 0.0001$) is responsive to porcine growth hormone (GH) (20 $\mu\text{g/g}$ body weight (b.w.)) in control mice (phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 (pSTAT5), green), whereas very few pSTAT5 is observed in tdTomato cells of LepR GHR KO mice ($n = 3$ –4; unpaired t -test). Yellow represents double-labeled cells. Scale Bar = 50 μm . **d** GHR mRNA expression in the hypothalamus of control and brain GHR KO mice ($t_{(12)} = 30.02$, $P < 0.0001$, $n = 6$ –8; unpaired t -test). **e** Body weight changes in control, LepR GHR KO and brain GHR KO mice (main effect of time [$F_{(10, 1036)} = 370.9$, $P < 0.0001$], main effect of GHR ablation [$F_{(2, 1036)} = 76.28$, $P < 0.0001$] and interaction [$F_{(20, 1036)} = 0.4301$, $P = 0.9867$]; two-way analysis of variance (ANOVA); $n = 14$ –20; * $P < 0.05$, LepR GHR KO vs. control mice; # $P < 0.05$, brain GHR KO vs. control mice; † $P < 0.05$, LepR GHR KO vs. brain GHR KO mice). **f** Body length ($F_{(2, 42)} = 16.29$, $P < 0.0001$, $n = 13$ –17). **g** Body adiposity ($F_{(2, 34)} = 9.815$, $P = 0.0004$, $n = 11$ –14). **h** Serum leptin concentration ($F_{(2, 30)} = 4.477$, $P = 0.0199$, $n = 10$ –12/group). **i** Lean body mass ($F_{(2, 38)} = 13.17$, $P < 0.0001$, $n = 7$ –22/group). **j** Hypothalamic GHRH mRNA expression ($F_{(2, 21)} = 13.43$, $P = 0.0001$, $n = 7$ –9) of 6-month-old male mice. One-way ANOVA and the Newman–Keuls test were used when the data of control, LepR GHR KO and brain GHR KO mice were compared. All results were expressed as

LepR. Although the energy-conserving effects of GH signaling were clearly confirmed in both LepR GHR KO and brain GHR KO mice, only LepR GHR KO animals showed reduced glycemia during F.R. and a blunted 2DG-induced hyperphagia. It is possible that genetic deletions affecting a large number of cells may produce more pronounced compensatory effects during development masking the effects induced by the lack of GHR in the entire brain. In addition, Nestin-Cre transgene expression was previously shown to produce a phenotype per se which could have interfered with the responses observed in the present study^{40, 41}.

Pegvisomant is a modified version of human GH that has a much higher half-life than GH and acts as a competitive antagonist of the GHR^{42, 43}. Here, we show that daily treatment with pegvisomant in mice reduces plasma IGF-1 levels and increases hypothalamic GHRH mRNA expression, strongly suggesting that this compound impairs GH signaling. Importantly, our subsequent study with pegvisomant treatment provided a proof of concept that

a clinically available GHR antagonist produces energy-saving adaptations during food deprivation. Thus, pharmacological compounds that are capable of targeting GH signaling may prevent compensatory decreases in energy expenditure during F.R. and consequently represent a promising approach to facilitate weight loss and improve the efficacy of obesity treatments. However, additional pharmacological studies are needed to improve the treatment efficacy in terms of dose, route of administration or combination of administered drugs. In conclusion, our findings uncovered a novel physiological role for GH, which is to signal caloric deficiency to the brain, triggering important adaptive responses to conserve energy via activation of AgRP neurons.

Methods

Mice. To induce genetic ablation of the GHR, mice carrying loxP-flanked Ghr alleles⁴⁴ were bred either with AgRP-IRES-Cre mouse (AgRP^{tm1(cre)Low1/J}, The

Fig. 6 Central ablation of growth hormone receptor (GHR) prevents energy-saving adaptations during food restriction (F.R.) **a** Reduction in energy expenditure (VO_2) during the days of F.R. compared to baseline (F.R. 1, $F_{(2,20)} = 4.792$, $P = 0.0199$; F.R. 2, $F_{(2,20)} = 4.707$, $P = 0.0212$; F.R. 3, $F_{(2,18)} = 8.695$, $P = 0.0023$; F.R. 4, $F_{(2,18)} = 9.151$, $P = 0.0018$; $n = 5-10$). **b** Body weight changes during F.R. (main effect of F.R. [$F_{(7,315)} = 1011$, $P < 0.0001$], main effect of GHR ablation [$F_{(2,45)} = 2.258$, $P = 0.1163$] and interaction [$F_{(14,315)} = 3.189$, $P = 0.0001$]; $n = 14-20$; * $P < 0.05$, LepR GHR KO vs. control mice; # $P < 0.05$, brain GHR knockout (KO) vs. control mice; Fisher's least significant difference (LSD) post-hoc test). **c** UCP-1 mRNA expression in the brown adipose tissue (BAT; main effect of F.R. [$F_{(14,32)} = 1.374$, $P = 0.2499$], main effect of GHR ablation [$F_{(2,32)} = 3.646$, $P = 0.0652$] and interaction [$F_{(2,32)} = 5.547$, $P = 0.0248$] of LepR GHR KO mice. **d** Blood glucose changes during F.R. (main effect of time [$F_{(7,315)} = 65.76$, $P < 0.0001$], main effect of GHR ablation [$F_{(2,45)} = 4.866$, $P = 0.0122$] and interaction [$F_{(14,315)} = 1.491$, $P = 0.1125$]) and Fisher's LSD post-hoc test (* $P < 0.05$, LepR GHR KO vs. control mice; # $P < 0.05$, brain GHR KO vs. control mice; * $P < 0.05$, LepR GHR KO vs. brain GHR KO mice; $n = 14-15$). **e** Food intake after intraperitoneal (i.p.) injection of either phosphate-buffered saline (PBS) or 2-deoxy-D-glucose (2DG; 0.5 mg/kg body weight (b.w.); $n = 6-14$). One-way analysis of variance (ANOVA) and the Newman-Keuls test were used when the data of control, LepR GHR KO and brain GHR KO mice were compared. The changes in body weight and glycemia or the effects of 2DG were analyzed by two-way ANOVA. All results were expressed as mean $\pm$ s.e.m.

mean $\pm$ s.e.m.

Jackson Laboratory), LepR-IRES-Cre mouse (B6.129-Lep^{tm2(Cre)}Rck/J, The Jackson Laboratory) or Nestin-Cre mouse (B6.Cg-Tg^(Nes-cre)1Kln/J, The Jackson Laboratory). Control mice were homozygous for the loxP-flanked Ghr allele, whereas their littermates carrying the Cre alleles were considered the conditional knockout mice. In some histological and electrophysiological experiments, AgRP-IRES-Cre or LepR-IRES-Cre mice were also crossed with the Cre-inducible tdTomato-reporter mouse (B6.129S6-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)}Hze/J, The Jackson Laboratory), allowing the visualization of AgRP or LepR neurons via expression of the tdTomato fluorescent protein. The mice in these strains were in the C57BL/6 background. Mice were weaned at 3–4 weeks of age and their mutations were confirmed by genotyping the DNA that had been previously extracted from the tail tip (REDEExtract-N-AmpTM Tissue PCR Kit, Sigma). The genetically modified mouse models and wild-type C57BL/6 mice were produced and maintained in standard conditions of light (12 h light/ dark cycle) and temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Mice received a regular rodent chow diet (2.99 kcal/g; 9.4% calories from fat). All experiments were carried out in compliance with the National Institutes of Health (NIH) guidelines for the care and use of laboratory animals and were previously approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Institute of Biomedical Sciences at the University of São Paulo.

Brain histology. To visualize GH-responsive cells in the brain, adult mice ($n = 3-4$ /group) received an acute i.p. injection of porcine pituitary GH (pGH; 20 $\mu\text{g/g}$, from Dr. A.F. Parlow, National Hormone and Peptide Program (NHPP), National

Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases) and were perfused 90 min later. To assess fasting-induced c-Fos expression in the ARH, control and AgRP GHR KO mice carrying the Cre-inducible tdTomato-reporter protein ($n = 5$ / group) were perfused after 24 h of fasting. Ghrelin-induced c-Fos expression was measured in control and AgRP GHR KO mice ($n = 4-5$ /group) perfused 90 min following a subcutaneous injection of ghrelin (0.2 $\mu\text{g/g}$ body weight (b.w.), Global Peptide, cat. no. C-et-004). For the perfusions, mice were deeply anesthetized with isoflurane and perfused transcardially with saline, followed by a 10% buffered formalin solution (150–200 mL per mouse). Brains were collected and post-fixed in the same fixative for 30–60 min and cryoprotected overnight at 4°C in 0.1 M PBS containing 20% sucrose, pH 7.4. Brains were cut (30 μm thick sections) in the frontal plane using a freezing microtome. To label pSTAT5, brain sections were rinsed in 0.02 M potassium PBS, pH 7.4 (KPBS), followed by pretreatment in an alkaline (pH > 13) water solution containing 1% hydrogen peroxide and 1% sodium hydroxide for 20 min. After rinsing in KPBS, sections were incubated in 0.3% glycine and 0.03% lauryl sulfate for 10 min each. Next, sections were blocked in 3% normal donkey serum for 1 h, followed by incubation in anti-pSTAT5^{Tyr694} primary antibody (1:1000; Cell Signaling; #9351) for 40 h. For the immunofluorescence reaction, sections were rinsed in KPBS and incubated for 90 min in AlexaFluor⁴⁸⁸-conjugated secondary antibody (1:500, Jackson Laboratories). Sections were mounted onto gelatin-coated slides and the slides were coverslipped with Fluoromount G (Electron Microscopic Sciences, Hatfield, PA). For the immunoperoxidase staining, sections were incubated for 1 h in biotin-conjugated secondary antibody (1:1000, Jackson Laboratories) and next for 1 h with an avidin-biotin complex (1:500, Vector Labs). The peroxidase reaction was performed using 0.05% 3,3'-diaminobenzidine, 0.25% nickel sulfate and 0.03% hydrogen peroxide

resulting in a black nuclear staining. The slides were coverslipped with DPX mounting medium (Sigma, St. Louis, MO). The reaction to label c-Fos was similar to the pSTAT5 protocol, except that brain sections were incubated in anti-c-Fos antibody (1:20,000, Ab5, Millipore) for 48 h. Photomicrographs were acquired with a Zeiss AxioCam HRC camera coupled to a Zeiss AxioImager A1 microscope (Zeiss, Munich, Germany). Images were digitized using Axiovision software (Zeiss). The ImageJ Cell Counter software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) was used to manually count the number of cells in the areas of interest.

Electrophysiology. To examine the acute effects of GH on the membrane excitability of AgRP neurons, whole-cell patch-clamp recordings were performed in hypothalamic slices of male AgRP-reporter mouse (8–12 weeks old). Mice were decapitated, their brains were collected and immediately submerged in ice-cold, carbogensaturated (95% O₂ and 5% CO₂) artificial cerebrospinal fluid (aCSF; 124 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM glucose and 2.5 mM CaCl₂). Coronal sections (250 μm thick) from a hypothalamic block were cut with a Leica VT1000S vibratome and then incubated in oxygenated aCSF at room temperature for at least 1 h before recording. Slices were transferred to the recording chamber and allowed to equilibrate for 10–20 min before recording. The slices were bathed in oxygenated aCSF (30 °C) at a flow rate of 2 mL/min. In current-clamp mode, current injection (<± 8 pA) was used to normalize membrane potential. The resting membrane potential was monitored for at least 5 min (basal), followed by the addition of pGH to the bath (5 μg/mL) for approximately 5 min. The frequency of action potentials was determined by analyzing the firing rate 2 min immediately prior to pGH administration and during the last 2 min of drug application. Changes in resting membrane potential were also evaluated in the presence of TTX (1 μM) and synaptic blockers (CNQX at 10 μM, AP-5 at 50 μM and picrotoxin at 50 μM). The membrane potential values were compensated to account for the junction potential (−8 mV).

Evaluation of energy and glucose homeostasis. The body weight of AgRP GHR KO, LepR GHR KO and brain GHR KO mice, as well as of their respective control animals, was monitored weekly. When mice reached approximately 20 weeks of age, they were single housed and food intake was daily measured for 5 to 7 consecutive days. Then, mice were subjected to a glucose tolerance test (2 g glucose/kg b.w.; i.p.) and to an insulin tolerance test (1 IU insulin/kg b.w.; i.p.). To determine O₂ consumption (energy expenditure), CO₂ production, respiratory exchange ratio and locomotor activity (through infrared beam sensors), mice were placed in the Oxymax/Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS; Columbus Instruments, Columbus, OH, USA). After an adaptation period of 3 days inside the CLAMS, these metabolic parameters were evaluated for 4 consecutive days. Therefore, the results presented were the average of this period. Total body fat and lean mass were measured by time-domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR) using the LF50 body composition mice analyzer (Bruker, Germany). Body adiposity was also determined by summing the weight of the perigonadal, subcutaneous and retroperitoneal fat pads. The nose-anus length was assessed to determine body growth.

Leptin and ghrelin responsiveness. To assess leptin sensitivity, mice received an i.p. injection of either PBS or mouse recombinant leptin (2.5 μg/g b.w.; from Dr. A.F. Parlow, NHPP, USA) 3 h before their dark phase, and their food intake were recorded 4, 14 and 24 h following the injection. The food intake after PBS injection was compared with the food intake after leptin administration. The orexigenic response to ghrelin was determined in mice that received a subcutaneous injection of either PBS or ghrelin (0.2 μg/g b.w., Global Peptide, cat. no. C-et-004). Food intake was assessed 60 min after the injections.

Metabolic effects induced by food restriction. To investigate the neuroendocrine and metabolic changes induced by weight loss, mice were initially single housed and their food intake was recorded. Then, mice were subjected to a 60% food restriction protocol, in which each mouse received 40% of their normal intake 2 h before lights off for 5 to 7 consecutive days. During this period, the metabolic parameters were continuously assessed by the CLAMS, and their body weight, body composition (by TD-NMR) and glycemia were monitored at the time the food was provided. Daily calculation of VO₂ took into consideration the changes in body weight during food restriction to provide the value relative to body weight (mL/kg/h). Changes in oxygen consumption (energy expenditure) during food restriction were then reported as percentage of the values obtained from baseline (typically 2 to 3 days of recordings before food restriction). In addition, subgroups of adult (approximately 12-week-old) control and AgRP GHR KO mice were killed at the beginning of the light cycle (8:00 am) on the second day of food restriction. Mice with ad libitum access to food were killed at the same time. The hypothalamus, interscapular BAT and trunk blood were collected for subsequent analyses.

Fig. 7 Pegvisomant produces energy-saving adaptations in food-deprived mice. **a** Serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentration ($t_{(14)} = 4.089$, $P = 0.0011$; $n = 8$). **b** Hypothalamic growth hormone-releasing hormone (GHRH mRNA levels ($t_{(14)} = 2.452$, $P = 0.0279$; $n = 8$). **c** Energy expenditure (food restriction (F.R.) 1, $F_{(2, 23)} = 1.83$, $P = 0.1829$; F.R. 2, $F_{(2, 23)} = 5.396$, $P = 0.012$; F.R. 3, $F_{(2, 23)} = 0.1271$, $P = 0.8813$; F.R. 4, $F_{(2, 23)} = 0.4397$, $P = 0.6496$; $n = 7-10$). **d** Body weight changes (main effect of F.R. [$F_{(5, 125)} = 1031$, $P < 0.0001$], main effect of treatment [$F_{(2, 25)} = 0.3717$, $P = 0.1163$] and interaction [$F_{(10, 125)} = 2.398$, $P = 0.0122$]; $n = 7-10$). **e** Blood glucose levels (main effect of F.R. [$F_{(5, 125)} = 116.6$, $P < 0.0001$], main effect of treatment [$F_{(2, 25)} = 4.747$, $P = 0.0179$] and interaction [$F_{(10, 125)} = 2.966$, $P = 0.0022$]; $n = 8-10$; * $P < 0.05$, leptin vs. phosphate-buffered saline (PBS) treatment; * $P < 0.05$, leptin vs. pegvisomant treatment; Fisher's least significant difference (LSD) post-hoc test). **f** Scheme summarizing our findings highlighting that growth hormone (GH), parallel to the fall in leptin levels, is a critical cue that informs the brain about energy deficiency, triggering key adaptive responses to conserve body energy stores via activation of agouti-related protein (AgRP) neurons. All results were expressed as mean $\pm$ s.e.m.

Drug treatment during food restriction. Adult wild-type C57BL/6 male mice were subjected to the same 60% food restriction protocol described earlier, except that they received twice a day (at 9:00 am and 6:00 pm; lights on 8:00 am) i.p. injections of either mouse recombinant leptin (2.5 μ g/g b.w. per injection; NHPP, USA), human GHR antagonist (pegvisomant; 20 μ g/g b.w. per injection; Somavert[®]; Pfizer, Inc.) or control solution (pegvisomant diluent). Food deprivation-induced changes in energy expenditure and body weight were assessed as previously described.

Metabolic effects induced by hypoglycemia. To produce a counter-regulatory response to hypoglycemia, mice received an i.p. injection of 2DG (0.5 mg/kg b.w.; Sigma). We initially evaluated the effects of 2DG on glycemia for 180 min. Then, mice received i.p. injections of either PBS or 2DG and their food intake was recorded 2, 3 and 4 h afterwards.

Hormone measurements. Commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to determine the serum concentration of leptin (Crystal Chem), T4 (Calbiotech), testosterone (Calbiotech), corticosterone (Arbor Assays), GH (Millipore), IGF-1 (R&D Systems) and prolactin (Sigma).

Gene expression analysis. Total RNA from the hypothalamus or interscapular BAT was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen). Assessment of RNA quantity and quality was performed with an Epoch Microplate Spectrophotometer (Biotek). Total RNA was incubated in DNase I RNase-free (Roche Applied Science). Reverse transcription was performed with 2 μ g of total RNA with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random primers p(dN)6 (Roche Applied Science). Real-time polymerase chain reaction was performed using the 7500TM Real-Time

PCR System (Applied Biosystems) and Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Relative quantification of mRNA was calculated by $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Data were normalized to the geometric average of β -actin, glyceraldehyde 3phosphate dehydrogenase (GAPDH) and cyclophilin A and reported as fold changes compared to values obtained from the control group (set at 1.0). The following primers were used: AgRP (forward: ctttgccggaggtgctagat; reverse: aggcactc gtcgagccttacac), β -actin (forward: gctccggcatgtgcaaaag; reverse: catcacaccctgtgtccta), cyclophilin A (forward: tatctgcactgccaagactgagt; reverse: cttctgtgctgttgcattcc), GAPDH (forward: ggggtccagcttaggttcat; reverse: tacggccaaatccgttcaca), GHR (forward: atcaatccaagcctggggac; reverse: acagctgaatagatcctgggg), GHRH (forward: tat gcccgaaagtgtatcag; reverse: atccttggaatccctgcaaga), NPY (forward: cagatactactc cgctctgag; reverse: gggctggatctcttgcata), POMC (forward: tagatgtgtggagctgtgtgc; reverse: ccagcgagaggtcgagtttg) and UCP-1 (forward: gaggtgtggcagtggtcattg; reverse: ggctgtcattctgacacctca).

Statistical analysis. All results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. The paired two-tailed Student's t-test was used to compare the effects of GH or vehicle administration in the same animals, and in the electrophysiological data (before and during GH application). The unpaired two-tailed Student's t-test was used for comparisons between two groups. When three groups were compared simultaneously, we used one-way analysis of variance (ANOVA) and the Newman-Keuls multiple comparison tests. Data was analyzed using two-way ANOVA when appropriate, followed by Newman-Keuls or Fisher's least significant difference (LSD) post-hoc tests. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. We considered P values < 0.05 to be statistically significant.

Reporting Summary. Further information on experimental design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

Source data for figures are available from the corresponding author upon request. A reporting summary for this Article is available as a Supplementary Information file.

Received: 15 May 2018 Accepted: 10 December 2018

Published online: 08 February 2019

References

- Ahima, R. S. et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382, 250–252 (1996).
- Rosenbaum, M., Murphy, E. M., Heymsfield, S. B., Matthews, D. E. & Leibel, R. L. Low dose leptin administration reverses effects of sustained weightreduction on energy expenditure and circulating concentrations of thyroid hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2391–2394 (2002).
- Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D. & Mantzoros, C. S. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J. Clin. Invest.* 111, 1409–1421 (2003).
- Rosenbaum, M. et al. Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, and neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight. *J. Clin. Invest.* 115, 3579–3586 (2005).
- Shetty, G. K. et al. Leptin administration to overweight and obese subjects for 6 months increases free leptin concentrations but does not alter circulating hormones of the thyroid and IGF axes during weight loss induced by a mild hypocaloric diet. *Eur. J. Endocrinol.* 165, 249–254 (2011).
- Donato, J. Jr. et al. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J. Clin. Invest.* 121, 355–368 (2011).
- Leibel, R. L., Rosenbaum, M. & Hirsch, J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N. Engl. J. Med.* 332, 621–628 (1995).
- Roth, J., Glick, S. M., Yalow, R. S. & Bersonsa. Hypoglycemia: a potent stimulus to secretion of growth hormone. *Science* 140, 987–988 (1963).
- Zhao, T. J. et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 7467–7472 (2010).
- Li, R. L. et al. Profound hypoglycemia in starved, ghrelin-deficient mice is caused by decreased gluconeogenesis and reversed by lactate or fatty acids. *J. Biol. Chem.* 287, 17942–17950 (2012).
- 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 Struct. Funct.* 222, 341–363 (2017).
- Andermann, M. L. & Lowell, B. B. Toward a wiring diagram understanding of appetite control. *Neuron* 95, 757–778 (2017).
- Krashes, M. J. et al. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 1424–1428 (2011).
- Wu, Q. et al. The temporal pattern of cfos activation in hypothalamic, cortical, and brainstem nuclei in response to fasting and refeeding in male mice. *Endocrinology* 155, 840–853 (2014).
- Pedroso, J. A. et al. Changes in leptin signaling by SOCS3 modulate fasting-induced hyperphagia and weight regain in mice. *Endocrinology* 157, 3901–3914 (2016).
- Erickson, J. C., Hollopeter, G. & Palmiter, R. D. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 274, 1704–1707 (1996).
- Wu, Q., Whiddon, B. B. & Palmiter, R. D. Ablation of neurons expressing agouti-related protein, but not melanin concentrating hormone, in leptindeficient mice restores metabolic functions and fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 3155–3160 (2012).
- van den Berg, G., Veldhuis, J. D., Frolich, M. & Roelfsema, F. An amplitudespecific divergence in the pulsatile mode of growth hormone (GH) secretion underlies the gender difference in mean GH concentrations in men and premenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 2460–2467 (1996).
- Jaffe, C. A. et al. Regulatory mechanisms of growth hormone secretion are sexually dimorphic. *J. Clin. Invest.* 102, 153–164 (1998).
- Jessup, S. K., Dimaraki, E. V., Symons, K. V. & Barkan, A. L. Sexual dimorphism of growth hormone (GH) regulation in humans: endogenous GH-releasing hormone maintains basal GH in women but not in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 4776–4780 (2003).
- Garfield, A. S. et al. A parabrachial-hypothalamic cholecystokinin neurocircuit controls counterregulatory responses to hypoglycemia. *Cell Metab.* 20, 1030–1037 (2014).
- Ikeda, H., Nishikawa, K. & Matsuo, T. Feeding responses of Zucker fatty rat to 2-deoxy-D-glucose, norepinephrine, and insulin. *Am. J. Physiol.* 239, E379–E384 (1980).
- Berglund, E. D. et al. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 1000–1009 (2012).
- Heymsfield, S. B. et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 282, 1568–1575 (1999).
- Hukshorn, C. J. et al. Weekly subcutaneous pegylated recombinant native human leptin (PEG-OB) administration in obese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4003–4009 (2000).
- Hukshorn, C. J. et al. The effect of pegylated recombinant human leptin (PEGOB) on weight loss and inflammatory status in obese subjects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 504–509 (2002).
- Flier, J. S. & Maratos-Flier, E. Leptin's physiologic role: does the emperor of energy balance have no clothes? *Cell Metab.* 26, 24–26 (2017).
- Ramos-Lobo, A. M. & Donato, J. Jr. The role of leptin in health and disease. *Temperature* 4, 258–291 (2017).
- Baquero, A. F. et al. Developmental switch of leptin signaling in arcuate nucleus neurons. *J. Neurosci.* 34, 9982–9994 (2014).
- Williams, K. W. et al. Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. *J. Neurosci.* 30, 2472–2479 (2010).
- Udy, G. B. et al. Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7239–7244 (1997).
- Teglund, S. et al. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93, 841–850 (1998).
- Carroll, P. V. et al. Growth hormone deficiency in adulthood and the effects of growth hormone replacement: a review. *Growth Hormone Research Society Scientific Committee. J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 382–395 (1998).
- Bell, B. B., Harlan, S. M., Morgan, D. A., Guo, D. F. & Rahmouni, K. Differential contribution of POMC and AgRP neurons to the regulation of regional autonomic nerve activity by leptin. *Mol. Metab.* 8, 1–12 (2018).
- Caron, A. et al. POMC neurons expressing leptin receptors coordinate metabolic responses to fasting via suppression of leptin levels. *eLife* 7, pii: e33710 (2018).
- Steyn, F. J., Tolle, V., Chen, C. & Epelbaum, J. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion. *Compr. Physiol.* 6, 687–735 (2016).
- Catzeflis, C. et al. Neuropeptide Y administered chronically into the lateral ventricle profoundly inhibits both the gonadotropic and the somatotrophic axis in intact adult female rats. *Endocrinology* 132, 224–234 (1993).
- Minami, S., Kamegai, J., Sugihara, H., Suzuki, N. & Wakabayashi, I. Growth hormone inhibits its own secretion by acting on the hypothalamus through its receptors on neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus and somatostatin neurons in the periventricular nucleus. *Endocr. J.* 45, S19–S26 (1998).
- Rupp, A. C. et al. Specific subpopulations of hypothalamic leptin receptor-expressing neurons mediate the effects of early developmental leptin receptor deletion on energy balance. *Mol. Metab.* 14, 130–138 (2018).
- Harno, E., Cottrell, E. C. & White, A. Metabolic pitfalls of CNS Cre-based technology. *Cell Metab.* 18, 21–28 (2013).
- Declercq, J. et al. Metabolic and behavioural phenotypes in nestin-Cre mice are caused by hypothalamic expression of human growth hormone. *PLoS One* 10, e0135502 (2015).
- Kopchick, J. J. Discovery and mechanism of action of pegvisomant. *Eur. J. Endocrinol.* 148, S21–S25 (2003).
- Kopchick, J. J., List, E. O., Kelder, B., Gosney, E. S. & Berryman, D. E. Evaluation of growth hormone (GH) action in mice: discovery of GH receptor antagonists and clinical indications. *Mol. Cell Endocrinol.* 386, 34–45 (2014).
- List, E. O. et al. The role of GH in adipose tissue: lessons from adipose-specific GH receptor gene-disrupted mice. *Mol. Endocrinol.* 27, 524–535 (2013).

Acknowledgements

We thank Ana Maria P. Campos for expert technical assistance. J.D., R.F. and M.M. are financed by grants from the São Paulo Research Foundation (FAPESP; 17/02983–2, 17/21840–8 and 17/16473–6, respectively). I.C.F., G.O. and G.C. are financed by fellowships from FAPESP (16/09679–4, 17/05007–4 and 17/04006–4, respectively). We also thank

the External Scholarship Program of the Argentine Research Council (CONICET) for supporting G.G.R.

Author contributions

I.C.F. and J.D. conceived the project, designed the experiments, interpreted the results and wrote the manuscript. G.G.R. and M.P. performed the experiments with ghrelin. R.F. performed the electrophysiological experiments. I.C.F., P.D.S.T., G.O.S. and G.C.L.C. performed the remaining experiments. L.L.E., M.M., E.O.L. and J.J.K. provided essential equipment, reagents and expertise.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467019-08607-1>.

Competing interests: J.D. is recipient of the 2017 Global ASPIRE Young Investigator Research Awards in Endocrinology supported by Pfizer, Inc. The remaining authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Journal peer review information: Nature Communications thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019