

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

ALINE ALVES DE JESUS

**Participação da via da PI3K em neurônios SF1 do
hipotálamo na homeostase energética**

Ribeirão Preto

2023

ALINE ALVES DE JESUS

Participação da via da PI3K em neurônios SF1 do hipotálamo na homeostase energética

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias

Ribeirão Preto

2023

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

FICHA CATALOGRÁFICA

De Jesus, Aline Alves

Participação da via da PI3K em neurônios SF1 do hipotálamo na homeostase energética, 2023.

150 p.: il.; 30 cm

Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto– Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Lucila Leico Kagohara Elias

1. Homeostase energética. 2. PI3K. 3. VMH. 4. Neurônios SF1. 5. HFD. 6.DIO. 7. 17 β estradiol.

Nome: Aline Alves de Jesus

Título: Participação da via da PI3K em neurônios SF1 do hipotálamo na homeostase energética

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP)- 2020/07368-7.

DEDICATÓRIA

*A minha mãe **Valdeci Alves**, que sempre foi e sempre será meu maior incentivo, grande inspiração na minha vida, o meu exemplo de força e humildade, a quem devo tudo o que sou, e por ser uma luz no céu que sempre guia o meu caminho na terra. A minha tia **Doraci Alves**, pelo cuidado, apoio e por me ensinar a persistir diante as dificuldades encontradas no decorrer da minha trajetória; e a quem tenho como exemplo de vida. Aos meus primos a quem considero como irmãos; **Graziele Alves**, **Vanessa Alves**, **Wallace Alves** e **Danilo Alves** que sempre fizeram parte da minha trajetória e com quem compartilho momentos. Ao meu irmão **Diego Alves**, pelo apoio e experiências compartilhadas.*



AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Lucila Leico Kagohara pela oportunidade, confiança, esforço, conselho, incentivo, e orientação proporcionada durante o desenvolvimento da tese.

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, por seu entusiasmo e dedicação para com seu trabalho e todo o laboratório de neuroendocrinologia.

À Maria Valci e à Milene por todo apoio técnico, ensinamentos, conselhos e amizade.

Aos colegas do laboratório de neuroendocrinologia, pela convivência e companheirismo que tornaram o dia a dia mais agradável. Em especial à Luciana Tabajara, Rafaella Volpi, Raoni dos Santos, Izabela Facco, Isabelle Rodrigues, Hellen Veida, Rafael Appel, Gabriel Ishioka e Sabrina Tristão. Obrigada por todo o companheirismo, paciência, conselhos e ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de fisiologia da inflamação sistêmica, principalmente à Gabriel Cardoso, Hadder Batista e Patrícia Passaglia por todo apoio mútuo, conselhos e incentivo durante a minha trajetória acadêmica.

Aos docentes do departamento de fisiologia da FMRP por todos os ensinamentos.

Aos funcionários do departamento de fisiologia e da FMRP, pelo bom humor, disposição e prestatividade, em especial ao Rubens Fernando de Melo e Marina Holanda.

Aos funcionários da secretaria do departamento de fisiologia da FMRP, por toda atenção, bom humor, educação e prestatividade.

Aos bioteristas do departamento de clínica médica da FMRP, Carlos, Maurício e Roni pela ajuda com a manutenção e cuidado dos animais.

Aos animais, pelo sacrifício.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade, contribuição e interesse para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos que fizeram parte da minha trajetória durante o período que estive em Ribeirão Preto em especial a Jéssica Benevides, Ana Claudia Sousa, Aline Meira, Jociele Cristina, Sara Ornella, Keyla Ornella, Tatiane Borges, Daniele Maria, Thais Rezende, Karen Santos,

Gabriela Bragagnollo, Gabriela Borges, Eduardo Saramago e Bruna Maitan, pela amizade e momentos incríveis compartilhados.

À minha família pelo apoio, compreensão e incentivo durante toda a jornada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e FAPESP, pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), por toda a infraestrutura disponível para a execução deste trabalho.

**“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que
você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”**

(Martin Luther King Júnior)

DE JESUS, A. A. **Participação da via da PI3K em neurônios SF1 do hipotálamo na homeostase energética.** 2023, 150f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

RESUMO

A obesidade ocorre devido a um desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto calórico e afeta milhões de pessoas ao redor do mundo, estando ligada a um risco aumentado para o desenvolvimento de doenças cardíacas, diabetes mellitus e síndrome metabólica. Mulheres no final da vida reprodutiva (menopausa) apresentam maior risco de desenvolver obesidade, quando comparadas aos homens. Diversos estudos têm demonstrado que este evento ocorre devido à diminuição na menopausa, da produção do hormônio ovariano 17β estradiol (E2) que desempenha importante função na homeostase energética. O hipotálamo, considerado o principal regulador para promover a homeostase do organismo no sistema nervoso central (SNC), recebe sinais hormonais como o E2 e de nutrientes do sistema periférico que atuam em populações de neurônios do núcleo arqueado (ARC), que expressam pró-opiomelanocortina (POMC) e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), neuropeptídeos que promovem efeitos anorexígenos (reduzem a ingestão alimentar e induzem à saciedade), e outra população de neurônios que expressam neuropeptídeo Y (NPY) e proteína Agouti (AgRP), neuropeptídeos orexígenos (estimulam o apetite). A estimulação dos neurônios POMC por sua vez, induz disparos aos neurônios dos núcleos de segunda ordem, como os neurônios que expressam o fator esteroideogênico 1 (SF1) do núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH), que por sua vez, regulam a ingestão alimentar e o gasto energético, atenuando a DIO. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos intracelulares pelos quais os neurônios do VMH medeiam estes efeitos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar a importância da sinalização mediada por fosfatidilinositol quinase 3 (PI3K) em neurônios SF1 do VMH na homeostase energética, assim como, a participação desta via nos efeitos do E2 na regulação do peso corporal. A metodologia Cre-lox foi utilizada para a geração de camundongos com deleção específica da subunidade catalítica $P110\alpha$ em neurônios SF1, o que nos permitiu gerar camundongos SF1-cre; $P110\alpha^{flox/flox}$ (experimentais), e $P110\alpha^{flox/flox}$ (controles). Foram avaliados peso corporal, ingestão alimentar, calorimetria indireta, termogênese, metabolismo glicêmico, concentrações séricas de insulina e leptina em animais experimentais e controles de ambos os sexos, tratados com dieta regular (RD) ou hiperlipídica (HFD). Fêmeas foram submetidas

a ovariectomia (OVX) e implante subcutânea de pellet de E2 para a avaliação do peso corporal, ingestão alimentar, gasto energético e termogênese. Demonstramos que a deleção condicional de P110 α em neurônios SF1 do VMH (SF1-cre;P110 α ^{flox/flox}) reduziu o consumo de O₂ e gasto energético em camundongos machos sob dieta RD. Contudo, a redução da atividade da PI3K no VMH não afetou o peso corporal, ingestão alimentar, tolerância à glicose e a insulina. Em camundongos fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox}, observou-se um aumento da ingestão alimentar acumulada, porém não houve alteração no peso corporal, calorimetria indireta e tolerância à glicose e a insulina. Quando desafiados com HFD, a ruptura da PI3K em neurônios SF1, causou um aumento significativo do peso corporal que foi mais relevante em fêmeas sem alterar a ingestão alimentar. Em ambos os sexos observou-se redução na tolerância à insulina, no gasto energético e na termogênese. A deleção condicional da subunidade P110 α no VMH, reduziu parcialmente os efeitos do 17 β -estradiol em fêmeas OVX no controle do peso corporal, na estimulação do gasto energético, atividade simpática e termogênese do TAM. Coletivamente, nossos resultados indicam que a atividade da PI3K nos neurônios SF1 do VMH desempenha um papel relevante na proteção da obesidade induzida por dieta (DIO) e participa nas ações do E2 na regulação da homeostase energética em camundongos fêmeas.

Palavras- chaves: Homeostase energética; PI3K; VMH; neurônios SF1; DIO; 17 β estradiol.

DE JESUS, A. A. **Role of the PI3K pathway in SF1 neurons of the hypothalamus in energy homeostasis.** 2023, 150f. Doctoral thesis. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2023.

ABSTRACT

Obesity occurs due to an imbalance between food intake and caloric expenditure and affects millions of people around the world, being linked to an increased risk for the development of heart disease, diabetes mellitus and metabolic syndrome. Women at the end of their reproductive life (menopause) are at greater risk of developing obesity when compared to men. Several studies have shown that this event occurs due to a decrease in the production of the ovarian hormone 17β estradiol (E2) during menopause, which plays an important role in the control of energy homeostasis. The hypothalamus, the main regulator to promote energy homeostasis, receives hormonal signals, such as E2 and nutrients, from the peripheral system that act on neurons in the arcuate nucleus (ARC), which express pro-opiomelanocortin (POMC) and cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART), neuropeptides that promote anorexigenic effects (reduce food intake and induce satiety), and another population of neurons that express neuropeptide Y (NPY) and Agouti protein (AgRP), orexigenic neuropeptides (stimulate appetite). Stimulation of POMC neurons, in turn, induces firing of neurons in second-order nuclei, such as neurons expressing steroidogenic factor 1 (SF1) in the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH), which in turn regulate food intake and energy expenditure attenuating the diet induced obesity (DIO). However, little is known about the intracellular mechanisms by which VMH neurons mediate these effects. Thus, this study aimed to investigate the role of phosphatidylinositol kinase 3 (PI3K) signaling in SF1 neurons of the VMH in the control of energy homeostasis, as well as the participation of this pathway in the effects of E2 on body weight regulation. The Cre-lox methodology was used to generate mice with specific deletion of the P110 α catalytic subunit in SF1 neurons, which allowed us to generate SF1-cre; P110 α ^{flox/flox} (experimental) and P110 α ^{flox/flox} (control) mice. Body weight, food intake, indirect calorimetry, thermogenesis, glycemic metabolism, serum insulin and leptin concentrations were evaluated in experimental animals and controls of both sexes, treated with a regular (RD) or high-fat (HFD) diet. Females underwent ovariectomy (OVX) and subcutaneous implantation of E2 pellets for the assessment of body weight, food intake, energy expenditure and thermogenesis. We demonstrated that the conditional deletion of P110 α in VMH SF1

neurons (SF1-cre;P110 α ^{flox/flox}) reduced O₂ consumption and energy expenditure in male mice under a regular diet. However, the reduction of PI3K activity in the VMH did not affect body weight, food intake, glucose and insulin tolerance. In female SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} mice, an increase in cumulative food intake was observed, but there was no change in body weight, indirect calorimetry, and glucose and insulin tolerance. When challenged with HFD, disruption of PI3K in SF1 neurons caused a significant increase in body weight that was more relevant in females without changing food intake. In both sexes, a reduction in insulin tolerance, energy expenditure and thermogenesis were observed. The conditional knockout of the P110 α subunit in the VMH partially reduced the effects of 17 β -estradiol in OVX females on body weight control, stimulation of energy expenditure and sympathetic activity and BAT thermogenesis. Collectively, our results indicate that PI3K activity in VMH SF1 neurons plays a relevant role to protect against diet-induced obesity (DIO) and participates in the actions of E2 in regulating energy homeostasis in female mice.

Keywords: Energy homeostasis; PI3K; VMH; SF1 neurons; DIO; 17 β estradiol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema anatômico e subpopulações neuronais do VMH. (A) Localização hipotalâmica no SNC em corte sagital. (B) Localização do VMH em corte coronal. (C) (Acima) Secção coronal do hipotálamo com marcação para Nissl e (abaixo) ampliação da área demonstrada em (B). (D) Esquema representativo dos padrões de genes expressos no VMH. ARC, núcleo arqueado do hipotálamo. DMH, núcleo dorsomedial do hipotálamo. LHA, área hipotalâmica lateral. VMH, núcleo ventromedial do hipotálamo. BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro. ER α , receptor alfa de estradiol. IR, receptor de insulina. LepR, receptor de leptina. SF1, fator esteroideogênico 1 (CHOI et al., 2013). _____ 32

Figura 2. Esquema representativo da cascata de sinalização intracelular mediada por receptores β AR, controlando a lipólise em adipócitos. Os β ARs ativam a adenilil ciclase através de seu acoplamento aos Gs heterotriméricos, produzindo cAMP (pontos verdes) a partir de ATP (pontos amarelos) para ativar a proteína quinase dependente de cAMP (PKA), permitindo que as subunidades catalíticas (PKA-C2) sejam liberadas da holoenzima ancorada à membrana plasmática (AKAP). A PKA fosforila (pontos azuis) lipases (HSL: lipase hormônio sensível) e proteínas de ligação de gotículas lipídicas, como perilipinas (Peri A; Peri B). A lipase triglicéridica adiposa (ATGL) é fosforilada, mas não pela PKA. Os ácidos graxos liberados dos triglicérides são escoltados para fora da célula por proteínas de ligação a lipídeos (aP2) e exportados por meio de proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP) (COLLINS, 2012). _____ 34

Figura 3. Esquema ilustrativo da metodologia Cre-lox para geração de animais com deleção condicionada (extraída de HARNO et al., 2013). _____ 43

Figura 4. Esquema da geração de camundongos SF1-cre;P110 α flox/flox. Figura elaborada em: <https://biorender.com/>. _____ 44

Figura 5. Protocolo experimental 1. _____ 45

Figura 6. Padronização da captura da temperatura do TAM e da cauda por meio da utilização de câmera termográfica. _____ 46

Figura 7. Protocolo experimental 2. _____ 47

Figura 8. Protocolo experimental 3. _____ 48

Figura 9. Teste de tolerância à glicose (GTT). _____50

Figura 10. Teste de tolerância à insulina (ITT). _____51

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose (2%) após PCR para genotipagem de SF1-cre(cre/+); P110 α ^{flox/flox}. M: Marcador. C+: Controle positivo correspondente a uma amostra de genótipo conhecido. C-: Controle negativo (água, sem material genético). WT: Animais selvagens para SF1. À direita está identificado o tamanho do fragmento de DNA (em pares de base, bp). _____56

Figura 12. Validação da deleção da subunidade catalítica P110 α da PI3K em neurônios do VMH. (A) Imagens representativas de AKT fosforilada (pAKT) no hipotálamo médio-basal, 30 minutos após a injeção intracerebroventricular de insulina (i.c.v 4,4 mU/2 μ l) em camundongos SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox}. Peso do testículo (B; n=10); peso da vesícula seminal (C; n=10); níveis plasmáticos de testosterona (D; n= 10/grupo); peso da adrenal (macho: E; n=7); níveis plasmáticos de corticosterona (macho: F; n= 6-7); peso do Útero (G; n=6-7/grupo) e ovário de camundongos fêmeas em estro (H; n=6 -7/grupo); peso adrenal (I; n=8 -11/grupo); níveis plasmáticos de corticosterona (fêmea: J; n= 6). Camundongos SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} alimentados com 20 semanas de idade e alimentados com dieta regular (RD) às. Os valores são apresentados como \pm EPM e o teste t de Student bicaudal foi usado para comparações de dois grupos; p*** < 0.001 entre os grupos. _____58

Figura 13. Deleção da P110 α em neurônios SF1 do VMH não altera o peso corporal de animais submetidos à dieta regular (RD). Peso corporal (A; n = 10/grupo), delta do peso corporal (B; n= 10/grupo), ingestão alimentar acumulada (C; n = 10/grupo) de camundongos machos; peso corporal (D; n = 9-11/grupo), delta do peso corporal (E; n=9-11/grupo), ingestão alimentar acumulada (F; n = 9-11/grupo) de camundongos fêmeas. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. p* <0.05. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Animais alimentados com RD. _____59

Figura 14. Deleção da subunidade P110 α nos neurônios SF1 do VMH diminui o gasto energético em machos alimentados com RD. Consumo de O₂ em 24h (A; n=6-7/grupo); área sob a curva (AUC) do consumo de O₂ (B; n=6-7/grupo); gasto energético (C; n=6-7/grupo) em camundongos machos. Consumo de O₂ em 24h (D; n=6-7/grupo); área sob a

curva (AUC) do consumo de O₂ (E; n=6-7/grupo); gasto energético (F; n=6-7/grupo) em camundongos fêmeas. Dados como média ± EPM e o teste t de Student foi utilizado; *p<0.05. Animais alimentados com RD. _____ 60

Figura 15. Redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH não afeta a homeostase da glicose em animais submetidos à dieta regular. Teste de tolerância à glicose (A; n=7-10); teste de tolerância a insulina (B-C; n=7-10) e concentrações séricas de insulina (D; n=7) de camundongos machos SF1-cre;P110α^{flox/flox} e P110α^{flox/flox}. Teste de tolerância à glicose (E; n=7-10); teste de tolerância a insulina (F-G; n=7-10) e concentrações séricas de insulina (H; n=7) de camundongos fêmeas SF1-cre;P110α^{flox/flox} e P110α^{flox/flox}. Dados como média ± EPM e o teste t de Student foi utilizado. Animais alimentados com RD. _____ 61

Figura 16. Redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH não afeta o peso do fígado, TABr, TAM e concentrações séricas de leptina. Peso absoluto do tecido adiposo branco retroperitoneal (TABr), tecido adiposo marrom (TAM) e fígado de camundongos machos SF1-cre(cre/+;P110α^{flox/flox} e P110α^{flox/flox} (A; n=10). Concentrações plasmáticas de leptina em animais machos (B; n=7). Peso absoluto TABr, TAM e fígado de camundongos fêmeas SF1-cre(cre/+;P110α^{flox/flox} e P110α^{flox/flox} (C; n=10-11/grupo). Concentrações plasmáticas de leptina em animais fêmeas (D; n=7) tratados com dieta regular (RD). Animais com 20 semanas de idade. Valores expressos como média ± EPM. Dados analisados por teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos. _____ 62

Figura 17. Redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH causa prejuízo nas respostas adaptativas de proteção contra a obesidade induzida pela dieta de animais submetidos à HFD de uma maneira sexo-específica. Peso corporal (A; n = 6/grupo), delta do peso corporal (B; n= 6/grupo), ingestão alimentar acumulada (C; n = 6/grupo) de camundongos machos; peso corporal (D; n = 7-10/grupo), delta do peso corporal (E; n=7-10/grupo), ingestão alimentar acumulada (F; n = 7-10/grupo) de camundongos fêmeas. Os dados estão apresentados como média ± EPM. p* <0.05. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Sidak. Animais alimentados com HFD 60%. _____ 63

Figura 18. Consumo de VO₂ em 24h (A; n=6/grupo); área sob a curva (AUC) do consumo de O₂ (B; n=6-7/grupo) em camundongos machos e fêmeas (C; n= 6/grupo);

(D; n= 6/grupo). Animais com peso corporal pareado, após receberem uma semana de HFD; * p < 0.05 e ** p < 0.001. Valores expressos como média ± EPM. Dados analisados por teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos. _____ 64

Figura 19. Consumo de VCO₂ em 24h (A; n=6/grupo); área sob a curva (AUC) do consumo de CO₂ (B; n=6-7/grupo) em camundongos machos e fêmeas (C; n= 6/grupo); AUC (D; n= 6/grupo). Animais com peso corporal pareado, após receberem uma semana de HFD; * p < 0.05. Valores expressos como média ± EPM. Dados analisados por teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos. _____ 65

Figura 20. Gasto energético em 24h, ciclo claro e escuro (A; n=6/grupo); atividade locomotora (B; n=6-7/grupo) em camundongos machos. Gasto energético em 24h, ciclo claro e escuro (C; n=6/grupo); atividade locomotora (D; n=6-7/grupo) em camundongos fêmeas (C; n= 6/grupo). Animais com peso corporal pareado, após receberem uma semana de HFD; * p < 0.05. Valores expressos como média ± EPM. Dados analisados por teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos. _____ 66

Figura 21. Deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz a sensibilidade à insulina em camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD. GTT (A; n=6); ITT (B-C; n=6) e concentrações séricas de insulina (D; n=6) de camundongos machos SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox}. GTT (E; n=5-6); ITT (F-G; n=5-6) e concentrações séricas de insulina (H; n=7) de camundongos fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox}. Dados como média ± EPM e o teste t de Student foi utilizado; *p < 0.05. Animais alimentados com HFD. _____ 67

Figura 22. Deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 de VMH aumenta a adiposidade e as concentrações plasmáticas de leptina em camundongos fêmeas. Peso do fígado, TAM e TABr dos camundongos machos SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} (A; n=6). Níveis plasmáticos de leptina nos animais machos (B; n=6). Peso do fígado, TAM e TABr de camundongos fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} (C; n= 7-10). Níveis plasmáticos de leptina em fêmeas (D; n=7) alimentados com HFD. Dados como média ± SEM e o teste t de Student bicaudal foram usados. p* <0,05 e p** <0,01 entre os grupos. _____ 68

Figura 23. Deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 do VMH reduz a temperatura do TAM e expressão gênica dos marcadores de termogênese em

camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD. Imagens termográficas de camundongos machos e fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} (A); Temperatura da cauda (B; n=6/grupo) e temperatura da pele na área ao redor do TAM (C; n=6/grupo). Expressão relativa de RNAm da *Ucp1*, *Cidea*, *Ppara* e *PGC1 α* no TAM dos camundongos machos (D; n= 5-7/grupo) e fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} (E; n= 6-7/ grupo). Dados como média \pm EPM e o teste t de Student bicaudal foi usado; p** <0.01 e *p<0,05 entre os grupos. _____ 69

Figura 24. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz parcialmente os efeitos do E2 em fêmeas OVX sobre controle do peso corporal. Peso corporal (A; n = 6/grupo); delta de peso corporal (B; n=6/grupo) e ingestão alimentar acumulada (C; n=6/ grupo) em camundongos fêmeas controle OVX ou tratados com reposição crônica de E2. Dados como médias \pm EPM. p<0.05 (*) entre os grupos determinado por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Animais alimentados com RD. _____ 71

Figura 25. Deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 de VMH atenua os efeitos do 17 β -estradiol na redução da adiposidade em camundongos fêmeas OVX. Peso do útero (A; n=6/grupo); peso do fígado (B; n=6/grupo); peso do TABr (C; n=6/grupo), TABi (D; n=6/grupo) e TAM (E; n=6/grupo) de camundongos fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} OVX ou tratadas com tratamento crônico de 17 β -estradiol (E2). Dados como médias \pm EPM. p<0.01 (**) entre os grupos determinado por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Animais alimentados com RD. _____ 72

Figura 26. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH atenua os efeitos do E2 no aumento do gasto energético. Gasto energético em camundongos fêmeas P110 α ^{flox/flox} OVX ou OVX+E2 (A; n=6/ grupo) e SF1-cre P110 α ^{flox/flox} (B; n= 6/grupo). Gasto energético durante o período de 24 horas (C; n= 6/grupo), ciclo claro (D; n= 6/grupo) ou ciclo escuro (E; n= 6/grupo) em todos os quatro grupos. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *p<0.05 entre OVX+V e OVX+E2. Teste t student não pareado bicaudal, para comparação entre médias de 2 grupos foi utilizado. _____ 72

Figura 27. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH atenua os efeitos do E2 aumento do consumo de O2. Consumo de O2 em camundongos fêmeas P110 α ^{flox/flox} OVX ou OVX+E2 (A; n=6/ grupo) e SF1-cre P110 α ^{flox/flox} (B; n= 6/grupo).

Consumo de O₂ durante o período de 24 horas (C; n= 6/grupo), ciclo claro (D; n= 6/grupo) ou ciclo escuro (E; n= 6/grupo) em todos os quatro grupos. Os dados são apresentados como média ± EPM. *p<0.05 entre OVX+V e OVX+E2. Teste t student não pareado bicaudal, para comparação entre médias de 2 grupos foi utilizado. _____73

Figura 28. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH atenua os efeitos do E2 no aumento da produção de CO₂. Produção de CO₂ em camundongos fêmeas P110 α ^{flox/flox} OVX ou OVX+E2 (A; n=6/ grupo) e SF1-cre P110 α ^{flox/flox} (B; n= 6/grupo). Produção de CO₂ durante o período de 24 horas (C; n= 6/grupo), ciclo claro (D; n= 6/grupo) ou ciclo escuro (E; n= 6/grupo) em todos os quatro grupos. Os dados são apresentados como média ± EPM. *p<0.05 entre OVX+V e OVX+E2. Teste t student não pareado bicaudal, para comparação entre médias de 2 grupos foi utilizado. _____74

Figura 29. Efeito da deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 do VMH em camundongos fêmeas OVX tratados com E2 na atividade locomotora. Atividade locomotora em camundongos fêmeas P110 α ^{flox/flox} OVX ou OVX+E2 (A; n=6/ grupo) e SF1-cre P110 α ^{flox/flox} (B; n= 6/grupo). Atividade locomotora durante o período de 24 horas (C; n= 6/grupo), ciclo claro (D; n= 6/grupo) ou ciclo escuro (E; n= 6/grupo) em todos os quatro grupos. Os dados são apresentados como média ± EPM. *p<0.05 entre OVX+V e OVX+E2. Teste t student não pareado bicaudal, para comparação entre médias de 2 grupos foi utilizado. _____74

Figura 30. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz os efeitos do E2 em fêmeas OVX na indução da termogênese. Imagem de termografia de camundongos fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/floxf} OVX ou OVX+E2 (A); Temperatura da cauda (B; n=6/grupo); temperatura da pele ao redor do TAM (C; n=6/grupo) e temperatura retal (C). Dados como médias ± EPM. *p < 0.05 entre os grupos, determinado por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey. _____75

Figura 31. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz os efeitos do 17 β -estradiol em fêmeas OVX no aumento da expressão gênica dos marcadores de termogênese. Expressão relativa de RNAm da *Ucp1* (A; n= 5-6/grupo), *Cidea* (B; n= 5-6/grupo), *Ppara* (C; n= 5-6/grupo), e *PGC1 α* (D; n= 5-6/grupo), no TAM dos camundongos fêmeas P110 α ^{flox/flox} e SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} com ou sem reposição hormonal

com E2. Dados como médias \pm EPM. * $p < 0.05$ entre os grupos, determinado por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey. _____76

Figura 32. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz os efeitos do 17 β -estradiol em fêmeas OVX na indução da atividade simpática no TAM. Níveis plasmáticos de noradrenalina (A; n=6/grupo). Concentração de noradrenalina no TAM (B; n=6/grupo). Concentração de noradrenalina no TABi (C; n=6/grupo). Dados como médias \pm EPM. * $p < 0.05$ entre os grupos, determinado por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey _____77

Figura 33. Esquema representativo dos efeitos da redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH, sobre o controle do peso corporal em camundongos machos e fêmeas desafiados com HFD; e nas ações do 17 β estradiol na homeostase energética. 85

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR.</i>	49
<i>Tabela 2. Reações de PCR para genotipagem.</i>	49
<i>Tabela 3. Condições das reações de PCR.</i>	49
<i>Tabela 4. Concentrações dos anticorpos utilizados na imunofluorescência.</i>	53

LISTA DE SIGLAS

AgRP	Proteína Relacionada à Agouti
aP2	Proteínas de ligação a lipídeos
AP-1	Proteína ativadora 1
AKT	Proteína Quinase B
AMP	Monofosfato de Adenosina
AMPK	Proteína Quinase Ativada por AMP
ARC	Núcleo Arqueado do Hipotálamo
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATGL	Lipase hormônio sensível
β AR	Receptores β adrenérgicos acoplados à proteína Gs
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
CART	Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina
CCK	Colecistoquinina
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPc
CVO	Órgão circumventricular
CIDEA	Ativador da morte celular
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DIO	Obesidade Induzida por Dieta
DM2	Diabetes mellitus do tipo 2
DMH	Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

ERE	Elemento responsivo ao estrógeno
E2	17 β estradiol
EE	Gasto energético
EM	Eminência mediana
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
ER β	Receptor de estradiol do tipo β
ER α	Receptor de estradiol do tipo α
FATP	Proteínas transportadoras de ácidos graxos
FMRP- USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FoxO1	Fator de Transcrição <i>forkhead box 1</i>
GTT	Teste de Tolerância à Glicose
Gq-mER	Receptor de estrogênio de membrana acoplado a Gq
GPR30	Receptor acoplado à proteína G30
HFD	Dieta Hiperlipídica
HMB	Hipotálamo Medial Basal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSL	Lipase de monoglicerídeo
ICV	Intracerebroventricular
IML	Coluna intermédio lateral
IP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato para o Receptor de Insulina

ITT	Teste de Tolerância à Insulina
JAK2	<i>Janus Kinase</i> - Proteína Janus Quinase 2
kcal	Quilocalorias
LepR	Receptor de Leptina
LepRb	Isoforma Longa do Receptor de Leptina
LHA	Área Hipotalâmica Lateral
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MC4R	Receptor de Melanocortina 4
MC3R	Receptor de Melanocortina 3
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NE	Norepinefrina
NIH	<i>National Institute of Health</i> – Instituto Nacional da Saúde
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do Trato Solitário
OVX	Ovariectomia
OI	Oliva inferior
pAKT	Proteína quinase B fosforilada
PPAR γ	Proliferador de peroxissoma
PGC-1 α	Co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma
PYY3-36	peptídeo YY3-36
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pten	Fosfatase supressora tumoral e homóloga a tensina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 – Quinase

PLC	Fosfolipase C
POA	Área Pré-Óptica
POMC	Proopiomelanocortina
PKA	Proteína quinase A
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RD	Dieta regular
RNAm	Ácido Ribonucleico Mensageiro
RPa	Rafe pálido
SF1	<i>Steroidogenic Factor 1</i> – Fator esteroidogênico 1
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> – Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3.
TAB	Tecido adiposo branco
T3	Triiodotironina
TABi	Tecido adiposo branco inguinal
TABr	Tecido adiposo branco retroperitoneal
TAM	Tecido adiposo marrom
UCP-1	Proteína desacopladora
VMH	Hipotálamo ventromedial
α -MSH	α - <i>Melanocyte-stimulating hormone</i> – Hormônio estimulante de melanócitos alfa
3V	Terceiro ventrículo

Sumário

1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Hipotálamo e homeostase energética	29
1.2 Ação do VMH na homeostase energética	31
1.3 Participação do E2 no controle do peso corporal	35
1.4. Participação da PI3K nos efeitos do E2 em neurônios SF1 do VMH.	37
2. Objetivos	40
2.1. Objetivo geral	40
2.2. Objetivos específicos	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. Animais	42
3.2. Procedimentos experimentais	42
3.2.2. Validação da deleção de P110 α em neurônios SF1	44
3.2.3. Efeito da deleção da subunidade catalítica da PI3K (P110 α) em neurônios SF1 no peso corporal, ingestão de alimentar, tolerância à glicose e à insulina (GTT e ITT, respectivamente) em camundongos fêmeas e machos.	44
3.2.4. Efeito da deleção da subunidade catalítica da PI3K (P110 α) em neurônios SF1 no gasto energético e termogênese do TAM em camundongos machos e fêmeas.	45
3.2.5. Efeito da deleção da subunidade catalítica da PI3K (P110 α) em camundongos fêmeas OVX, tratadas com reposição de estradiol, sobre o peso corporal, ingestão alimentar, gasto energético e termogênese do TAM.	47
3.3. Procedimentos laboratoriais	48
3.3.1. Extração de DNA e genotipagem	48
3.3.2. Teste de Tolerância à Glicose (GTT)	50
3.3.3. Teste de Tolerância à Insulina (ITT)	51
3.3.4. Registro do gasto energético	51
3.3.5. Medição da temperatura da cauda e do tecido adiposo marrom (BAT)	52

3.3.6.	Ovariectomia bilateral	52
3.3.7.	Imunofluorescência de tecido hipotalâmico	52
3.3.8.	Processamento fotomicrográfico de imunofluorescência	53
3.3.9.	Dosagem hormonal	53
3.3.10.	PCR em tempo real	54
3.3.11.	Análise Estatística	54
4.	RESULTADOS	56
4.1.	Genotipagem de camundongos com deleção específica de P110 α em neurônios SF1 do VMH.	56
4.2.	Validação da deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 após estímulo com insulina central.	56
4.3.	Deleção da P110 α em neurônios SF1 do VMH não afeta o peso corporal de animais submetidos à dieta regular (RD).	58
4.4.	Deleção da subunidade P110 α nos neurônios SF1 do VMH diminui o gasto energético em machos alimentados com RD.	59
4.5.	Redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH não afeta a homeostase da glicose em animais submetidos à dieta regular.	60
4.6.	Redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH não afeta o peso do fígado, TAB, TAM e concentrações séricas de leptina.	61
4.7.	Redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH causa prejuízo nas respostas adaptativas de proteção contra a obesidade induzida pela dieta de animais submetidos à HFD de uma maneira sexo-específica.	62
4.8.	Deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz o gasto energético em camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD.	63
4.9.	Deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz a sensibilidade à insulina em camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD.	66
4.10.	Deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 de VMH aumenta a adiposidade e as concentrações plasmáticas de leptina em camundongos fêmeas.	67

4.11. Deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 do VMH reduz a temperatura do TAM e expressão gênica dos marcadores de termogênese em camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD.	68
4.12. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz parcialmente os efeitos do 17 β -estradiol (E2) em fêmeas OVX no controle do peso corporal.	69
4.13. Deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 de VMH atenua os efeitos do 17 β -estradiol na redução da adiposidade em camundongos fêmeas OVX.	71
4.14. Deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH atenua os efeitos do 17 β -estradiol no aumento do gasto energético.	72
4.15. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz os efeitos do 17 β -estradiol em fêmeas OVX na indução da termogênese.	75
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÃO	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS	101
Anexo A- Artigos publicados	102
Anexo B- Manuscrito	110

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipotálamo e homeostase energética

A obesidade é caracterizada como um balanço energético positivo de longo prazo, em que há o aumento da ingestão alimentar e diminuição do gasto energético, tornando-se um fator de risco para o desenvolvimento de comorbidades, tais como doenças cardiovasculares (KIM et al., 2015), diabetes mellitus tipo 2, alguns tipos de câncer (CALLE et al., 2003) e distúrbios musculoesqueléticos (WERING et al., 2006). Fatores ambientais, genéticos e hábitos de vida contribuem para a patogênese da obesidade, e a redução do peso corporal em indivíduos obesos requer adaptações homeostáticas que ocorrem por meio de restrição calórica voluntária e a prática de exercício físico, que exigem grandes esforços, dificultando a perda de peso, aumentando a prevalência da obesidade.

A homeostase energética ocorre por meio de ajustes fisiológicos que requerem a integração de vários sinais periféricos e centrais. Neste processo, o sistema nervoso central (SNC) desempenha um importante papel crucial na regulação do peso corporal (NARAYANASWAMI E DWOSKIN, 2017). No SNC, o hipotálamo é o grande regulador da homeostase, e o núcleo arqueado (ARC) presente nesta estrutura é essencial para o controle da ingestão alimentar e do gasto energético (MYERS E OLSONI, 2012). Este núcleo está localizado próximo à eminência mediana, um órgão circumventricular (CVO) rico em capilares fenestrados e desprovido de barreira hematoencefálica (BHE), que permite uma interação entre os componentes presentes no sangue com as estruturas centrais, facilitando o transporte de hormônios e sinais nutricionais para o ARC (RODRIGUEZ et al., 2010).

No ARC existem dois grandes grupos de neurônios que quando ativados possuem efeitos opostos para coordenar a homeostase energética; um grupo de neurônios que expressam AgRP (proteína relacionada a agouti) e NPY (neuropeptídeo Y), neuropeptídeos com efeitos orexígenos (estimulam o apetite), e um outro grupo de neurônios que expressam POMC (pró-opiomelanocortina) e CART (transcrito regulado pela cocaína e anfetamina), neuropeptídeos com efeitos anorexígenos (que diminuem o apetite e estimulam a saciedade), (BROBERGER et al., 1998; ELIAS et al., 1998, 1999; GROPP et al., 2005; BALTHASAR et al., 2005). Sinais endócrinos periféricos exercem seus efeitos através deste sistema, em curto e longo prazo. A insulina, por exemplo, exerce seu papel central como um sinal de adiposidade de longo prazo e

tem efeito anorexígeno por meio da estimulação dos neurônios POMC/CART, bem como, a inibição dos neurônios AgRP (BELL et al., 2005). Por outro lado, o peptídeo orexígeno grelina, secretado principalmente pelo estômago, tem seus níveis séricos aumentados durante o jejum e estimula o apetite, havendo diminuição de sua concentração após a ingestão alimentar (HAGEMANN et al., 2003). Outro modulador periférico é o peptídeo YY3-36 (PYY3-36), secretado pelo trato gastrointestinal distal que se liga aos receptores Y2 pré-sinápticos nos neurônios NPY, inibindo sua ação (SCOTT et al., 2005). A saciedade também é mediada pela resposta a outros fatores, como a distensão do intestino delgado que resulta na liberação do peptídeo colecistoquinina (CCK) (BELL et al., 2005). Além disso, dentre estes hormônios regulatórios da ingestão alimentar, a leptina é um dos principais moduladores da atividade dos neurônios orexígenos e anorexígenos em longo prazo (ELIAS et al., 1998, 1999).

Produzida pelo tecido adiposo branco (TAB) a proteína leptina desempenha papel essencial para a regulação do apetite e gasto energético. Sua secreção sinaliza ao SNC (centros regulatórios do hipotálamo) os níveis de estoque energético e estado nutricional do indivíduo (ZHANG et al., 1994; SCHWARTZ et al., 2000) e sua concentração plasmática aumenta após a refeição e reduz durante o período de jejum, induzindo respostas regulatórias como o aumento ou diminuição da termogênese dos adipócitos brancos do TAB e tecido adiposo marrom (TAM), bem como a saciedade (AHIMA et al., 1996; AHIMA, 2006). Para induzir sua resposta, a leptina se liga ao seu receptor LepR que possui diferentes isoformas, sendo o receptor de isoforma longa, denominado LepRb o único que possui domínio intracelular de transmissão de sinal para dentro da célula e está presente em distintos tecidos e órgãos (TARTAGLIA et al., 1995; BJØRBAEK et al., 1997; WADA et al., 2014). No hipotálamo, este receptor é amplamente expresso em diversos núcleos tais como, o ARC, núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), hipotálamo ventromedial (VMH), hipotálamo dorsomedial e no hipotálamo lateral (DMH e AHL) que desempenham importante função para a regulação do balanço energético (ELMQUIST et al., 1998; BASKIN et al., 1999; STERNSON et al., 2005; STERNSON et al., 2005; TUNG et al., 2008; PATTERSON et al., 2011).

Os neurônios POMC quando ativados por estímulos hormonais anorexígenos, projetam disparos com liberação do hormônio melanócito estimulante (α MSH) que ativa seus receptores (MCR 3/ MCR4) presentes principalmente no PVN que por sua vez, conduzem a ativação simpática (STE MARIE et al., 2000; VOSS-ANDREAE et al., 2007; ROH et al., 2016). Entretanto, também ocorrem projeções dos neurônios POMC para outras regiões do hipotálamo tais como o DMH, LH e VMH (KLEINRIDDERS et al., 2009; WATERSON E HORVATH, 2015). Esses neurônios de segunda ordem processam a informação recebida e direcionam-se

para neurocircuitos extra hipotalâmicos distintos, conduzindo a uma resposta integrada para promover a homeostase energética. O VMH, por exemplo, desempenha importante função no controle do peso corporal ao induzir o aumento do gasto energético, por meio da indução da termogênese do tecido adiposo (MICHAELIDES, 2016). Estudos demonstram que a injeção direta da leptina no VMH, aumenta a captação de glicose pelo músculo esquelético, coração e TAM, e que este aumento da captação de glicose é bloqueada pela denervação simpática, sugerindo que a sinalização de peptídeos orexígenos como a leptina, desempenha importante função na mediação do tônus simpático para o tecido periférico, por meio da modulação da atividade dos neurônios do VMH (HETHERINGTON E RANSON, 1940; KAKOHARA et al., 1997; HAQUE et al., 1999; TODA et al., 2009; KIM et al., 2011).

1.2 Ação do VMH na homeostase energética

O núcleo VMH é constituído por grupos de neurônio presentes no hipotálamo médio basal (HMB), localizado adjacente ao terceiro ventrículo (3V) e acima do ARC, eminência mediana (EM) e glândula pituitária (HEIMER E NAUTA, 1969). Um número de genes tem sido identificado nesta estrutura hipotalâmica, demonstrando possuírem importância para sua formação, bem como para as conexões neuronais. O fator esteroidogênico do receptor nuclear 1 (SF1), expresso em populações de neurônios do VMH, por exemplo, é um regulador essencial de muitos genes envolvidos na esteroidogênese e reprodução, e são expressos no VMH, na qual são importantes para o desenvolvimento e função deste núcleo (IKEDA et al., 1995; SHINODA et al., 1995; PARKER et al., 2002; ZHAO et al., 2008). Estudos demonstraram, também, que os neurônios SF1 do VMH são de extrema importância para o controle energético e que lesões nesta área ou a deleção de SF1, promovem diminuição do gasto calórico resultando em obesidade (KING, 2006; MAJDIC et al., 2002). Os receptores de leptina são fortemente expressos neste núcleo do hipotálamo (ELMQUIST et al., 1998), e o VMH é sensível a mudanças na sinalização hormonal e estado metabólico (RUUD et al., 2016). O hormônio anorexígeno leptina, por exemplo, aumenta o disparo dos neurônios do VMH e a deleção do receptor *Lepr^b* em neurônios positivos para SF1 resulta em hiperfagia, redução do gasto energético e consequente aumento do peso corporal em camundongos geneticamente modificados (DHILLON et al., 2006; BINGHAM et al., 2008).

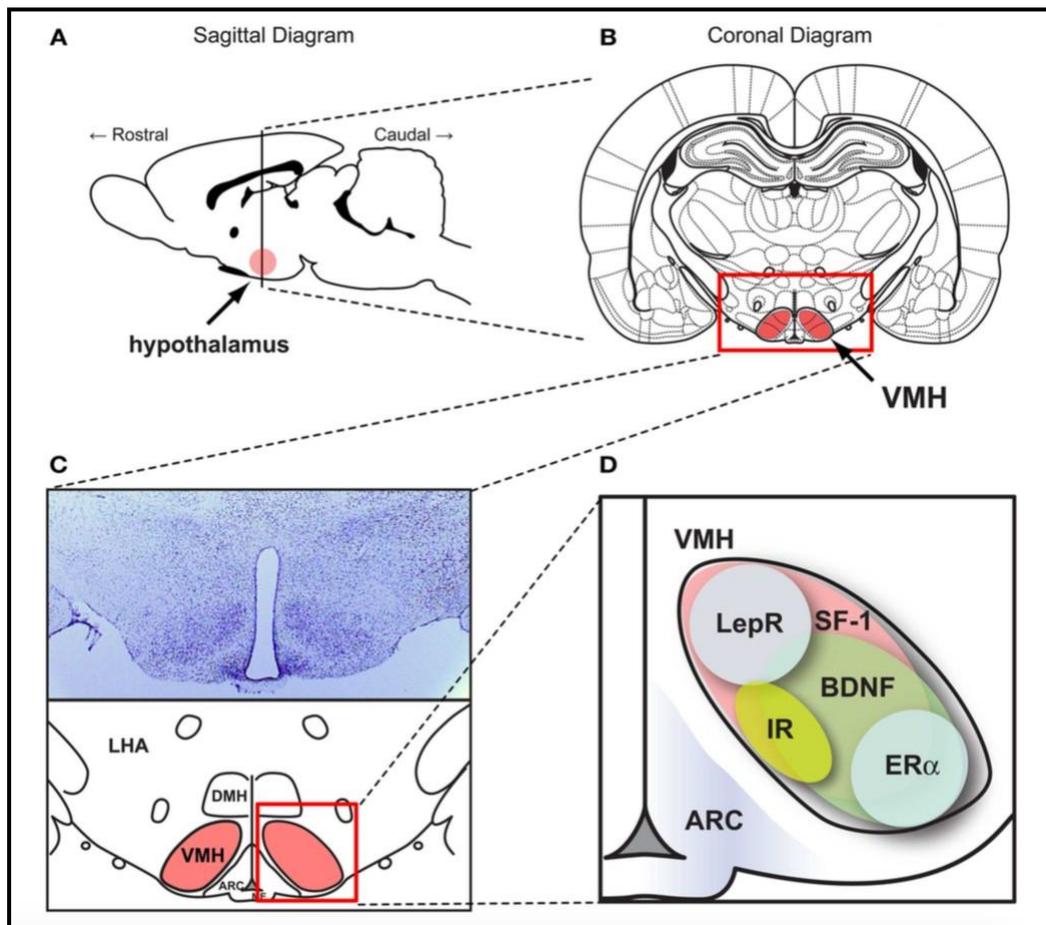


Figura 1. Esquema anatômico e subpopulações neuronais do VMH. (A) Localização hipotalâmica no SNC em corte sagital. (B) Localização do VMH em corte coronal. (C) (Acima) Secção coronal do hipotálamo com marcação para Nissl e (abaixo) ampliação da área demonstrada em (B). (D) Esquema representativo dos padrões de genes expressos no VMH. ARC, núcleo arqueado do hipotálamo. DMH, núcleo dorsomedial do hipotálamo. LHA, área hipotalâmica lateral. VMH, núcleo ventromedial do hipotálamo. BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro. ER α , receptor alfa de estradiol. IR, receptor de insulina. LepR, receptor de leptina. SF1, fator esteroideogênico 1 (CHOI et al., 2013).

O avanço na compreensão do papel dos neurônios SF1 do VMH na homeostase energética ocorreu após a geração de duas linhagens independentes de camundongos com expressão da enzima Cre recombinase sob o controle do promotor do gene Sf1, os camundongos SF1-cre (DHILLON et al., 2006; BINGHAM et al., 2008). Esses animais foram utilizados em diferentes estudos para geração de animais com deleção condicional de diferentes genes implicados na homeostase energética, utilizando a metodologia cre-lox.

Por meio dessa tecnologia, diferentes modelos com animais geneticamente modificados demonstraram que o VMH é importante para atenuar a obesidade induzida por dieta (DIO). A deleção de LepR em neurônios SF1 do VMH, por exemplo, causa aumento do peso corporal

em camundongos apenas quando submetidos à HFD (DHILLON et al., 2006; BINGHAM et al., 2008). Essa mesma resposta foi constatada com a deleção de moléculas como o receptor alfa de estradiol (ER α) e sirtuína 1 (SIRT1) especificamente em neurônios SF1 (RAMADORI et al., 2011; XU et al., 2011). Todos esses achados enfatizam o papel dos neurônios SF1 do VMH em mediar efeitos de proteção no ganho do peso corporal em situações de aumento do consumo calórico.

Outra ação dos neurônios do VMH na regulação da homeostase energética é induzir a termogênese facultativa independente de tremor no TAM, considerado um importante efector termogênico em mamíferos (CANNON E NEDERGAARD, 2004). O TAM localiza-se nas regiões interescapular, subescapular, axilar, peri-renais e peri-aórtica em roedores (LABBÉ et al., 2015a-b). E em humanos encontra-se nas regiões subescapular, cervical, peri-espinhal, mediastinal, peri-aórtica, pericárdica e peri-adrenal e possui a capacidade de metabolizar cerca de 50% do triacilglicerol e 75% da glicose ingerida (CANNON E NEDERGAARD, 2004; LIDELL et al., 2014). Além disso, Labbé et al (2015a), demonstraram que o conteúdo de triacilglicerol presentes nas pequenas gotículas do TAM contribuem com cerca de 84% para a termogênese durante um desafio agudo como a exposição ao frio (LABBÉ et al., 2015b).

O processo de termogênese é dependente da ativação simpática (BARTNESS et al., 2010a; BARTNESS E RUY, 2015b) e os adipócitos marrons são ricamente inervados e expressam grande quantidade de receptores β adrenérgicos acoplados à proteína Gs (β AR) (CANNON E NEDERGAARD, 2004; BARTNESS et al., 2010a; RICHARDE PICARD, 2011). A liberação da norepinefrina (NE) pelas fibras simpáticas pós-ganglionares eferentes e a ligação do transmissor aos receptores β_3 , conduz a ativação da adenilil ciclase, que catalisa o trifosfato de adenosina (ATP), levando a produção do segundo mensageiro adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPC), que ativa a proteína quinase A (PKA). A ativação desta proteína, por sua vez, fosforila as enzimas citosólicas como a lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL), lipase hormônio sensível (HSL) e lipase de monoglicerídeo, que induzem a formação de ácidos graxos livres por meio da hidrólise do triacilglicerol (BACHMAN et al., 2002; JIMENEZ et al., 2002; LOWELL E BACMAN, 2003). A ativação da PKA também ocasiona a fosforilação de proteínas nucleares, como o fator de transcrição CREB (proteína de ligação responsiva ao AMPC), o qual aciona a transcrição de genes como o da proteína desacopladora 1 (UCP-1) (COLLINS et al., 2010).

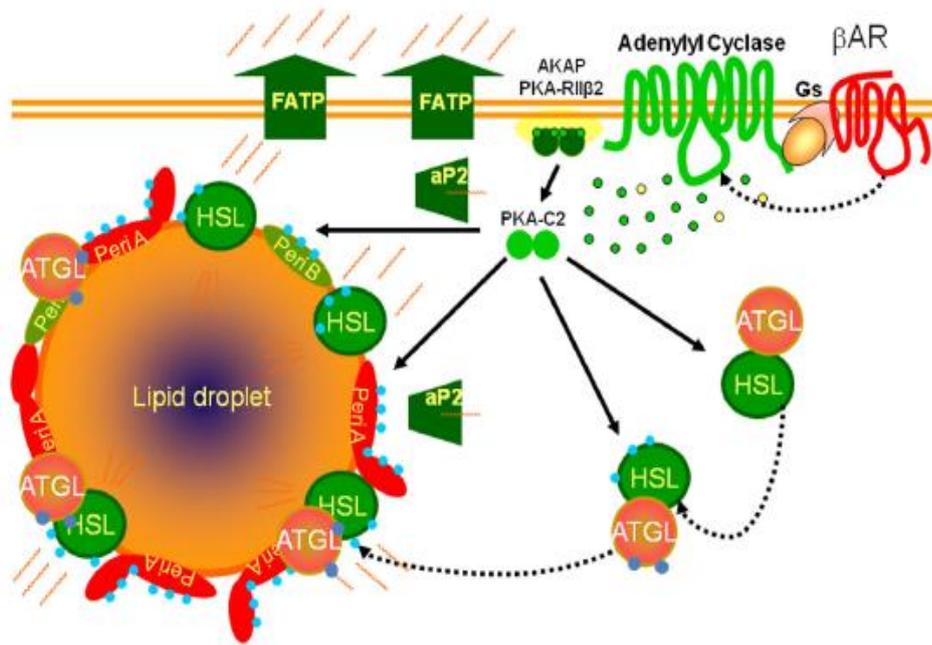


Figura 2. Esquema representativo da cascata de sinalização intracelular mediada por receptores β AR, controlando a lipólise em adipócitos. Os β ARs ativam a adenilil ciclase através de seu acoplamento aos Gs heterotrimericos, produzindo cAMP (pontos verdes) a partir de ATP (pontos amarelos) para ativar a proteína quinase dependente de cAMP (PKA), permitindo que as subunidades catalíticas (PKA-C2) sejam liberadas da holoenzima ancorada à membrana plasmática (AKAP). A PKA fosforila (pontos azuis) lipases (HSL: lipase hormônio sensível) e proteínas de ligação de gotículas lipídicas, como perilipinas (Peri A; Peri B). A lipase triglicéridica adiposa (ATGL) é fosforilada, mas não pela PKA. Os ácidos graxos liberados dos triglicéridos são escoltados para fora da célula por proteínas de ligação a lipídeos (aP2) e exportados por meio de proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP) (COLLINS, 2012).

Embora grande parte dos ácidos graxos formados possam ser degradados pelos peroxissomos, a maior parte é transportada para a mitocôndria onde contribuem para a termogênese e aumentam a atividade e expressão da UCP1, que desacopla o transporte de elétrons mitocondrial da síntese de ATP (CANNON E NEDERGAARD, 2004). Para mediar este efeito, a UCP1 atua como um carreador de ácidos graxos para o espaço intermembrana que posteriormente, retornam passivamente para a matriz mitocondrial, onde são oxidados e liberam prótons, como os íons H^+ , gerando e dissipando calor (SKULACHEV, 1991; SHULACHEV, 1998). Além disso, a administração de agonistas β adrenérgicos também induz o “escurecimento” do TAB, tornando-se mais semelhante ao TAM (OLFIELD et al., 2002; CONTRERAS et al., 2014; BARTNES E RUY et al., 2015; LÓPEZ et al., 2015).

Além da ativação da via da PKA por meio dos receptores β_3 , que aumentam a ativação das lipases responsáveis pela mobilização e degradação do triacilglicerol, a ativação dos receptores β_3 adrenérgico também ativa outras quinases nos adipócitos, tais como quinase regulada por

sinais extracelulares (ERK), proteína quinase Ativada por Mitógeno P38 (MAPK P38 e monofosfato de Adenosina (AMP) (COLLINS et al., 2004; GAUTHIER et al., 2008; OMAR et al., 2008). A ativação da MAPK P38 por exemplo, que é independente da atividade de PKA, conduz a expressão de genes diretamente envolvidos com o processo de escurecimento dos adipócitos bebes do TAB, como a UCP 1 e o Co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α), que é altamente expresso no TAB (BOSTROM et al., 2012).

A ativação de neurônios do VMH, induz o acionamento de disparos simpáticos para o TAM (XU et al., 2018), entretanto, os mecanismos intracelulares pelos quais essa ativação ocorre não são totalmente compreendidos. Por outro lado, sabe-se que sua ativação aumenta os disparos dos neurônios dos núcleos de rafe pálido (RPa) e oliva inferior (OI), que enviam projeções diretas aos neurônios da coluna intermédia lateral (IML) na medula espinhal e em seguida para o tecido adiposo, ocorrendo liberação de NE (XU et al., 2018).

O VMH integra distintos sinais hormonais que podem modular a termogênese do TAM induzida por atividade simpática. Embora haja evidências que a leptina medeia a termogênese do TAM, as vias moleculares que induzem os disparos dos neurônios do VMH para mediar ativação simpática não são totalmente conhecidas. Porém, trabalhos têm evidenciado a participação do transdutor de sinal e ativador transcricional 3 (STAT3) e a ativação do fosfatidilinositol quinase 3 (PI3K) em neurônios SF1 na modulação simpática (BATES et al., 2003; HILL et al., 2008). Dentre os hormônios que são capazes de modular a atividade dos neurônios SF1 do VMH, o hormônio 17 β estradiol (E2) semelhante a leptina também atua de maneira significativa para manutenção da homeostase energética (DUBUC, 1985).

1.3 Participação do E2 no controle do peso corporal

O E2 desempenha importante função no adequado funcionamento do sistema reprodutivo, esquelético, SNC e cardiovascular. Similar à leptina, o hormônio gonadal, reduz a ingestão alimentar, adiposidade corporal e aumenta o gasto energético em animais de ambos os sexos, por meio da ativação do receptor ER α , presente em núcleos hipotalâmicos que promovem a homeostase energética (BUTERA et al., 1984; XU et al., 2010; MARAGON et al., 2014). Este hormônio também previne o acúmulo de adiposidade e exerce efeitos anti-inflamatórios nos adipócitos, que em situações de obesidade apresentam perfil pró-inflamatório (MAUVAIS-JARVIS, 2013; LÓPEZ et al., 2015).

Homens e mulheres diferem em relação à distribuição da adiposidade corporal, perfil secretório endócrino e de como o cérebro responde à sinalização hormonal que regula a ingestão e peso corporal (CLEGG et al., 2003a, b, c). O dimorfismo sexual na distribuição do tecido adiposo torna-se evidente após a puberdade, em que mulheres acumulam tecido adiposo na região subcutânea (HE et al, 2002; TAYLOR et al 2010). Por outro lado, em homens há uma distribuição de adiposidade visceral, que está relacionada aos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DEMERATH, et al., 2007). Entretanto, esse dimorfismo sexual, diminui com a redução da produção do E2 que ocorre com a menopausa (falência ovariana) e mulheres tendem a acumular mais adiposidade visceral tornando-se vulneráveis a comorbidades associadas à obesidade, como doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (GOOFMAN-GRUEN et al., 1996; CAMHI et al., 2011)

As respostas intracelulares mediadas pelo E2 são divididas em duas categorias, que consistem em genômicas, caracterizada pela ativação da transcrição gênica, que ocorre em um período de horas ou dias após a ligação do hormônio ao receptor localizado no núcleo; e não genômicas, que ocorrem dentro de segundos a minutos após o E2 se ligar ao seu receptor presente na membrana (REVANKAR et al., 2005). As ações genômicas ocorrem via ativação dos receptores ER α e ER β , que quando desacoplados de suas chaperonas no núcleo, os dímeros do receptor reconhecem e se ligam ao elemento responsivo ao estrógeno (ERE) no promotor do gene alvo (HAMMES et al., 2007). Todavia, sabe-se que os estrogênios são capazes de efetuar efeitos genômicos por meio de outros elementos responsivos como, AP-1 (proteína ativadora 1), o fator transcricional CREB e outros fatores de transcrição (EDWARDS, 2005). Já na via não genômica, a ligação do E2 aos seus receptores de membrana, ER α , receptor de estradiol do tipo β (ER β), receptor de estrogênio de membrana acoplado a Gq (Gq-mER) e receptor acoplado à proteína G30 (GPR30), aciona sinalizações intracelulares rápidas, como a via envolvendo PLC que induz aumento rápido do influxo de Ca⁺ e a ativação de MAPKs (PIETRAS et al., 2001; MICEVYCH & KELLY, 2012).

A importância do hormônio E2 para promover o aumento do gasto energético via sua ação no VMH, foi constatada por um estudo realizado por Xu et al 2011. Neste trabalho, os pesquisadores evidenciaram que a deleção dos receptores ER α em neurônios SF1, promove aumento do peso corporal, adiposidade visceral, redução do metabolismo basal, bem como diminuição da expressão dos marcadores de termogênese do TAM, como a proteína UCP1, em fêmeas. Demonstrando que o hormônio ovariano via seu receptor ER α , age nessa população de neurônios para aumentar o gasto energético (XU et al., 2011). Por outro lado, há poucos trabalhos que demonstrem os mecanismos intracelulares mediados pelo E2 no VMH,

para o controle do peso corporal. Neste contexto, cabe ressaltar que assim como a sinalização da PI3K tem sido demonstrada como um elemento chave para as ações anti-obesogênicas exercidas pela leptina no hipotálamo, esta via também pode estar envolvida nas ações do hormônio ovariano na homeostase energética.

1.4. Participação da PI3K nos efeitos do E2 em neurônios SF1 do VMH.

A enzima PI3K de classe IA forma um heterodímero funcional composto por duas subunidades, uma catalítica e outra reguladora com peso molecular de 110 kDA (p110) e 85 kDA (p85) respectivamente. A subunidade catalítica da PI3K possui quatro diferentes isoformas (P110 α , β , γ e δ , também conhecidas como PI3KCA, PI3KCB, PI3KCG e PI3KCD, respectivamente), que desempenham efeitos distintos (SÁNCHEZ-ALEGRÍA et al., 2018). A ativação da PI3K catalisa a conversão do fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (IP3), que estimula a fosfolipase C (PLC) e recruta a proteína quinase B, (Akt) que por sua vez, participa de várias respostas celulares, incluindo sobrevivência celular, proliferação, regulação da expressão gênica e metabolismo. Cabe ressaltar que a via da PI3K altera propriedades celulares de maneira rápida por meio da fosforilação de proteínas, podendo por exemplo, aumentar a despolarização da membrana dos neurônios (QIU et al., 2010a; QIU et al., 2014b).

No ARC já foi evidenciado que a leptina despolariza neurônios POMC de maneira PI3K dependente (QIU et al., 2010). A participação da via de sinalização da PI3K nas ações da leptina foi demonstrada inicialmente por NISWENDER et al, (2001), cujo estudo demonstrou que a administração sistêmica de leptina em ratos ativa a PI3K no hipotálamo e que a injeção intracerebroventricular (Icv) de inibidores dessa enzima previne a hipofagia induzida pelo hormônio. Ademais, a deleção do gene da fosfatase supressora tumoral e homóloga a tensina (Pten), um regulador negativo da via IRS/PI3K, em neurônios que expressam os receptores LepR, resulta na redução da massa adiposa e aumento da atividade simpática para o TAM em camundongos (PLUM et al., 2007). Além disso, um importante trabalho realizado por Xu et al 2010, demonstrou que a deleção da isoforma catalítica P110 α em neurônios SF-1 do VMH, promove obesidade em machos submetidos à dieta hipercalórica (HDF), bem como que há uma redução acentuada do gasto energético. Neste trabalho também foi evidenciado que a ausência da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF-1, bloqueia o efeito da leptina em reduzir o peso corporal e aumentar o gasto energético (XU et al., 2010).

Assim como, a sinalização da PI3K tem sido demonstrada como um elemento chave para as ações anti-obesogênicas exercidas pela leptina no hipotálamo, esta via também pode estar

envolvida nas ações do hormônio ovariano. Malyala et al 2008, por exemplo, demonstraram por meio de hibridização *in situ*, que o E2 aumenta a expressão do ácido ribonucleico Mensageiro (RNAm) da subunidade catalítica da PI3K no VMH, contudo ainda não foi demonstrado em qual população neuronal, bem como, sobre qual é a importância fisiológica desta via de ativação (MALYALA et al., 2008). Além disso, uma única dose de injeção subcutânea do E2 aumenta de maneira significativa a fosforilação da AKT no VMH, mas não no Arc (PARK, et al., 2011). Um estudo realizado por Saito também sugere que no VMH o E2 recruta a via da PI3K para regular o peso em camundongos fêmeas, por meio do aumento da atividade locomotora. Entretanto, até o presente momento a importância do recrutamento desta via de sinalização intracelular pelo hormônio E2 em neurônios SF1 do VMH no controle da homeostase energética permanece pouco explorada.

De forma a preencher essas lacunas, o presente trabalho buscou estudar em camundongos machos e fêmeas, os efeitos da deleção condicional da subunidade catalítica da PI3K (P110 α) especificamente em neurônios SF1 do VMH sobre a homeostase energética e assim, avaliar a possível participação desta via no VMH na proteção contra a DIO e nas ações do E2 no controle do peso corporal.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a participação da via de sinalização da PI3K em neurônios SF1 do VMH na homeostase energética e nas ações do E2 no controle do gasto energético.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o peso corporal, ingestão alimentar e homeostase glicêmica em camundongos com deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 do VMH com dieta regular (RD) e hiperlipídica (HFD).
- ✓ Avaliar o gasto energético em camundongos com deleção da P110 α em neurônios SF1 do VMH com dieta regular (RD) e hiperlipídica (HFD).
- ✓ Avaliar a termogênese em camundongos com deleção da P110 α em neurônios SF1 do VMH com dieta hiperlipídica (HFD).
- ✓ Avaliar o efeito da reposição hormonal com 17 β estradiol em fêmeas ovariectomizadas e com deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 do VMH, sobre o peso corporal, ingestão alimentar e gasto energético.
- ✓ Avaliar o efeito da reposição hormonal com 17 β estradiol em camundongos fêmeas OVX e com deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF-1 do VMH sobre a termogênese e atividade simpática do TAM.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos geneticamente modificados SF1-cre (Jackson Laboratory), P110 α ^{flox/flox} (cedidos pela Professora Dra. Carol Elias da Universidade de Michigan, EUA).

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) em microisoladores (Alesco) (19x27x13 cm), com água e ração *ad libitum*. O ambiente, onde os animais foram alojados apresenta temperatura controlada de 25 \pm 2°C e regime de luz com ciclo claro-escuro de 12/12 horas (Claro: 6:00h às 18:00h).

Os procedimentos experimentais descritos abaixo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 076/2019) da FMRP-USP, que se baseia nas normas do “*Guide for the care and use of laboratory animals*” publicado pelo US National Institute of Health (NIH, Publication N°85-23, revisado em 1996) e na legislação brasileira para a experimentação animal.

3.2. Procedimentos experimentais

3.2.1. Geração de camundongos com deleção específica da subunidade catalítica P110 α da PI3K em neurônios SF-1 do VMH.

A fim de promover a deleção específica da subunidade catalítica P110 α da PI3K em neurônios SF1, foi utilizada a metodologia Cre-lox. Essa técnica de deleção sítio-específica consiste no cruzamento entre camundongos que apresentam um éxon do gene alvo, neste caso o P110 α , flanqueado por duas sequências LoxP (animais P110 α ^{flox/flox}) com camundongos que expressam o gene que codifica a enzima Cre-recombinase, sob o controle de um promotor específico de interesse, neste caso o promotor do gene *SF1* (animais SF1-cre). A recombinase reconhece a região do genoma flanqueada pelas duas sequências LoxP e a remove do genoma do animal (animais SF1-cre;P110 α ^{flox/flox}) (GAVÉRIAUX-RUFF & KIEFFER, 2007; HARNO et al., 2013) (Figura 3).

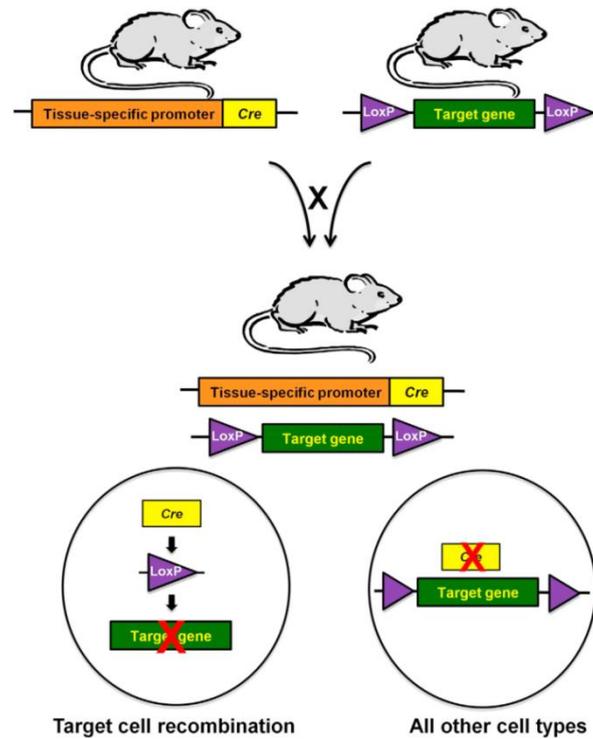


Figura 3. Esquema ilustrativo da metodologia Cre-lox para geração de animais com deleção condicionada (extraída de HARNO et al., 2013).

Para a geração de camundongos com deleção específica da subunidade P110 α da PI3K em neurônios SF1, inicialmente, animais P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ foram acasalados com camundongos SF1-cre(cre/+), para a obtenção de camundongos SF1-cre(cre/+); P110 $\alpha^{\text{flox/+}}$ e P110 $\alpha^{\text{flox/+}}$ (cruzamento 1). Posteriormente animais SF1-cre(cre/+); P110 $\alpha^{\text{flox/+}}$ foram acasalados com animais P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$, para a obtenção de animais SF1-cre(cre/+); P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ e P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ (cruzamento 2). Esses últimos foram acasalados entre si, gerando animais experimentais (SF1-cre(cre/+); P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$) e animais controles (P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$) na proporção de 50% para cada (Figura 4).

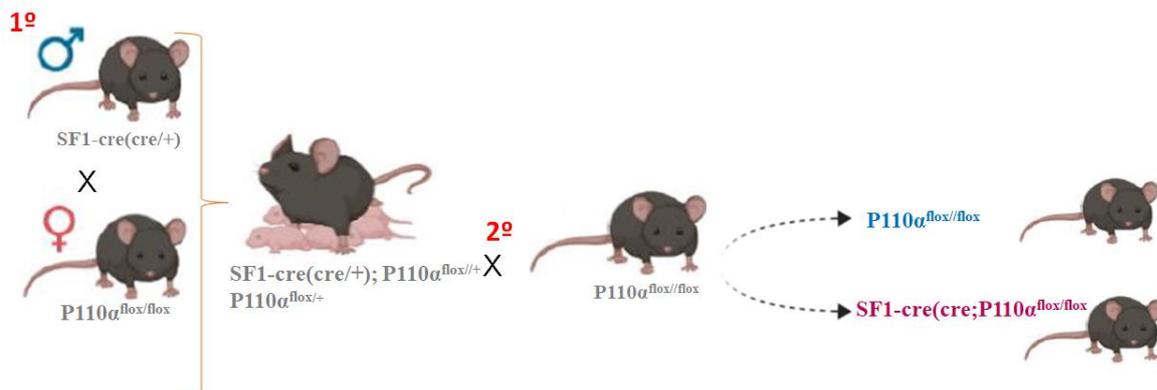


Figura 4. Esquema da geração de camundongos SF1-cre;P110 α flox/flox. Figura elaborada em: <https://biorender.com/>.

3.2.2. Validação da deleção de P110 α em neurônios SF1

Para comprovar a deleção específica da subunidade catalítica P110 α foram utilizados camundongos SF1-cre(cre/+); P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} (controle) com 16 semanas de idade, alimentados com dieta regular (RD) (Quimtia S/A, Nuvilab CR-1 – 3,85 kcal/g, sendo 10% de lipídios, 20% de proteína e 70% de carboidrato).

Os animais foram colocados em caixas individuais e submetidos a cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula no ventrículo lateral. Após sete dias de recuperação, os camundongos foram submetidos a 12h de jejum e posteriormente receberam insulina ICV na dose de 4,4 mU/2 μ l (SAHU et al., 2017). Trinta minutos após a injeção central de insulina, os animais foram anestesiados com solução contendo ketamina (100 mg/Kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal). Após a ausência de reflexos raqui-medulares, foram submetidos à perfusão do encéfalo e os cérebros foram removidos, pós-fixados em PFA 4% por 1 hora a 4°C e crioprottegidos em sacarose 30% diluída em PB 0,1 M a 4°C, por quatro dias. Após a crioproteção, foi realizada a obtenção das secções coronais de 30 μ m, em criostato (Modelo Leica CM1850) de toda a extensão rostro-caudal do VMH, seguindo as coordenadas do atlas de FRANKLIN & PAXINOS, (2008). Após a obtenção dos tecidos das áreas de interesse, os cortes foram armazenados em solução crioprotetora a -20°C onde permaneceram até o processamento de imuno-histoquímica para pAKT.

3.2.3. Efeito da deleção da subunidade catalítica da PI3K (P110 α) em neurônios SF1 no peso corporal, ingestão de alimentar, tolerância à glicose e à insulina (GTT e ITT, respectivamente) em camundongos fêmeas e machos.

Após 21 dias do nascimento, os camundongos foram desmamados. Fêmeas e machos SF1-cre(cre/+);P110 α ^{flox/flox} e seus controles (P110 α ^{flox/flox}) foram colocados em caixas individuais com RD ou HFD (Research Diets, D12492 – 5,21 kcal/g, sendo 60% de lipídios, 20% de proteínas e 20% de carboidratos) e água *ad libitum*. O peso corporal e a média da ingestão alimentar foram avaliados uma vez por semana durante 18 a 20 semanas. Na 10^a semana foi realizado o GTT (teste de tolerância à glicose) e, na 11^a semana, o ITT (teste de tolerância à insulina) dos animais alimentados com RD e HFD utilizando um glicosímetro (Accu-check

Active). Para o GTT e ITT, os animais permaneceram previamente em jejum por 12 horas e 5 horas, respectivamente. Entre a 18^a e a 20^a semana, os animais foram submetidos a um jejum de 5h e eutanasiados para coleta de sangue para dosagens hormonais (leptina, insulina, corticosterona, testosterona e norepinefrina) e mensurado o peso do tecido adiposo branco retroperitoneal (TABr), tecido adiposo branco inguinal (TABi) fígado e tecido TAM (Figura 5).

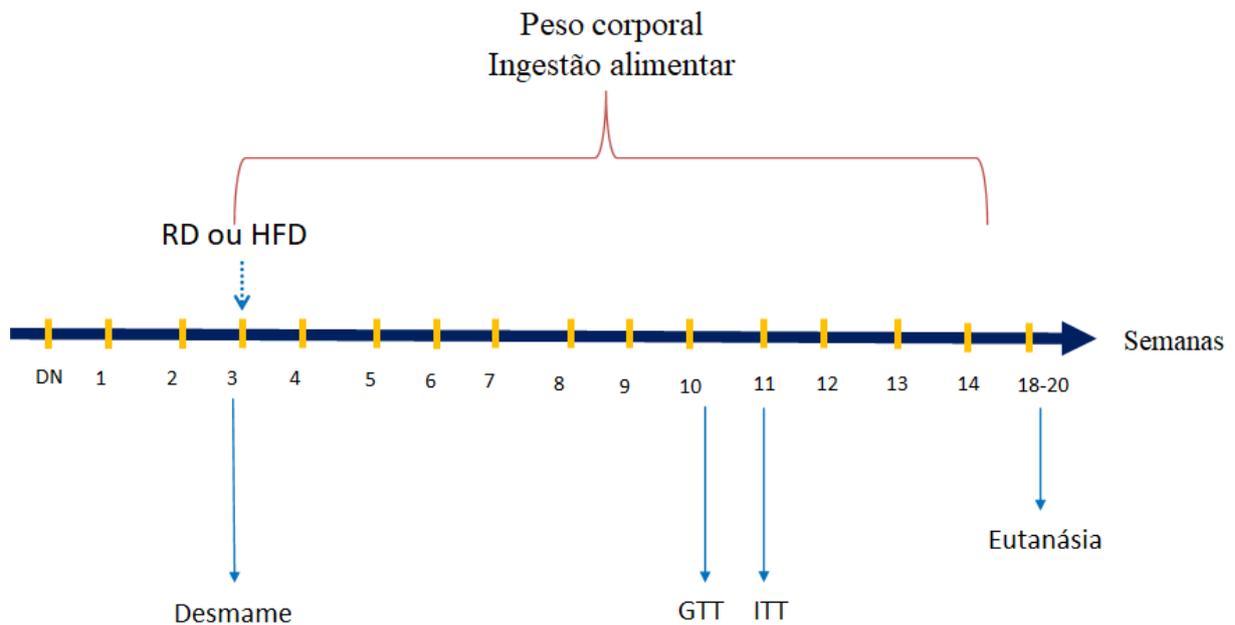


Figura 5. Protocolo experimental 1.

3.2.4. Efeito da deleção da subunidade catalítica da PI3K ($P110\alpha$) em neurônios SF1 no gasto energético e termogênese do TAM em camundongos machos e fêmeas.

Machos e fêmeas SF1-cre(cre/+); $P110\alpha^{\text{flox/flox}}$ e seus controles ($P110\alpha^{\text{flox/flox}}$) alimentados com RD foram submetidos a análise do gasto energético com 18 semanas de vida. O registro metabólico foi realizado usando um Sistema Compreensivo de Monitoramento de Animais de Laboratório (Oxymax-CLAMS, Columbus-OH-USA), que permite o monitoramento automatizado, não invasivo e simultâneo da atividade locomotora horizontal e vertical, consumo de oxigênio (VO_2), produção de produção de dióxido de carbono (VCO_2) e o gasto energético (EE). Todos os animais foram aclimatados à gaiola metabólica de monitoramento

por dois dias, seguido por 1 dia de registro dos parâmetros, sob o ciclo claro-escuro regular de 12 horas e a temperatura ambiente para todos os estudos metabólicos foi mantida em 22 °C.

Para analisar o gasto energético de machos e fêmeas submetidos a um desafio metabólico, animais com 17 semanas de idade receberam HFD 60% durante uma semana e na 18ª semana foram colocados em gaiola metabólica. Posteriormente, esses mesmos animais foram utilizados para análise da temperatura da cauda e temperatura do TAM na fase escura.

A análise da temperatura retal foi realizada por meio da utilização de termômetro digital. A temperatura da cauda e do TAM foram adquiridas por meio de imagem infravermelha utilizando uma câmera termogênica (FLIR E6; FLIR Systems Inc, Wilsonville, OR, USA). As imagens foram analisadas usando o software FLIR Tools. Todas as imagens foram obtidas a uma distância de 1m entre o pesquisador e os animais. A região interescapular onde localiza-se o TAM, foi definida como uma área esférica localizada a distância constante da base das orelhas e centrada nas escápulas. A temperatura da pele em torno do TAM e da cauda para cada animal foi considerada pela média do pixel de maior e menor temperatura da região analisada (MARTÍNEZ et al., 2014; VAN VENN et al., 2020).

Para identificar se a câmera termográfica poderia capturar a temperatura da cauda e da pele ao redor do TAM, realizamos um experimento piloto em que injetamos o hormônio triiodotironina (T3) durante três dias, na concentração de (0,02mg/ml) ou salina intraperitoneal, em ratos *Wistar Hannover* com peso médio entre 250-300g. Após três dias da injeção periférica do hormônio T3 ou salina, os animais foram colocados em caixas individuais e as imagens foram registradas. Por meio da análise qualitativa da figura abaixo é possível observar que os animais tratados com T3 apresentam um aumento da temperatura da pele ao redor do TAM e uma redução da temperatura da cauda quando comparado ao grupo controle.

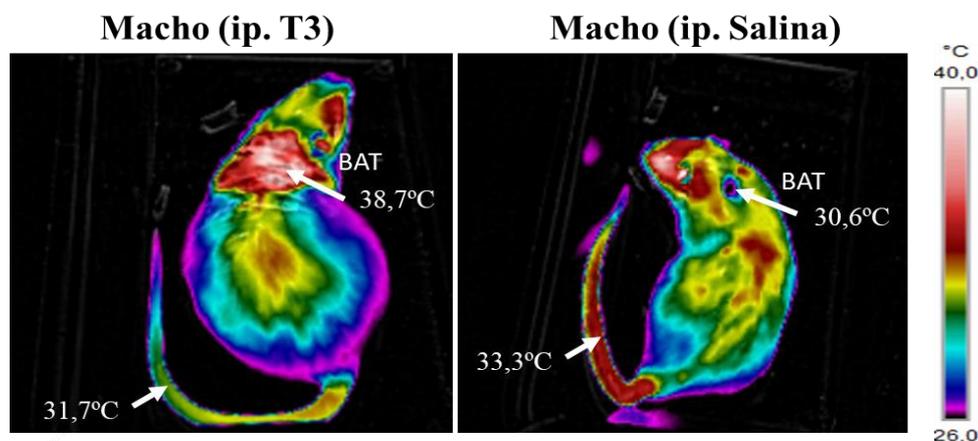


Figura 6. Padronização da captura da temperatura do TAM e da cauda por meio da utilização de câmera termográfica.

Após a realização dos experimentos os animais foram decapitados para a coleta do TAM e posterior análise da expressão gênica dos marcadores de termogênese: *UCPI*; ativador da morte celular (*CIDEA*); receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (*PPAR* γ); coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (*PGC1- α*).

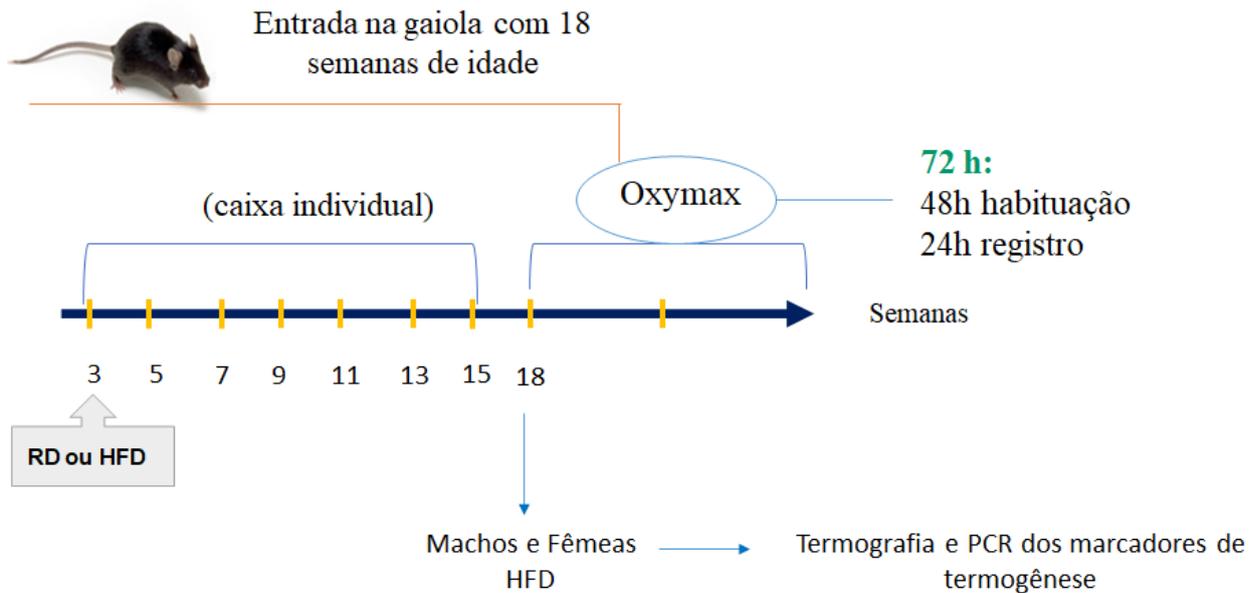


Figura 7. Protocolo experimental 2.

3.2.5. Efeito da deleção da subunidade catalítica da PI3K (*P110 α*) em camundongos fêmeas OVX, tratadas com reposição de estradiol, sobre o peso corporal, ingestão alimentar, gasto energético e termogênese do TAM.

Camundongos fêmeas SF1-cre(cre/+); *P110 α* ^{flox/flox} e *P110 α* ^{flox/flox} com 16 semanas de vida, foram submetidas à ovariectomia bilateral e implantação de pellet de 17 β estradiol 0,18mg/60d, Innovative Research of America (dose escolhida com base no estudo realizado por Torres et al., 2018) e subsequentemente foram divididas em quatro grupos experimentais:

- Camundongos fêmeas SF1-cre(cre/+); *P110 α* ^{flox/flox}, OVX.
- Camundongos fêmeas SF1-cre(cre/+); *P110 α* ^{flox/flox}, OVX+E2.
- Camundongos fêmeas *P110 α* ^{flox/flox}, OVX+ E2.

- Camundongos fêmeas P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$, OVX.

Após 18 dias de cirurgia, uma parte dos animais foram colocados em gaiolas metabólicas (Oxymax-CLAMS, Columbus-OH-USA) (2 dias para adaptação e 1 dia de registro) para avaliação da calorimetria indireta (VO₂, VCO₂, gasto energético e atividade locomotora). A avaliação da temperatura da cauda e área da pele ao redor do TAM foi realizada por meio de termografia, como descrita acima.

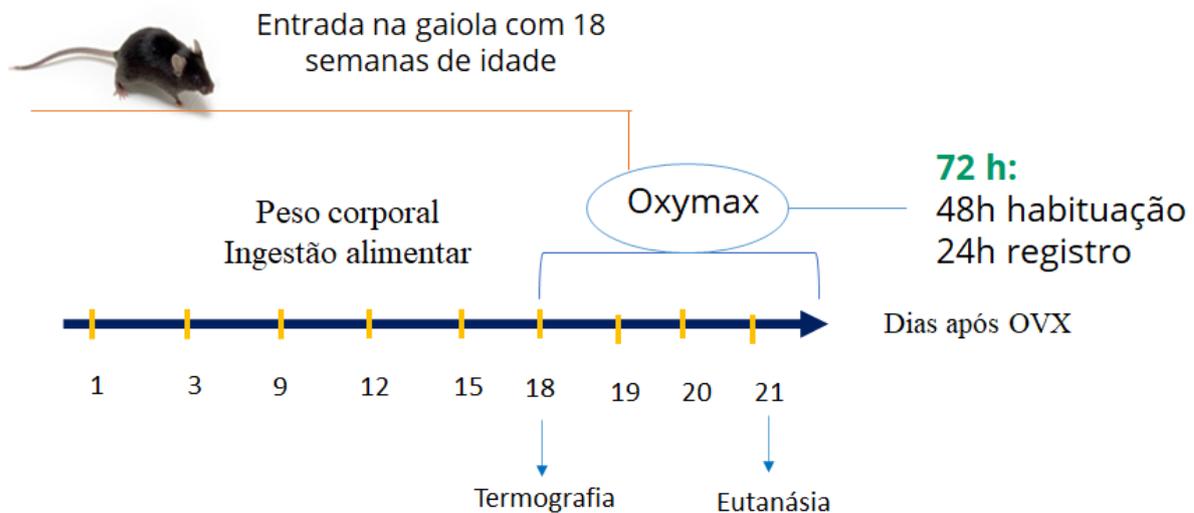


Figura 8. Protocolo experimental 3.

3.3. Procedimentos laboratoriais

3.3.1. Extração de DNA e genotipagem

Fragmentos de caudas (0,5 a 1,0 cm) foram obtidos 7 a 10 dias após o nascimento dos camundongos e utilizados para a extração do DNA e os fragmentos foram armazenados a -20°C até o momento da extração. O DNA foi extraído utilizando o Kit REDEExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma Aldrich Biotechnology, X-NAT) e, então, submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) (Tabelas 1 a 3).

A eletroforese em gel de agarose (Sigma Aldrich Biotechnology, A9539) foi preparada em solução tampão de eletroforese 1x, diluído a partir do UltraPure DNA Typing Grade 50X TAE Buffer (Thermo Fisher Scientific, 24710-030), utilizando-se SYBR Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific, S33102). Foram preparados géis de agarose na concentração 2%

(SF1-cre e P110 α^{flox}). Após a solidificação do gel de agarose, as alíquotas de PCR foram aplicadas e submetidas à eletroforese a 60 V e 400 mA por 60 minutos.

Tabela 1. *Primers* utilizados nas reações de PCR.

<i>Genótipo</i>	<i>Primers</i>	<i>Fragmento(bp)</i>
SF1-cre	(1) oIMR6243 – SF1: CTG AGC TGC AGC GCA GGG ACA T	
	(2) oIMR6244 - TGC GAA CCT CAT CAC TCG TTG CAT	WT: 200 SF1-cre: 250
	(3) oIMR8744 - CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG	
	(4) oIMR8745 - GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT	
P110 α^{flox}	(1) p110a-flox-FW: CTG TGT AGC CTA GTT TAG AGC AAC CAT CTA	WT: 398
	(2) p110a-flox-Rv: CCT CTC TGA ACA GTT CAT GTT TGA TGG TGA	P110 α^{flox} : 530

Tabela 2. Reações de PCR para genotipagem.

<i>Genótipo</i>	<i>Mix</i> <i>REExtract</i> <i>N-AMP PCR</i>	<i>Primer 1</i> <i>(10mM)</i>	<i>Primer 2</i> <i>(10mM)</i>	<i>Primer 3</i> <i>(10mM)</i>	<i>Primer 4</i> <i>(10mM)</i>	<i>Água</i>	<i>DNA</i>
SF1-cre	5,0 μ L	0,6 μ L	0,6 μ L	0,4 μ L	0,4 μ L	1 μ L	2,0 μ L
P110 α^{flox}	5,0 μ L	0,6 μ L	0,6 μ L	-		1,8 μ L	2,0 μ L

Tabela 3. Condições das reações de PCR.

<i>SF1-cre</i>	<i>P110α^{flox}</i>
----------------	---------------------------------------

Desnaturação	95°C (5 min)	95°C (3 min)
Anelamento e Extensão (x40)	95°C (30 s)	95°C (30 s)
	57°C (30 s)	58°C (40 s)
	72°C (1,5 min)	72°C (40 s)
Extensão	72°C (7 min)	72°C (7 min)
	4°C (∞)	4°C (∞)

3.3.2. Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

Após 12 horas de jejum, às 8h, glicose (2g/kg, ip) foi administrada em camundongos SF1-cre(cre/+); P110 $\alpha^{flox/flox}$ e P110 $\alpha^{flox/flox}$ com 10 semanas de idade alimentados com RD ou HFD. A glicemia de jejum foi aferida com o auxílio de um glicosímetro (Accu-chek Performa), assim como, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose através da coleta de uma quantidade mínima de sangue, obtida por pequeno corte da cauda (Figura 9).

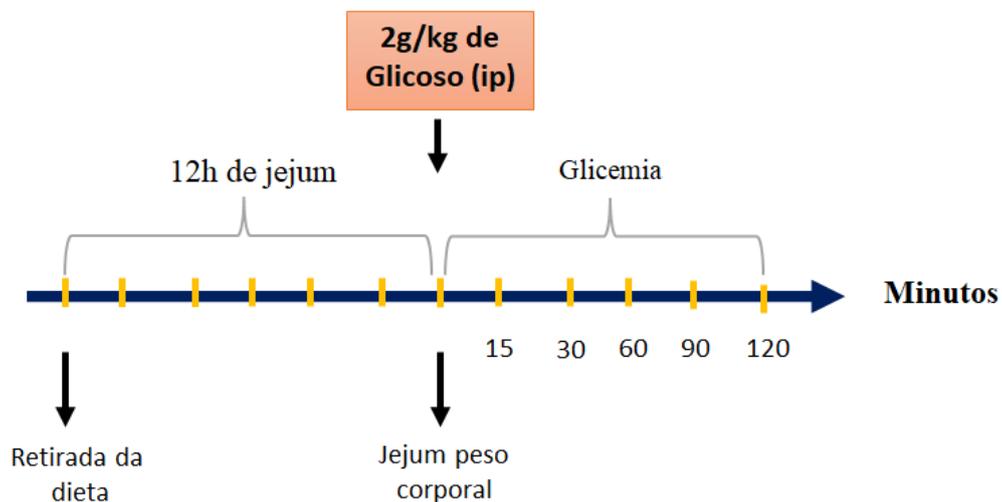


Figura 9. Teste de tolerância à glicose (GTT).

3.3.3. Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

Após 5 horas de jejum, iniciado às 8h, insulina (1,0 U/kg, ip) foi administrada em camundongos SF1-cre(cre/+); P110 $\alpha^{lox/lox}$ e P110 $\alpha^{lox/lox}$ com 11 semanas de idade alimentados com RD ou HFD. A glicemia de jejum foi aferida com o auxílio de um glicosímetro (Accu-chek Performa), assim como, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de insulina através da coleta de uma quantidade mínima de sangue, obtida por pequeno corte da cauda (Figura 10).

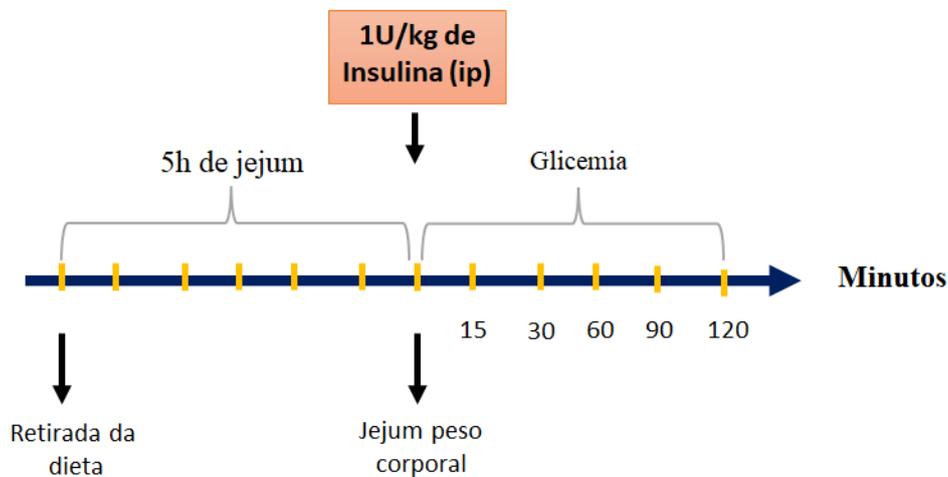


Figura 10. Teste de tolerância à insulina (ITT).

3.3.4. Registro do gasto energético

Os camundongos foram alojados em caixas metabólicas individualmente, à temperatura ambiente (22°C-24°C) sob um ciclo alternado de 12 horas de luz/12 horas escuro. Após adaptação de 2 dias nas gaiolas metabólicas, o consumo de oxigênio (VO₂), a produção de dióxido de carbono (VCO₂) e a atividade locomotora (XTOT) foram mensurados por um período de 24 horas, utilizando o Comprehensive Laboratory Monitoring System (CLAMS, Columbus Instruments, OH - USA). Para experimentos de dieta regular padrão, usamos animais na 17ª semana com peso corporal semelhante entre os grupos. Nos experimentos com HFD, submetemos animais com 17 semanas e peso corporal pareado a uma semana com alimentação HFD e avaliamos o gasto energético conforme descrito acima. O gasto energético foi obtido com base na seguinte fórmula: $EE = [VO_2 \times (3,815 + 1,232 \times RER)]$ (GARCIA-GALIANO et al., 2017).

3.3.5. Medição da temperatura da cauda e do tecido adiposo marrom (BAT)

A temperatura da cauda e do BAT foram adquiridas por meio de imagem infravermelha usando uma câmera termogênica (FLIR E6; FLIR Systems Inc, Wilsonville, OR, EUA). As imagens foram analisadas usando o software FLIR Tools. Todas as imagens foram obtidas a uma distância de 1m entre o pesquisador e os animais.

3.3.6. Ovariectomia bilateral

No presente estudo foram utilizados apenas os camundongos fêmeas que apresentaram três ciclos estrais regulares e consecutivos. Diariamente foi realizado esfregaço vaginal com o auxílio de um conta-gotas contendo previamente solução de NaCl 0,9%, para avaliação do ciclo estral. Após constatação dos três ciclos estrais regulares, as fêmeas foram anestesiadas, com ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10mg/kg) via intraperitoneal, e posteriormente ovariectomizadas. Para a cirurgia de ovariectomia foi realizada uma incisão bilateral longitudinal (1,5 cm de comprimento) da pele e tecido subcutâneo entre a última costela e a coxa. Por meio do auxílio de uma pinça, o tecido muscular foi afastado para visualização dos ovários, os quais foram removidos e posteriormente realizado sutura da parede com fio de algodão. No grupo OVX+E2, foi realizada a implantação subcutânea do pellet de estradiol (17 β estradiol 0,18mg/60d, Innovative Research of America; dose escolhida com base no estudo realizado por TORRES et al., 2018) na região dorsal, próxima à região cervical.

3.3.7. Imunofluorescência de tecido hipotalâmico

Os cortes encefálicos coronais foram obtidos no criostato (Microm, modelo HM 505E) de acordo com o Atlas de Franklin & Paxinos (2008): (ARC, -1.22 até -2.80 mm do bregma) em fatias de 30 μ m e mantidos em solução crioprotetora a -20°C. Uma em cada três secções foram utilizadas para a análise qualitativa de pAKT no VMH. As secções foram lavadas com tampão salina Tris 1X (pH 7,6) três vezes por 5 minutos. Foi realizado o bloqueio da peroxidase por 10 minutos (90% de metanol e 10% de peróxido de hidrogênio). Os tecidos foram lavados novamente com Tris 1X e foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas por 60 minutos (5% soro normal de cavalo (Vector Laboratories, S-2000); 0,4% Triton X-100 (Sigma Aldrich Biotechnology, X100); Tris 1X). Então, os cortes foram incubados por 48 horas a 4°C com os anticorpos primários (Tabela 4) rabbit anti-pAKT, Cell Signaling # 2965, [1:1000]). No segundo dia, as secções foram lavadas com Tris 1X e incubadas por 60 minutos

com o anticorpo secundário (Tabela 4), Alexa Fluor 594 [1:500]; ab150076. Os cortes foram lavados com Tris 1X e as lâminas foram montadas com Fluoromont (Southern Biotech, Cat. Nº: 0100-01).

Tabela 4. Concentrações dos anticorpos utilizados na imunofluorescência.

<i>Anticorpo primário</i>	<i>Anticorpo secundário</i>
<i>rabbit anti p-AKT [1:1000]</i>	<i>alexa fluor 594 donkey anti rabbit [1:500]</i>

3.3.8. Processamento fotomicrográfico de imunofluorescência

As imagens de imunofluorescência foram obtidas utilizando o microscópio óptico (DM4500 B, Leica), equipado com objetivas de 20x e 40x, associado a um sistema para análise de imagens (LAS V3.8, Leica). As secções contendo o VMH foram analisadas por meio do software *ImageJ*.

3.3.9. Dosagem hormonal

Os camundongos, colocados em jejum por um período de 5 a 6 horas (8h00-14h00), foram previamente expostos a ambiente contendo isoflurano a 1% e posteriormente decapitados para a coleta de amostra sanguínea do tronco, bem como para coleta tecidual. O sangue foi coletado em tubos de polipropileno contendo heparina. O plasma foi obtido após a centrifugação do sangue total por 30 minutos a 3.000 rotações/min, a 4°C. As amostras foram estocadas em freezer -20°C, até o momento das dosagens de leptina, insulina, noradrenalina, corticosterona e testosterona. As concentrações plasmáticas de leptina e insulina foram mensuradas por meio do ensaio de Elisa (Leptin Mouse Kit, Merck, EZML-82K) e insulina (Rat/Mouse insulin Elisa, Merck, EZRMI-13K). Radioimunoensaio in-house foi utilizado para medição de testosterona e corticosterona plasmáticas, conforme descrito anteriormente por BORGES et al., 2007. As concentrações de noradrenalina no plasma, TAM e TABi foram determinadas por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme descrito anteriormente por GAROFALO et al., 1996), no laboratório sob responsabilidade do Prof. Luiz Carlos Navegantes.

3.3.10. PCR em tempo real

As amostras do TAM foram congeladas em condições livres de RNase. A técnica de PCR foi realizada usando o sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500. As reações foram realizadas em volumes de 12 μ L, com 4 μ L de cDNA, utilizando o reagente TaqMan 2x Master Mix (Applied Biosystems), em sondas e primers dos genes específicos, *Ucp1* (Mm01244861_m1), *Ppargc1a* (Mm01208835_m1), *Ppara* (Mm00440939_m1) e *Cidea* (Mm00432554_m1).

3.3.11. Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados através do Software Graphpad Prism versão 8.02. Foi utilizado o teste Mann-Whitney para comparar dois grupos. As análises foram feitas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do pós-teste de Tukey ou Sidak. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0.05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Genotipagem de camundongos com deleção específica da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 do VMH.

O cruzamento de camundongos SF1-cre(cre/+); P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} resulta em filhotes desses mesmos genótipos. Alguns dos animais experimentais estão representados na figura 11, onde observamos 12 animais de genótipo SF1-cre^(cre/+), 4 animais selvagens (WT) para SF1 e 16 animais de genótipo P110 α ^{flox/flox}.

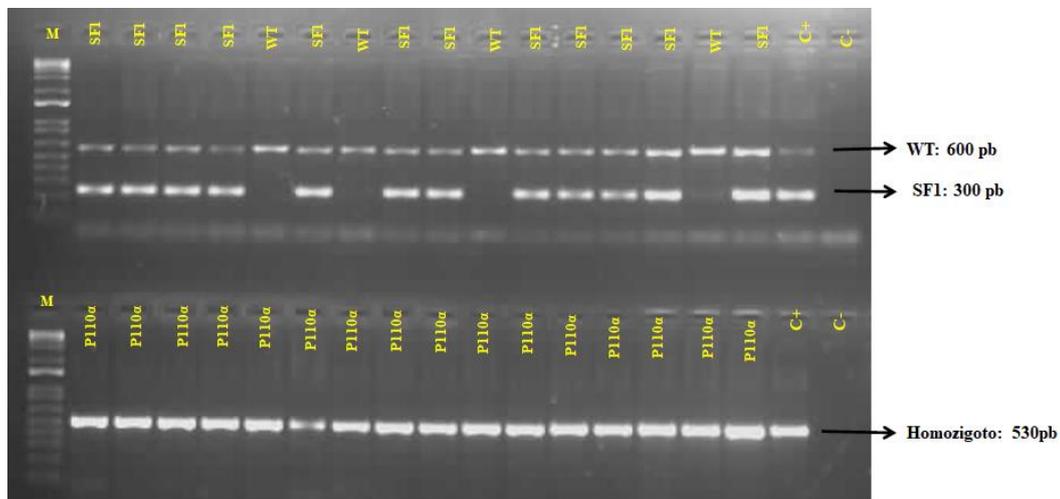


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose (2%) após PCR para genotipagem de SF1-cre(cre/+); P110 α ^{flox/flox}. M: Marcador. C+: Controle positivo correspondente a uma amostra de genótipo conhecido. C-: Controle negativo (água, sem material genético). WT: Animais selvagens para SF1. À direita está identificado o tamanho do fragmento de DNA (em pares de base, bp).

4.2. Validação da deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 após estímulo com insulina central.

A deleção da subunidade catalítica da PI3K (P110 α) nos neurônios SF1 do VMH foi confirmada por imuno-histoquímica para AKT fosforilada (pAKT), considerada a via recrutada e ativada pela ação da PI3K. Observamos que a administração central da insulina em camundongos P110 α ^{flox/flox} promoveu a fosforilação da AKT no VMH e regiões adjacentes,

como ARC. Por outro lado, em animais SF1-cre;P110 α ^{flox/flox}, houve redução na fosforilação na AKT no VMH (Figura 12A).

O SF1 também é expresso em outras regiões como a hipófise, glândula adrenal e gônadas, que desempenham um papel importante na regulação do metabolismo (ZHAO et al., 2001). Assim, analisamos o peso da adrenal, testículo, vesícula seminal, ovário e útero. A deleção da subunidade P110 α nos neurônios SF1 promoveu uma redução no peso do testículo (Figura 12B, $p < 0.001$) nos animais com 20 semanas de idade. Contudo, não foi observada diferença entre os genótipos no peso da vesícula seminal e concentração plasmática de testosterona (Figuras 12C e 12D), indicando que a atividade gonadal manteve-se intacta. Em camundongos machos, nenhuma diferença foi observada no peso adrenal e nas concentrações plasmáticas de corticosterona (Figura 12E-F). Não houve diferenças no peso útero e ovário entre os grupos experimentais (Figura 12G-H) e camundongos fêmeas não mostraram diferença entre os genótipos, no peso adrenal e nos níveis plasmáticos de corticosterona (Figura 12I-J).

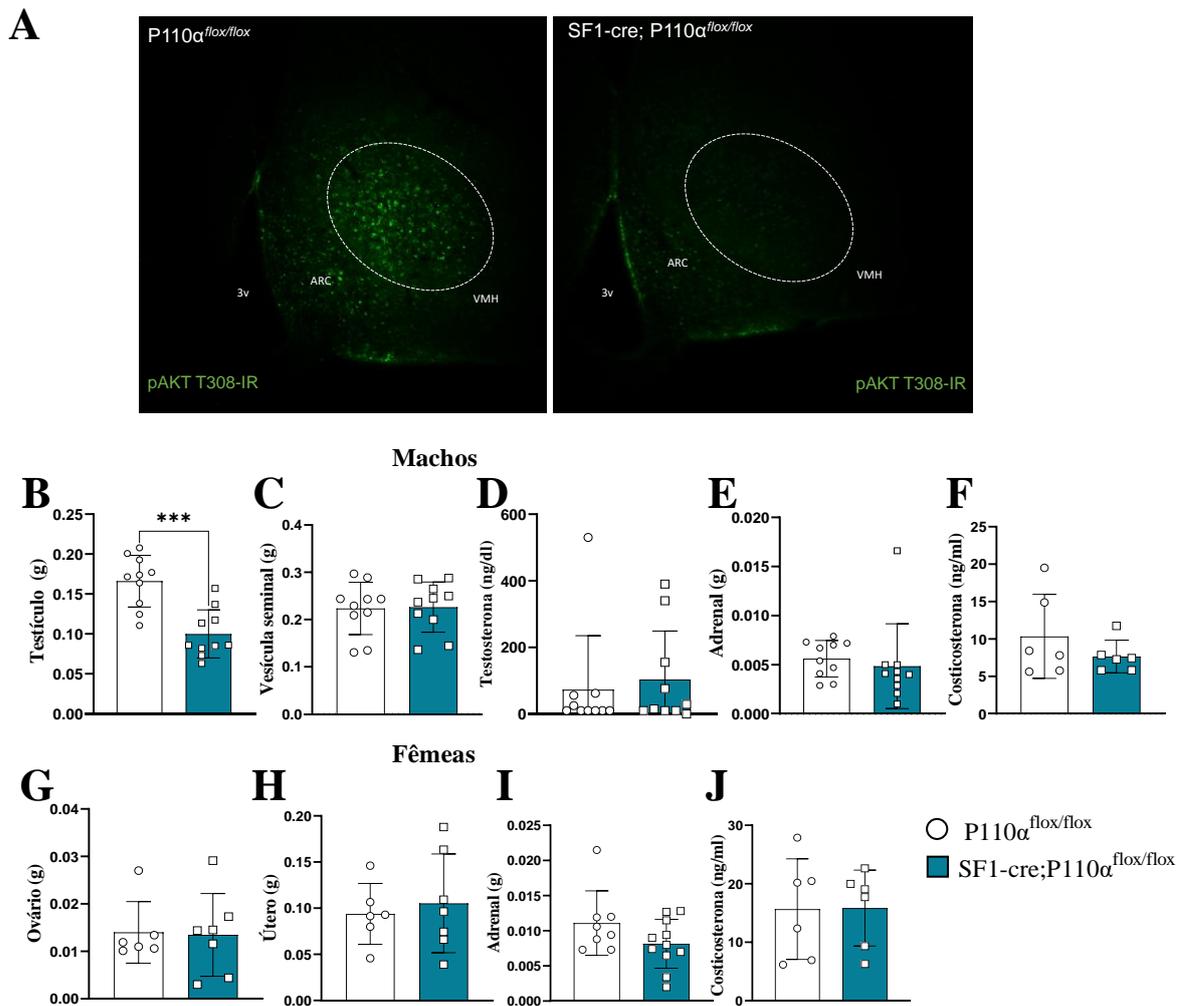


Figura 12. Validação da deleção da subunidade catalítica P110 α da PI3K em neurônios do VMH. (A) Imagens representativas de AKT fosforilada (pAKT) no hipotálamo médio-basal, 30 minutos após a injeção intracerebroventricular de insulina (i.c.v 4,4 mU/2 μ l) em camundongos SF1-cre;P110 $\alpha^{flox/flox}$ e P110 $\alpha^{flox/flox}$. Peso do testículo (B; n=10); peso da vesícula seminal (C; n=10); níveis plasmáticos de testosterona (D; n= 10/grupo); peso da adrenal (macho: E; n=7); níveis plasmáticos de corticosterona (macho: F; n= 6-7); peso do Útero (G; n=6-7/grupo) e ovário de camundongos fêmeas em estro (H; n=6 -7/grupo); peso adrenal (I; n=8 -11/grupo); níveis plasmáticos de corticosterona (fêmea: J; n= 6). Camundongos SF1-cre;P110 $\alpha^{flox/flox}$ e P110 $\alpha^{flox/flox}$ alimentados com 20 semanas de idade e alimentados com dieta regular (RD) às. Os valores são apresentados como \pm EPM e o teste t de Student bicaudal foi usado para comparações de dois grupos; p* < 0.001 entre os grupos.**

4.3. Deleção da P110 α em neurônios SF1 do VMH não afeta o peso corporal de animais submetidos à dieta regular (RD).

Os camundongos machos e fêmeas com deleção da P110 α em neurônios SF1 (SF1-cre(cre/+; P110 $\alpha^{flox/flox}$), alimentados com RD, apresentaram ganho de peso corporal semelhante aos seus controles P110 $\alpha^{flox/flox}$ (Figura 13A-B e 13D-E). Observou-se também,

que nos machos não houve diferença na ingestão alimentar acumulada (Figura 13C). Por outro lado, as fêmeas SF1-cre(cre/+); P110 α ^{flox/flox}, apresentaram uma maior ingestão alimentar semanal quando comparadas ao grupo P110 α ^{flox/flox}, a partir da 14^a semana (Figura 13F; $p < 0.05$).

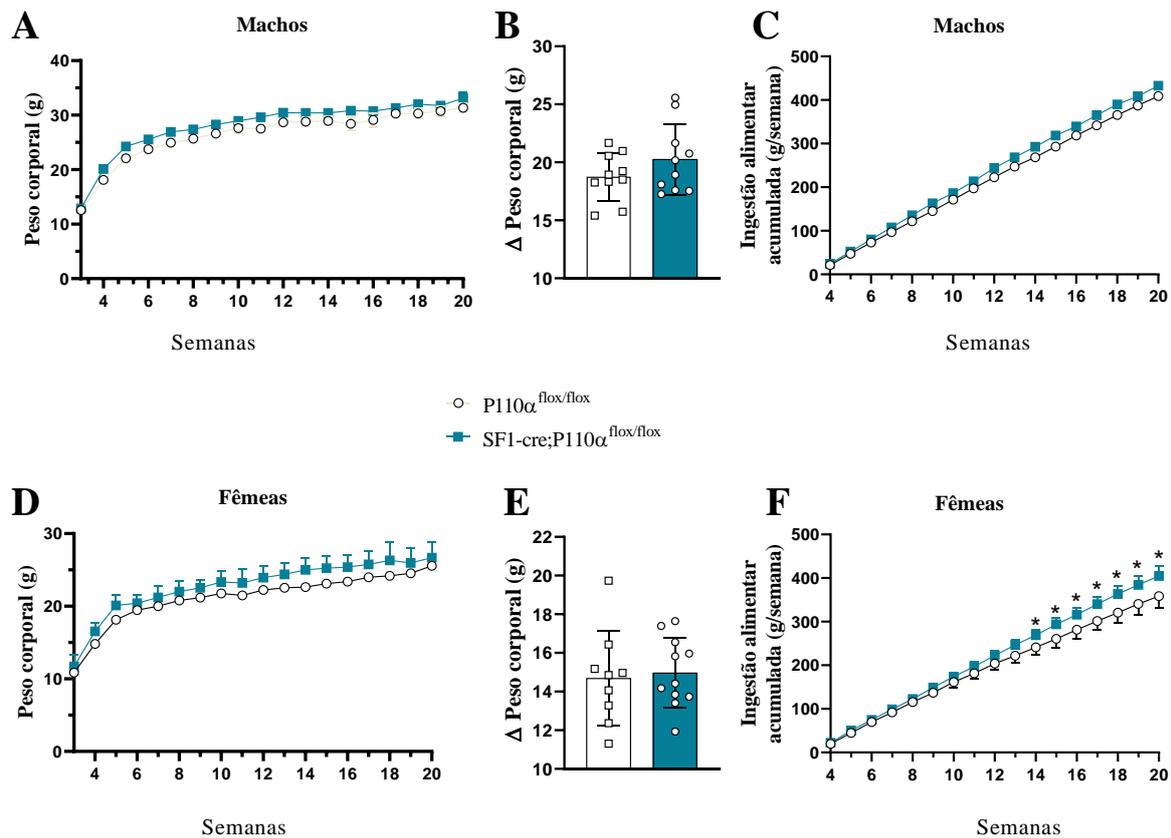


Figura 13. Deleção da P110 α em neurônios SF1 do VMH não altera o peso corporal de animais submetidos à dieta regular (RD). Peso corporal (A; $n = 10$ /grupo), delta do peso corporal (B; $n = 10$ /grupo), ingestão alimentar acumulada (C; $n = 10$ /grupo) de camundongos machos; peso corporal (D; $n = 9-11$ /grupo), delta do peso corporal (E; $n = 9-11$ /grupo), ingestão alimentar acumulada (F; $n = 9-11$ /grupo) de camundongos fêmeas. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. $p^* < 0.05$. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Animais alimentados com RD.

4.4. Deleção da subunidade P110 α nos neurônios SF1 do VMH diminui o gasto energético em machos alimentados com RD.

Machos SF1-cre(cre/+;P110 α ^{flox/flox} alimentados com RD, apresentaram um menor consumo de O₂ e gasto energético na ciclo escuro, quando comparado aos animais P110 α ^{flox/flox}. Por outro lado, não foi observado diferença entre os grupos no consumo de O₂

e gasto energético no período de 24h e na fase clara (Figura 14A-C; $p < 0.05$). Observou-se também que em camundongos fêmeas que receberam RD não houve diferença entre os genótipos nos parâmetros metabólicos analisados (Figura 14D-F)

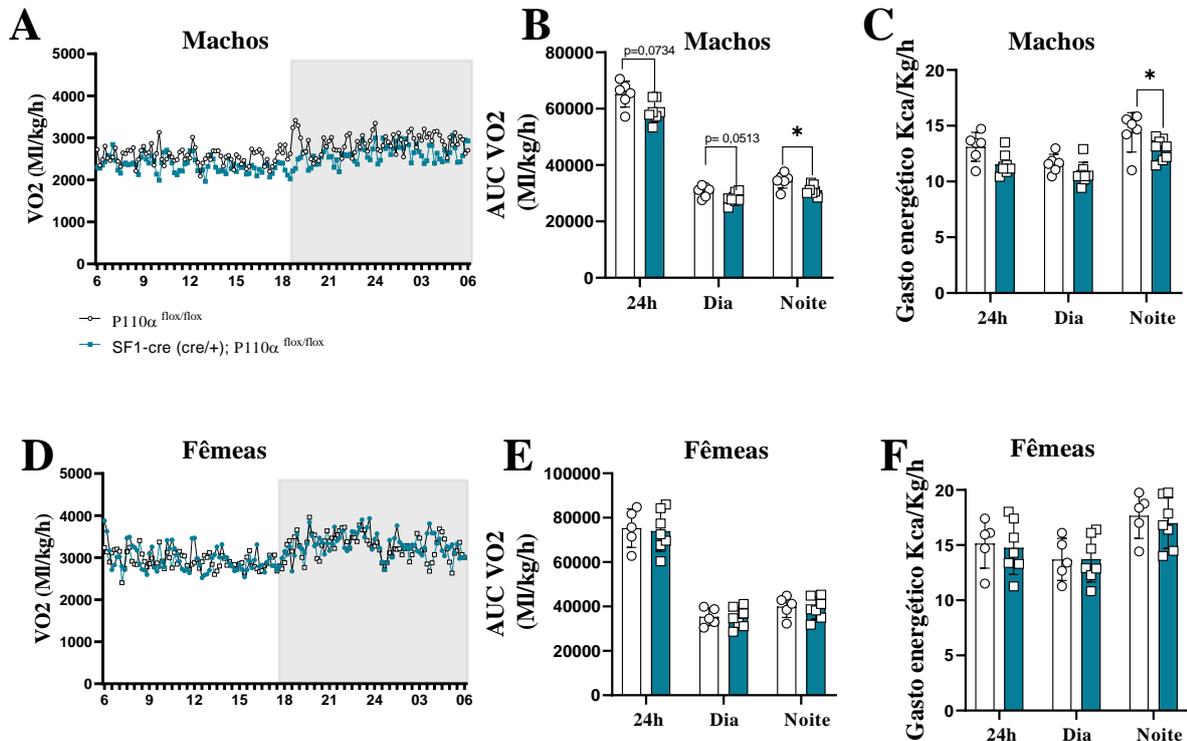


Figura 14. Deleção da subunidade P110 α nos neurônios SF1 do VMH diminui o gasto energético em machos alimentados com RD. Consumo de O₂ em 24h (A; n=6-7/grupo); área sob a curva (AUC) do consumo de O₂ (B; n=6-7/grupo); gasto energético (C; n=6-7/grupo) em camundongos machos. Consumo de O₂ em 24h (D; n=6-7/grupo); área sob a curva (AUC) do consumo de O₂ (E; n=6-7/grupo); gasto energético (F; n=6-7/grupo) em camundongos fêmeas. Dados como média \pm EPM e o teste t de Student foi utilizado; * $p < 0.05$. Animais alimentados com RD.

4.5. Redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH não afeta a homeostase da glicose em animais submetidos à dieta regular.

Os camundongos machos e fêmeas SF1-cre(cre/+;P110 α ^{flox/flox} não apresentaram alteração na tolerância à glicose (10 semanas), tolerância a insulina (11 semanas) e concentração sérica de insulina em relação aos animais controles P110 α ^{flox/flox} (Figura 15A-H).

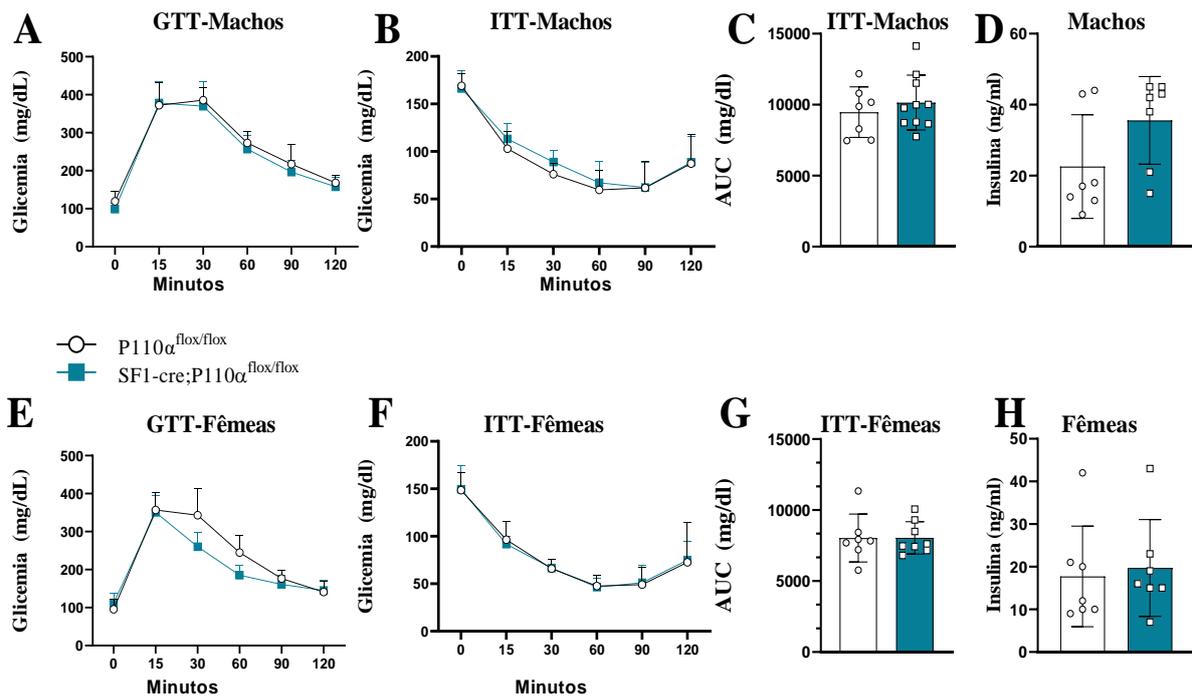


Figura 15. Redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH não afeta a homeostase da glicose em animais submetidos à dieta regular. Teste de tolerância à glicose (A; n=7-10); teste de tolerância a insulina (B-C; n=7-10) e concentrações séricas de insulina (D; n=7) de camundongos machos SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox}. Teste de tolerância e à glicose (E; n=7-10); teste de tolerância a insulina (F-G; n=7-10) e concentrações séricas de insulina (H; n=7) de camundongos fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox}. Dados como média \pm EPM e o teste t de Student foi utilizado. Animais alimentados com RD.

4.6. Redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH não afeta o peso do fígado, TAB, TAM e concentrações séricas de leptina.

A figura 16A-D demonstra o peso do TABr, TAM e fígado de machos e fêmeas alimentados durante 20 semanas com RD. Foi possível observar que a deleção da P110 α em neurônios SF-1 do VMH em machos e fêmeas não alterou o peso dos tecidos e concentrações plasmáticas de leptina que mostrou-se similar entre os grupos SF1-cre(cre/+;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox}.

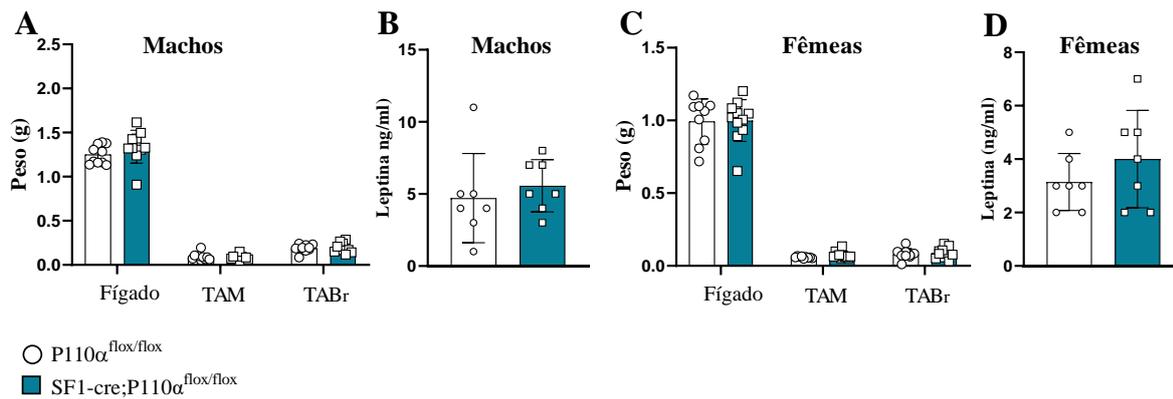


Figura 16. Redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH não afeta o peso do fígado, TABr, TAM e concentrações séricas de leptina. Peso absoluto do tecido adiposo branco retroperitoneal (TABr), tecido adiposo marrom (TAM) e fígado de camundongos machos SF1-cre(cre/+;P110 $\alpha^{flox/flox}$ e P110 $\alpha^{flox/flox}$ (A; n=10). Concentrações plasmáticas de leptina em animais machos (B; n=7). Peso absoluto TABr, TAM e fígado de camundongos fêmeas SF1-cre(cre/+); P110 $\alpha^{flox/flox}$ e P110 $\alpha^{flox/flox}$ (C; n=10-11/grupo). Concentrações plasmáticas de leptina em camundongos fêmeas (D; n=7) tratados com dieta regular (RD). Animais com 20 semanas de idade. Valores expressos como média \pm EPM. Dados analisados por teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos. Animais alimentados com RD.

4.7. Redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH causa prejuízo nas respostas adaptativas de proteção contra a obesidade induzida pela dieta de animais submetidos à HFD de uma maneira sexo-específica.

Camundongos SF1-cre; P110 $\alpha^{flox/flox}$ machos e fêmeas quando submetidos à HFD apresentaram um aumento acentuado no peso corporal, em comparação com os animais P110 $\alpha^{flox/flox}$ controle (Figuras 17A-B; e Figuras 17D-E; $p < 0.05$). No entanto, não foi observada diferença na ingestão alimentar acumulada em ambos os sexos (Figuras 17C e 17F). Curiosamente, nas fêmeas, em comparação com camundongos machos, o impacto da redução da atividade da PI3K em neurônios SF1, foi mais pronunciado no ganho de peso corporal (30% x 14% às 18 semanas de idade), em relação aos seus respectivos controles P110 $\alpha^{flox/flox}$.

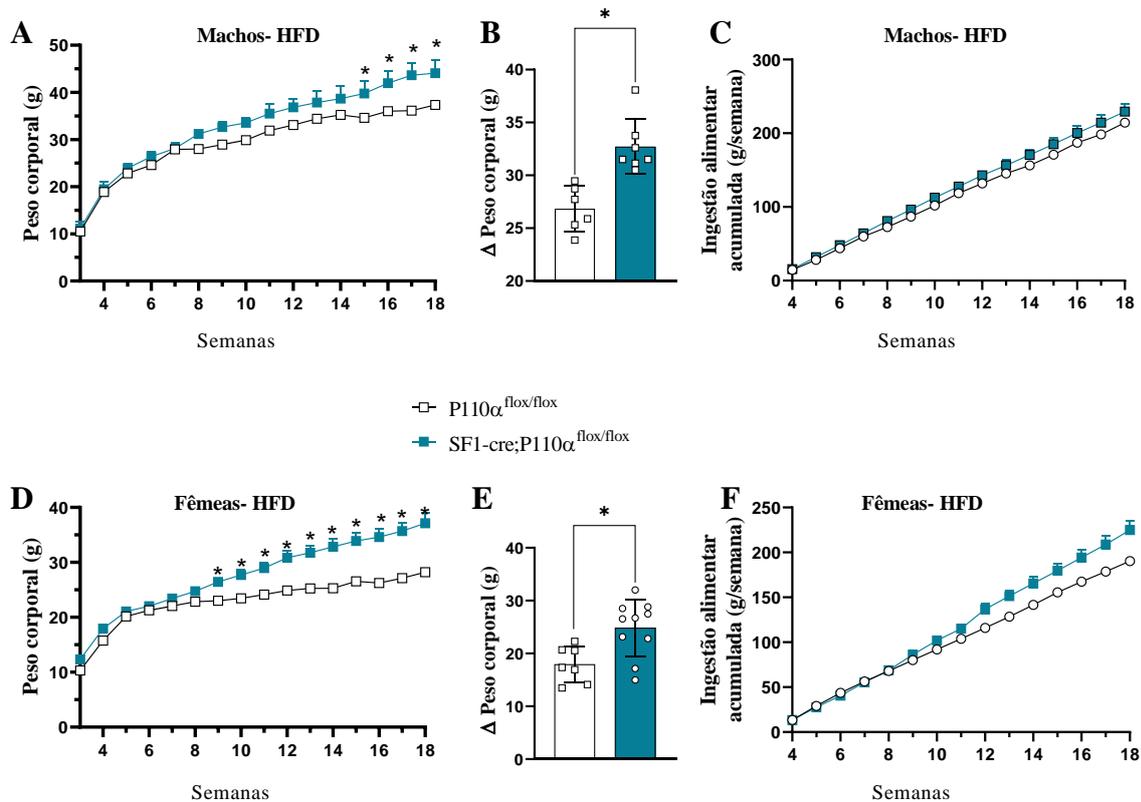


Figura 17. Redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH causa prejuízo nas respostas adaptativas de proteção contra a obesidade induzida pela dieta de animais submetidos à HFD de uma maneira sexo-específica. Peso corporal (A; n = 6/grupo), delta do peso corporal (B; n= 6/grupo), ingestão alimentar acumulada (C; n = 6/grupo) de camundongos machos; peso corporal (D; n = 7-10/grupo), delta do peso corporal (B; n=7-10/grupo), ingestão alimentar acumulada (C; n = 7-10/grupo) de camundongos fêmeas. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. $p^* < 0.05$. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Sidak. Animais alimentados com HFD 60%.

4.8. Deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz o gasto energético em camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD.

Os valores médios do consumo de oxigênio (VO₂) dos camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD estão apresentados na figura 18. Observou-se que nos animais machos SF1-cre; P110 $\alpha^{flox/flox}$, há uma redução no VO₂ no período de 24h e ciclo claro em comparação ao grupo P110 $\alpha^{flox/flox}$ (Figura 18A-B; $p < 0.05$). Camundongos fêmeas com redução da

atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH por sua vez, apresentaram redução no VO₂ no ciclo escuro (Figura 18C-D; $p < 0.001$).

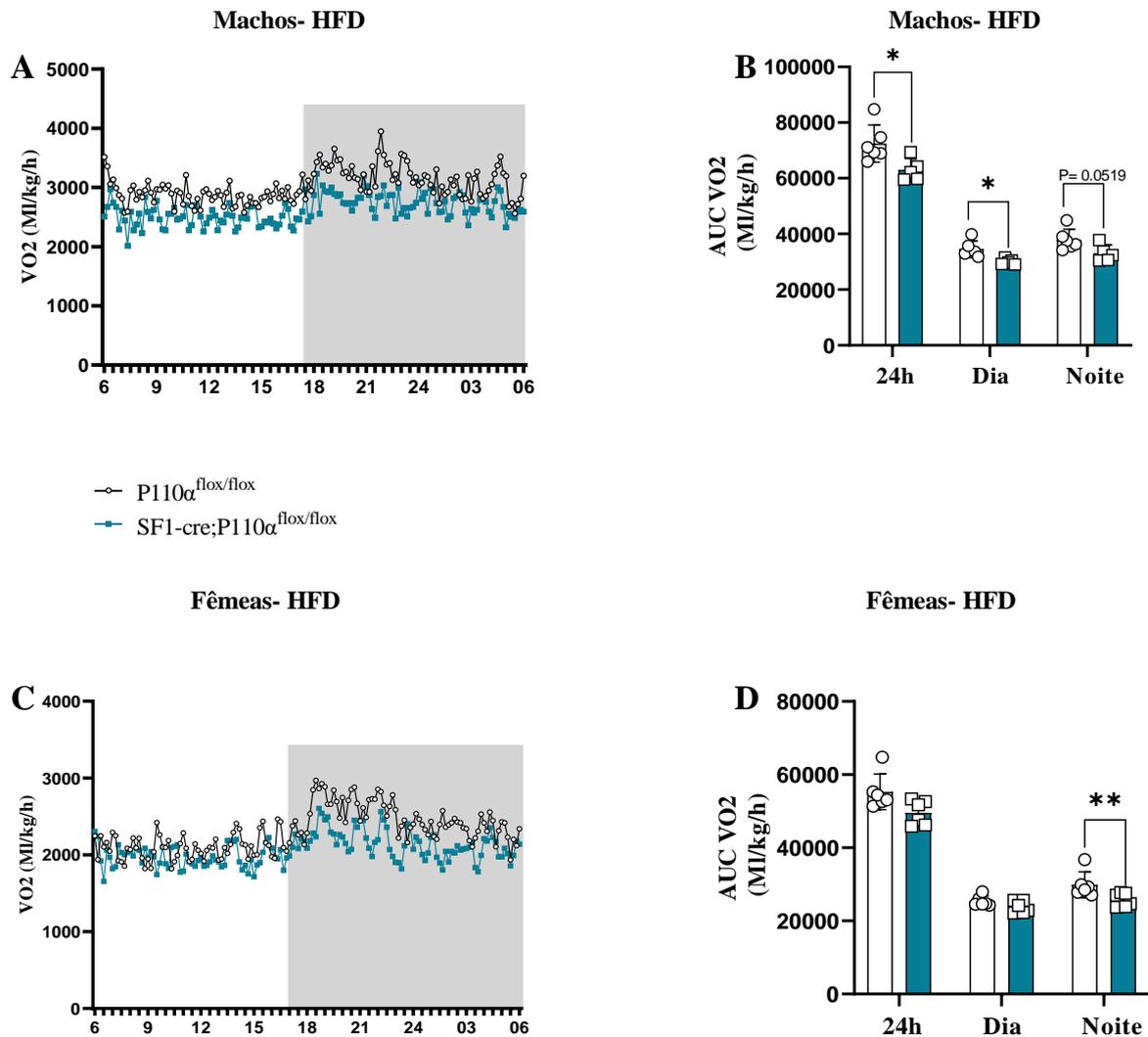


Figura 18. Consumo de VO₂ em 24h (A; n=6/grupo); área sob a curva (AUC) do consumo de O₂ (B; n=6-7/grupo) em camundongos machos e fêmeas (C; n= 6/grupo); (D; n= 6/grupo). Animais com peso corporal pareado, após receberem uma semana de HFD; * $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$. Valores expressos como média \pm EPM. Dados analisados por teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos.

Na figura 19 são apresentados os valores da produção de gás carbônico (VCO₂) dos camundongos machos e fêmeas alimentados com 17 semanas de vida e alimentados durante uma semana com HFD. Observou-se que nos animais machos SF1-cre; P110 $\alpha^{flx/flx}$ há uma redução no VCO₂ no período de 24h e ciclo escuro em comparação ao grupo P110 $\alpha^{flx/flx}$ (Figura 19A-B; $p < 0.05$). Por outro lado, camundongos fêmeas com redução da atividade da

PI3K em neurônios SF1 do VMH não apresentaram diferenças no VCO₂ quando comparadas ao grupo controle da deleção (Figura 19C-D).

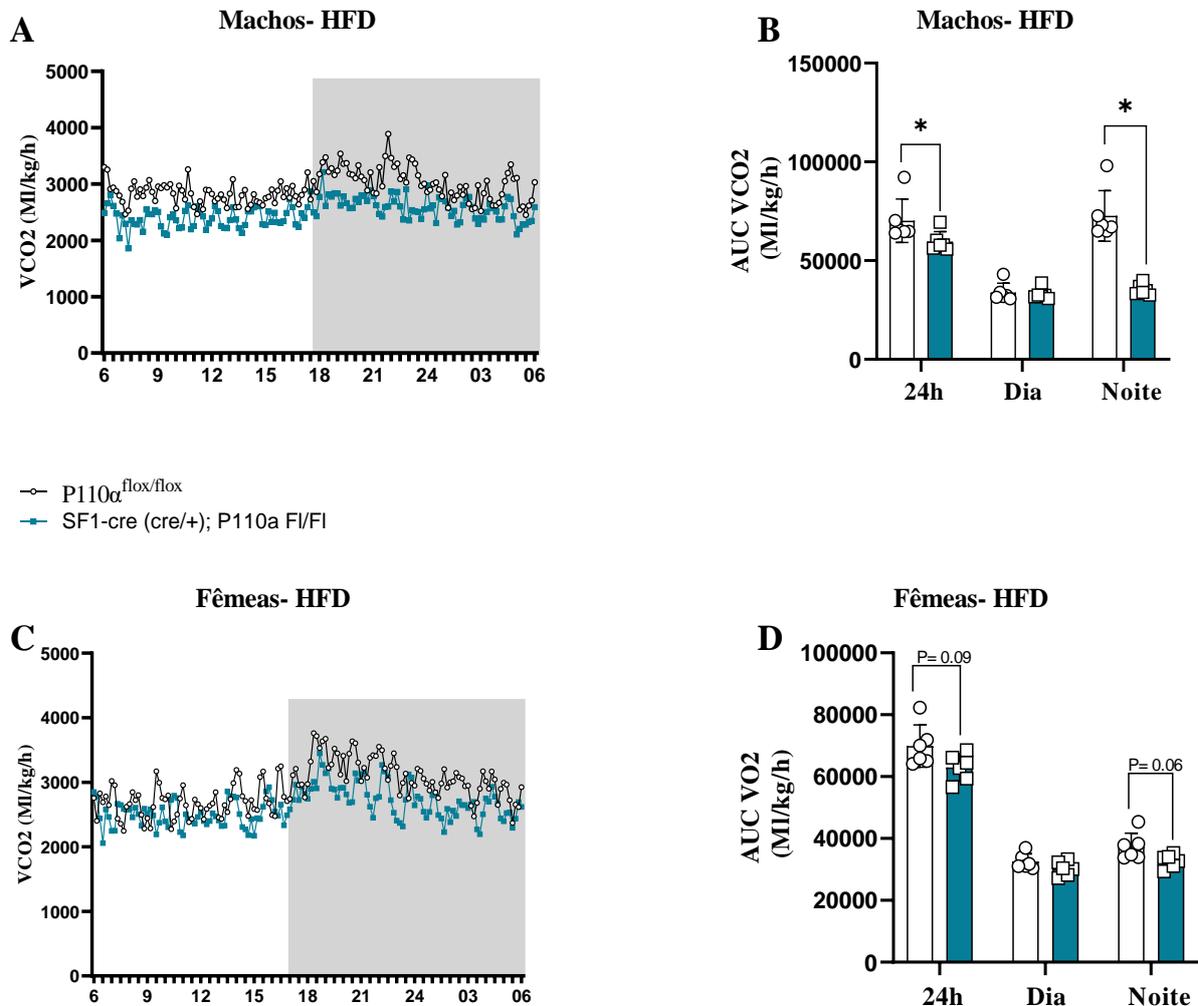


Figura 19. Consumo de VCO₂ em 24h (A; n=6/grupo); área sob a curva (AUC) do consumo de CO₂ (B; n=6-7/grupo) em camundongos machos e fêmeas (C; n= 6/grupo); (D; n= 6/grupo). Animais com peso corporal pareado, após receberem uma semana de HFD; * p < 0.05. Valores expressos como média \pm EPM. Dados analisados por teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos.

Os valores médios do gasto energético e atividade locomotora dos camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD estão apresentados na figura 20. Os dados demonstram que animais machos SF1-cre; P110 $\alpha^{flox/flox}$ apresentam uma redução no gasto energético no período de 24h, ciclo claro e escuro, quando comparados ao grupo P110 $\alpha^{flox/flox}$ (Figura 20A; p < 0.05). Camundongos fêmeas com redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH por sua

vez, apresentaram redução no gasto energético no ciclo escuro (Figura 20C; $p < 0.05$). Não foi identificado diferença na atividade locomotora entre os genótipos em ambos os sexos (Figura 20B e 20D).

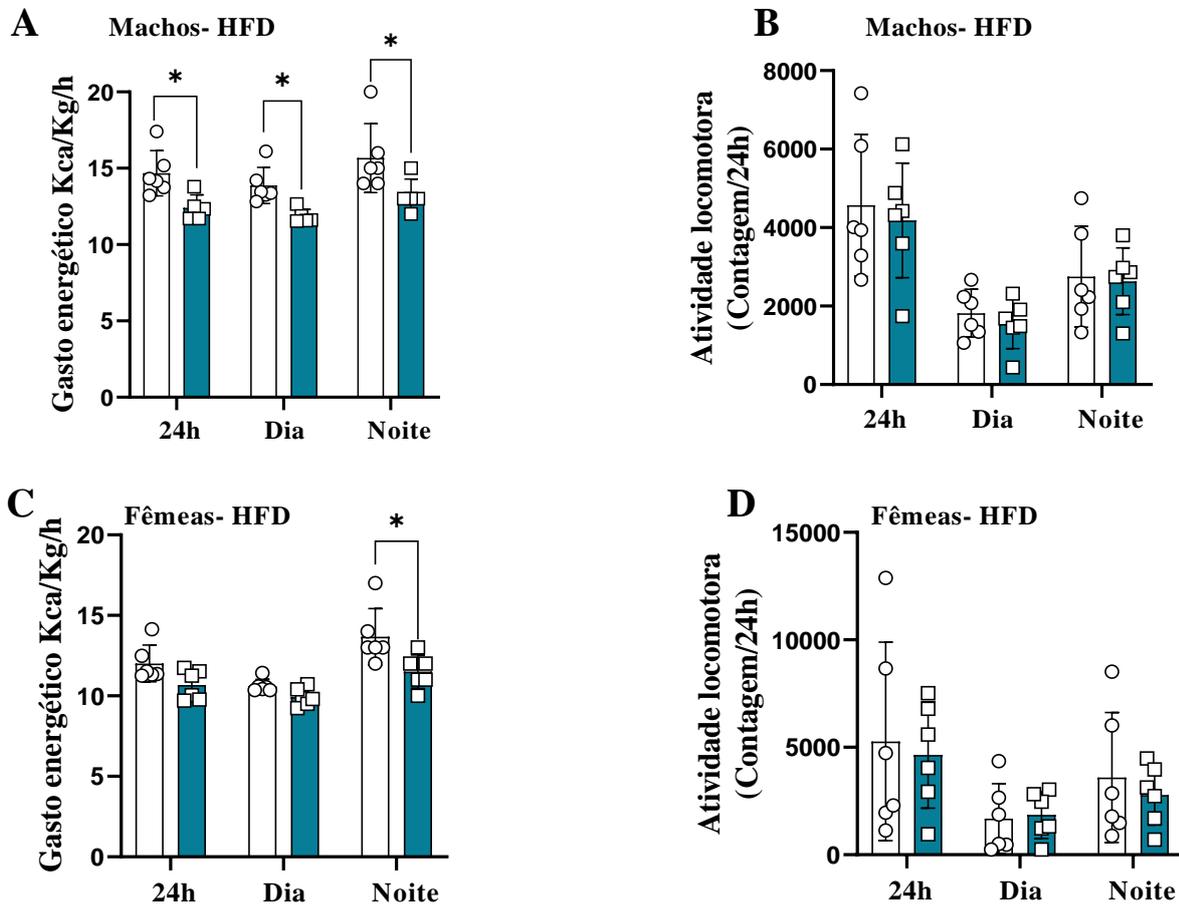


Figura 20. Gasto energético em 24h, ciclo claro e escuro (A; $n=6$ /grupo); atividade locomotora (B; $n=6-7$ /grupo) em camundongos machos. Gasto energético em 24h, ciclo claro e escuro (C; $n=6$ /grupo); atividade locomotora (D; $n=6-7$ /grupo) em camundongos fêmeas (C; $n=6$ /grupo). Animais com peso corporal pareado, após receberem uma semana de HFD; * $p < 0.05$. Valores expressos como média \pm EPM. Dados analisados por teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos.

4.9. Deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz a sensibilidade à insulina em camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD.

Camundongos fêmeas e machos alimentado com HFD não apresentaram diferenças entre os genótipos na glicemia durante o GTT (Figura 21A e 21E). Entretanto, foi possível observar que em ambos os sexos a deleção da P110 α no VMH promoveu uma maior glicemia durante

o ITT, quando comparado ao grupo controle (Figura 21B-C e 21F-G; $p < 0.05$). Contudo, não foi observado diferença nas concentrações plasmática de insulina em machos e fêmeas (Figura 21D e 21H).

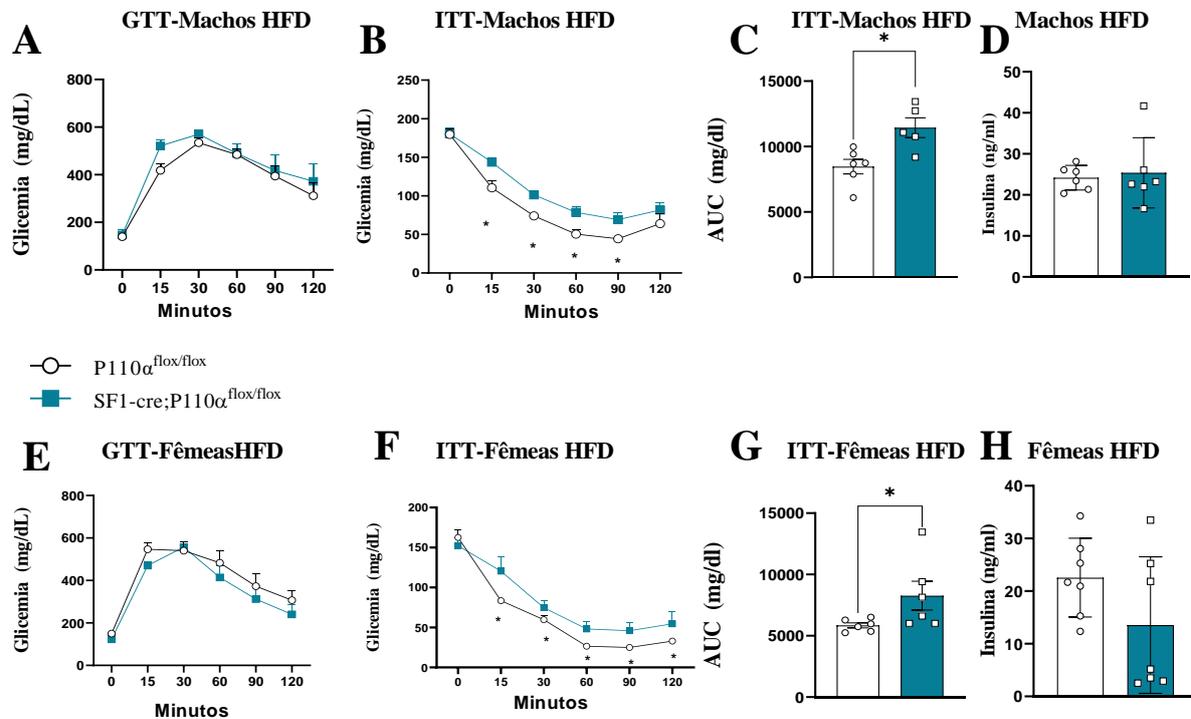


Figura 21. Deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz a sensibilidade à insulina em camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD. GTT (A; n=6); ITT (B-C; n=6) e concentrações séricas de insulina (D; n=6) de camundongos machos SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox}. GTT (E; n=5-6); ITT (F-G; n=5-6) e concentrações séricas de insulina (H; n=7) de camundongos fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox}. Dados como média \pm EPM e o teste t de Student foi utilizado; * $p < 0.05$. Animais alimentados com HFD.

4.10. Deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 de VMH aumenta a adiposidade e as concentrações plasmáticas de leptina em camundongos fêmeas.

Camundongos machos SF1-cre; P110 α ^{flox/flox} não apresentaram diferença no peso do fígado, TABr e concentrações séricas de leptina quando comparados ao grupo controle (Figura 22A-B). Por outro lado, camundongos fêmeas com atividade da PI3K reduzida no VMH, apresentaram aumento no peso do fígado e TABr (Figura 22C; $p < 0.01$ e $p < 0.05$ respectivamente). Observou-se também que as concentrações plasmáticas de leptina foram maiores nas fêmeas com deleção da subunidade catalítica P110 α (Figura 22D; $p < 0.01$).

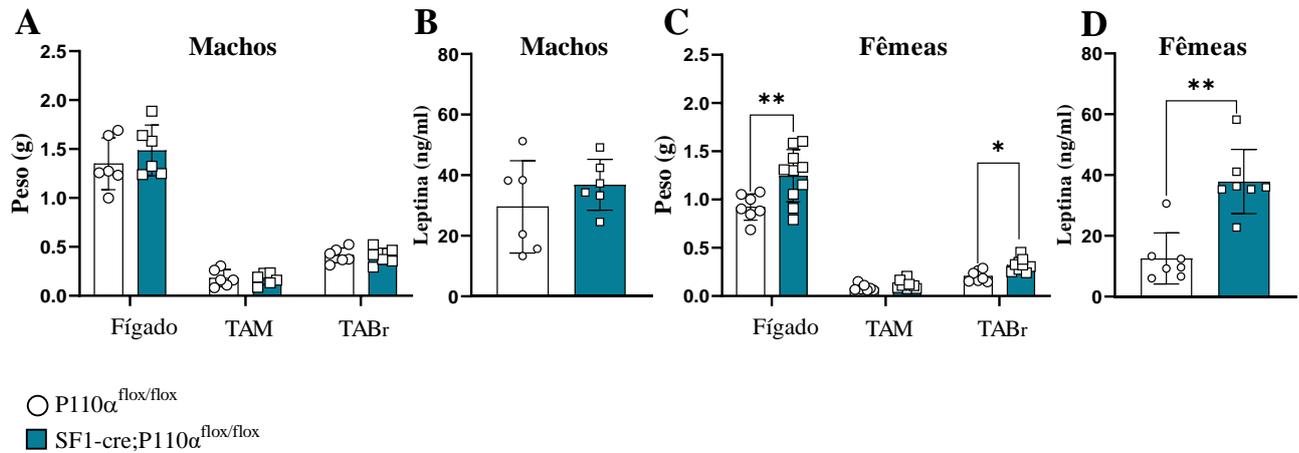


Figura 22. Deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 de VMH aumenta a adiposidade e as concentrações plasmáticas de leptina em camundongos fêmeas. Peso do fígado, TAM e TABr dos camundongos machos SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} (A; n=6). Níveis plasmáticos de leptina nos animais machos (B; n=6). Peso do fígado, TAM e TABr de camundongos fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} (C; n= 7-10). Níveis plasmáticos de leptina em fêmeas (D; n=7) alimentados com HFD. Dados como média \pm SEM e o teste t de Student bicaudal foram usados. p* <0,05 e p** <0,01 entre os grupos.

4.11. Deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 do VMH reduz a temperatura do TAM e expressão gênica dos marcadores de termogênese em camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD.

Por meio da termografia, analisamos a temperatura da cauda dos camundongos machos e fêmeas, com redução da atividade PI3K nos neurônios SF1 do VMH e não foi observada diferença entre os genótipos em ambos os sexos (Figura 23A-B). No entanto, camundongos fêmeas e machos SF1-cre; P110 α ^{flox/flox}, alimentados com HFD, apresentaram uma redução na temperatura da pele ao redor do TAM quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 23C; p < 0,01 e p < 0,05). Além disso, analisamos a expressão do RNAm dos marcadores de termogênese no TAM. Houve uma redução da expressão do gene *Ucp1* nos animais machos com deleção (Figura 23D, p < 0,01). Porém, não houve diferença entre os genótipos, na expressão de outros marcadores de termogênese como *Cidea*, *Ppara*, *Ppargc1a* (Figura 23D). Camundongos fêmeas apresentaram redução na expressão da *Ucp1* e *Cidea* no TAM. A expressão de *Ppara* e *Ppargc1* não se mostrou estatisticamente diferente entre os genótipos (Figura 23E; p < 0,05). Em conjunto, os resultados demonstram que a deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 reduz a termogênese no TAM.

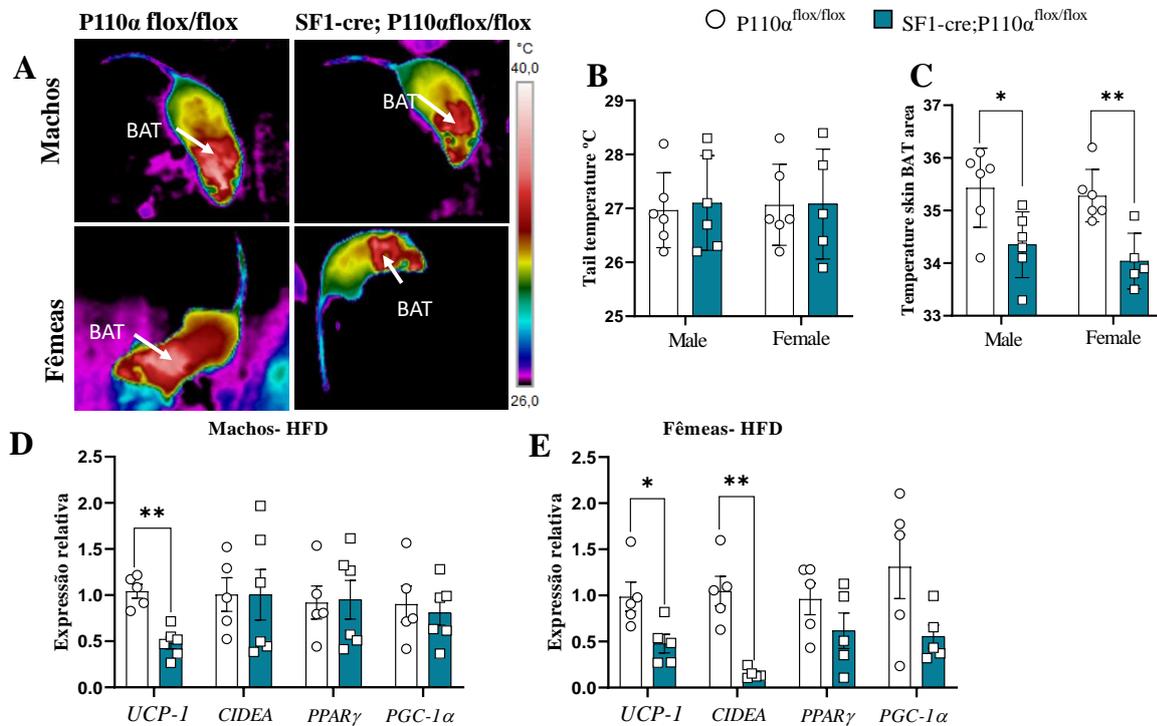


Figura 23. Deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 do VMH reduz a temperatura do TAM e expressão gênica dos marcadores de termogênese em camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD. Imagens termográficas de camundongos machos e fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} (A); Temperatura da cauda (B; n=6/grupo) e temperatura da pele na área ao redor do TAM (C; n=6/grupo). Expressão relativa de RNAm da *Ucp1*, *Cidea*, *Ppara* e *PGC1 α* no TAM dos camundongos machos (D; n= 5-7/grupo) e fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} (E; n= 6-7/ grupo). Dados como média \pm EPM e o teste t de Student bicaudal foi usado; p** <0.01 e *p<0,05 entre os grupos.

4.12. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz parcialmente os efeitos do 17 β -estradiol (E2) em fêmeas OVX no controle do peso corporal.

Nossos resultados evidenciam que a via de sinalização da PI3K demonstrou ser mais importante em camundongos fêmeas para atenuar o ganho do peso induzido pela HFD. Assim, investigamos se a PI3K poderia mediar os efeitos do tratamento crônico com E2 no controle do peso corporal. Os resultados demonstram que tanto em P110 α ^{flox/flox} OVX, quanto em SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} OVX, o tratamento com E2 reduziu significativamente o peso corporal em

comparação com os camundongos OVX (Figura 24A-B; $p < 0.05$). No entanto, o efeito do E2 em reduzir o peso corporal foi significativamente menor no grupo SF1-cre; P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ quando comparado ao grupo controle da deleção (Figura 24A-B; $p < 0.05$). Além disso, não encontramos diferença entre os grupos experimentais na ingestão alimentar diária acumulada (Figura 24C).

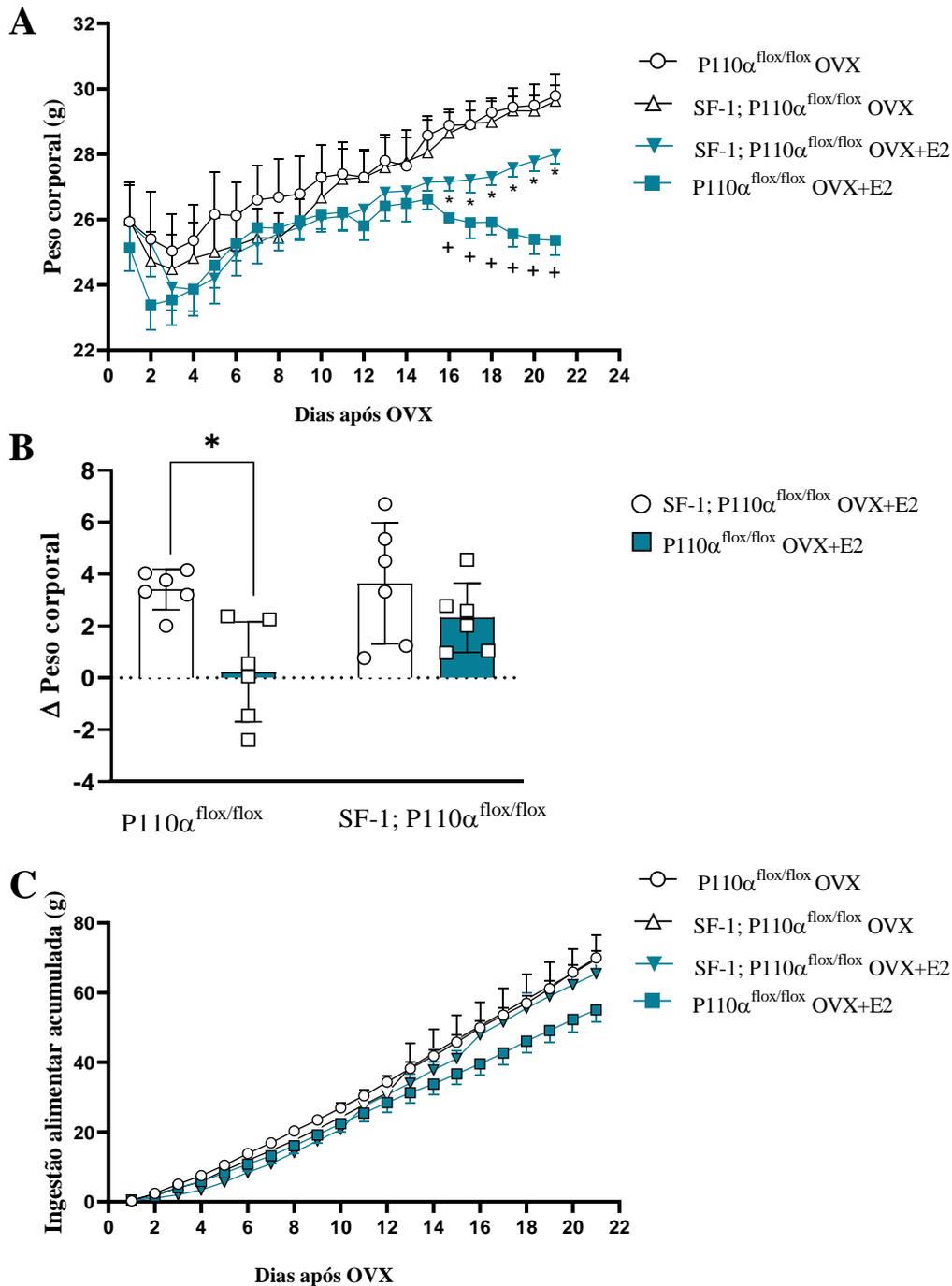


Figura 24. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz parcialmente os efeitos do E2 em fêmeas OVX sobre controle do peso corporal. Peso corporal (A; n = 6/grupo); delta de peso corporal (B; n=6/grupo) e ingestão alimentar acumulada (C; n=6/ grupo) em camundongos fêmeas controle OVX ou tratados com reposição crônica de E2. Dados como médias \pm EPM. $p < 0.05$ (*) entre os grupos determinado por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Animais alimentados com RD.

4.13. Deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 de VMH atenua os efeitos do 17 β -estradiol na redução da adiposidade em camundongos fêmeas OVX.

Para confirmar a eficácia do tratamento com E2 nos experimentos, os úteros foram pesados como um índice da concentração de estradiol circulante. O peso uterino foi maior tanto no grupo P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ quanto no SF1-cre P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ ovariectomizados que receberam o tratamento crônico com E2, quando comparado aos animais não tratados (Figura 25A; $P=0,0016$). Para caracterizar os fenótipos metabólicos, também analisamos a adiposidade. Observamos que não houve diferença entre os grupos no peso do fígado (Figura 25B). Camundongos P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ OVX apresentaram um maior peso do TABr quando comparado ao grupo P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ OVX+E2 (Figura 25C; $p < 0.01$). Por outro lado, não foi observado o mesmo efeito do E2 em camundongos SF1-cre P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ OVX. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos experimentais no peso do TABi e TAM (Figura 25D-E)

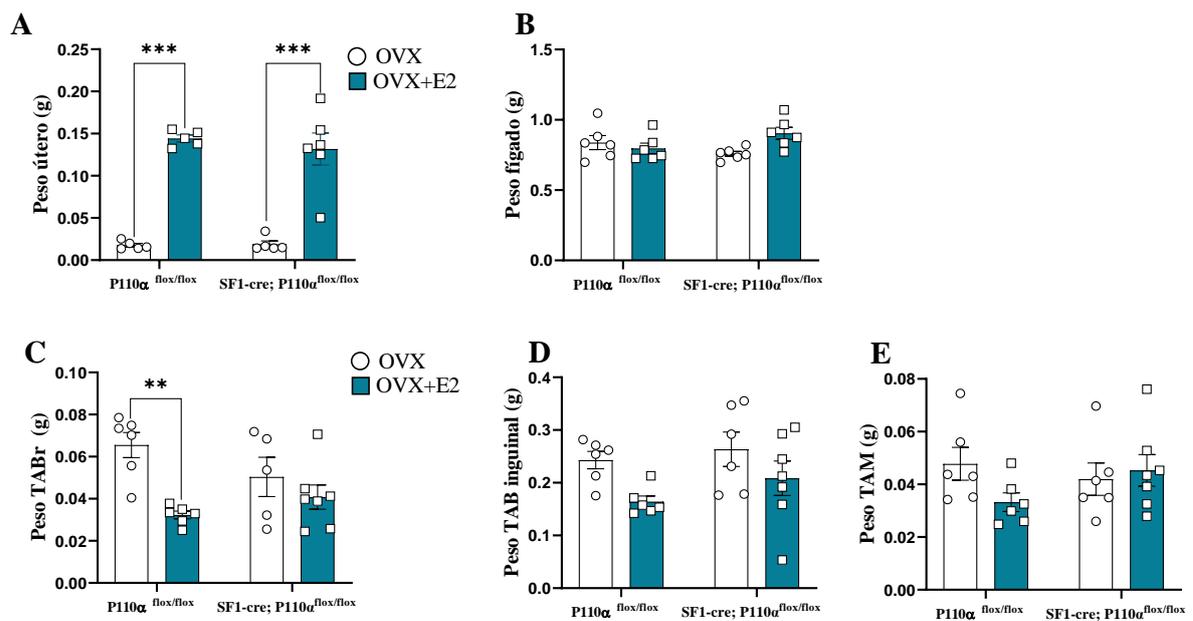


Figura 25. Deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 de VMH atenua os efeitos do 17 β -estradiol na redução da adiposidade em camundongos fêmeas OVX. Peso do útero (A; n=6/grupo); peso do fígado (B; n=6/grupo); peso do TABr (C; n=6/grupo), TABi (D; n=6/grupo) e TAM (E; n=6/grupo) de camundongos fêmeas SF1-cre;P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ e P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ OVX ou tratadas com tratamento crônico de 17 β -estradiol (E2). Dados como médias \pm EPM. $p < 0.01$ (**) entre os grupos determinado por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Animais alimentados com RD.

4.14. Deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH atenua os efeitos do 17 β -estradiol no aumento do gasto energético.

A calorimetria indireta demonstrou que o gasto de energético (figura 26A-E; $p < 0.05$) VO₂ (Figura 27A-E; $p < 0.05$) e VCO₂ (Figura 28A-E; $p < 0.05$) no período de 24 horas e ciclo escuro, aumentou em camundongos P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ OVX que receberam tratamento com E2. No entanto, o tratamento com E2, não promoveu este mesmo efeito nos animais SF1-cre P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$. Além disso, nenhuma diferença foi observada entre os grupos na atividade locomotora (Figura 28A-E).

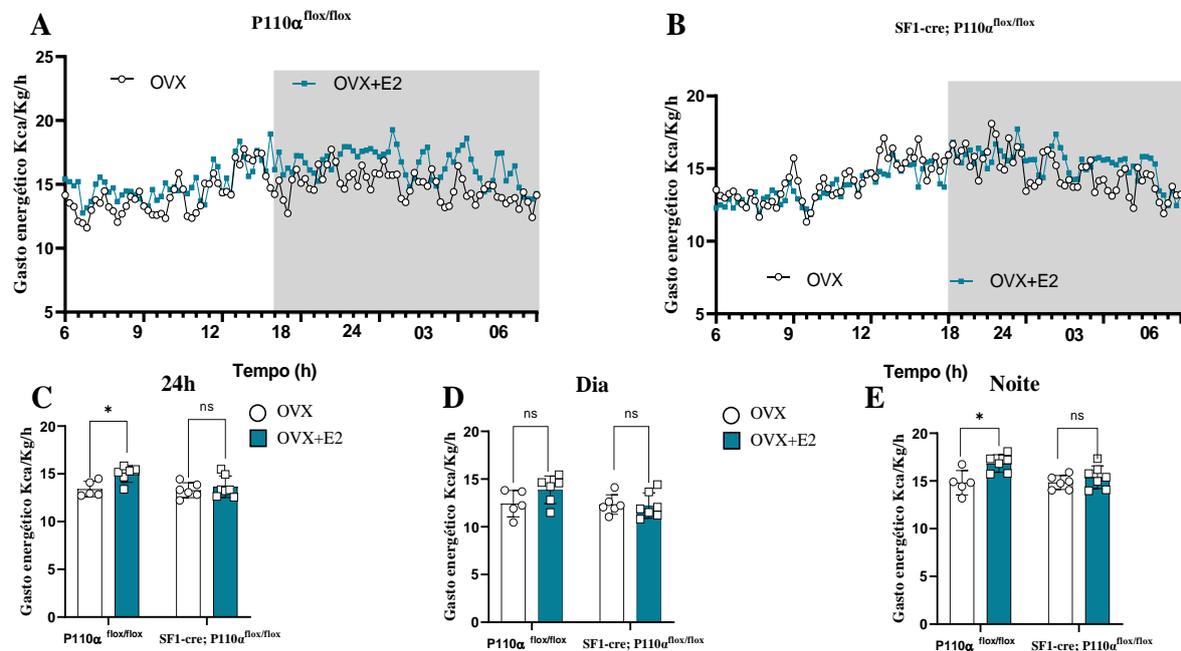


Figura 26. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH atenua os efeitos do E2 no aumento do gasto energético. Gasto energético em camundongos fêmeas P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ OVX ou OVX+E2 (A; n=6/ grupo) e SF1-cre P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ (B; n= 6/grupo). Gasto energético durante o período de 24 horas (C; n= 6/grupo), ciclo claro (D; n= 6/grupo) ou ciclo escuro (E; n= 6/grupo) em todos os quatro grupos. Os dados são apresentados como média \pm

EPM. * $p < 0.05$ entre OVX+V e OVX+E2. Teste t student não pareado bicaudal, para comparação entre médias de 2 grupos foi utilizado.

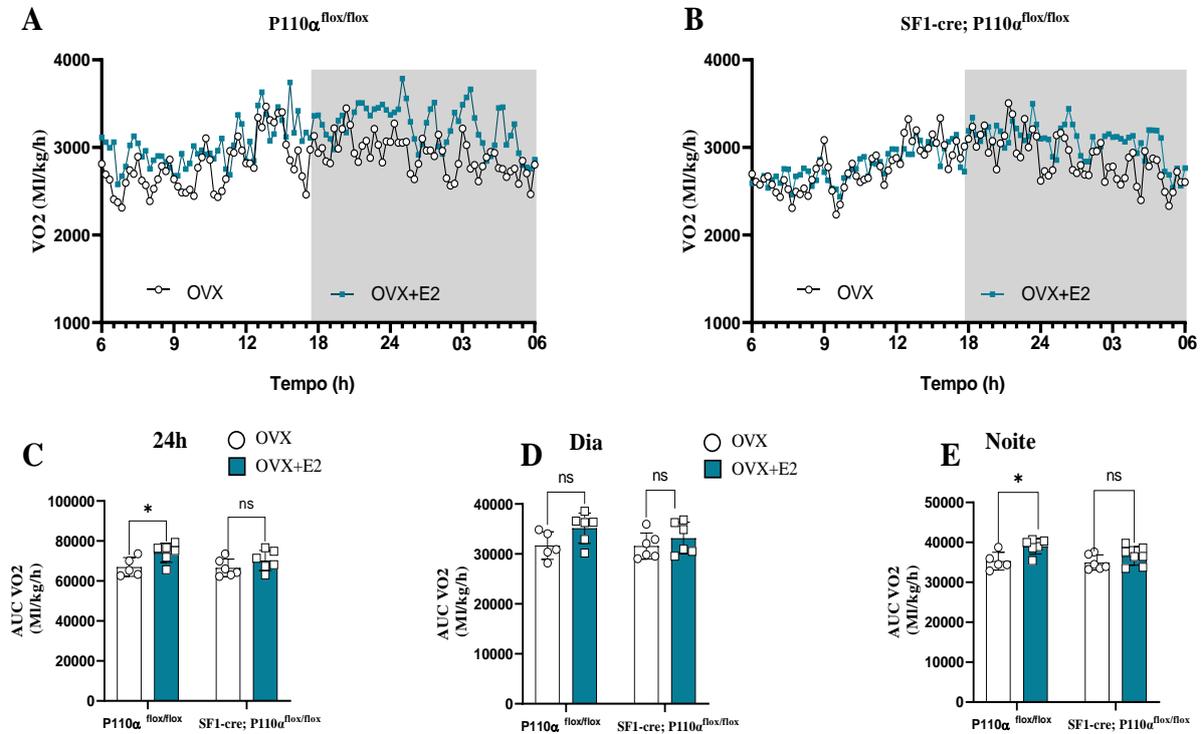


Figura 27. A deleção da subunidade catalítica $P110\alpha$ nos neurônios SF1 do VMH atenua os efeitos do E2 aumento do consumo de O_2 . Consumo de O_2 em camundongos fêmeas $P110\alpha^{flox/flox}$ OVX ou OVX+E2 (A; $n=6$ / grupo) e SF1-cre $P110\alpha^{flox/flox}$ (B; $n= 6$ /grupo). Consumo de O_2 durante o período de 24 horas (C; $n= 6$ /grupo), ciclo claro (D; $n= 6$ /grupo) ou ciclo escuro (E; $n= 6$ /grupo) em todos os quatro grupos. Os dados são apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ entre OVX+V e OVX+E2. Teste t student não pareado bicaudal, para comparação entre médias de 2 grupos foi utilizado.

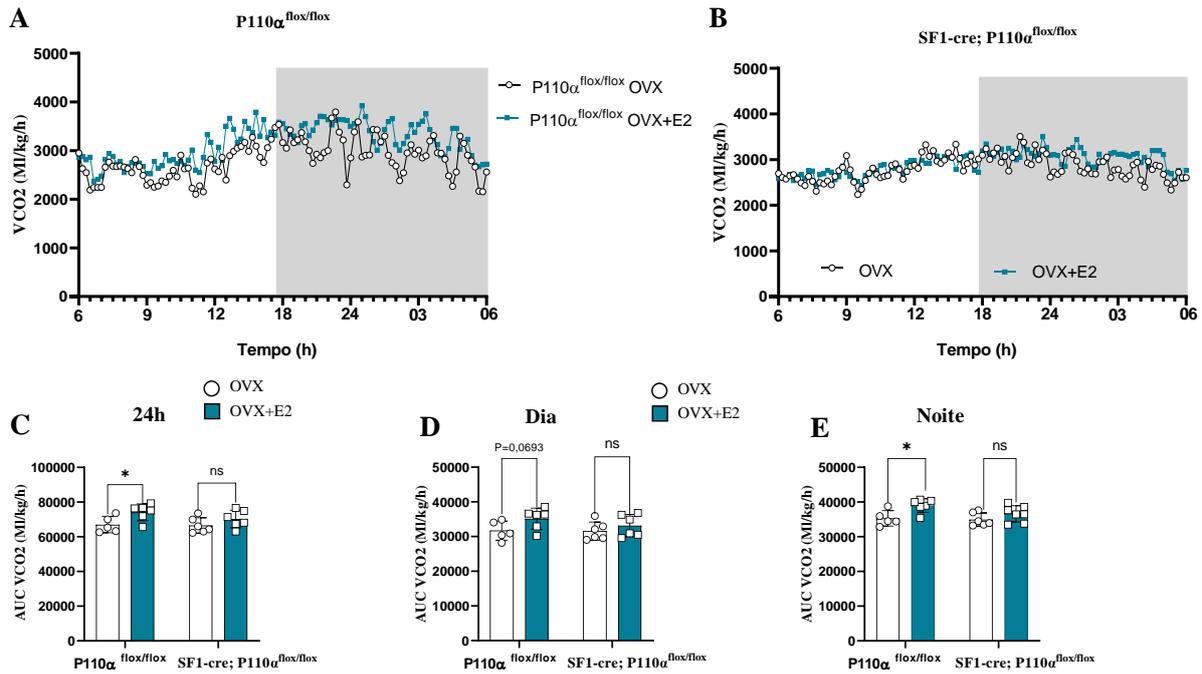


Figura 28. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH atenua os efeitos do E2 no aumento da produção de CO₂. Produção de CO₂ em camundongos fêmeas P110 α ^{flox/flox} OVX ou OVX+E2 (A; n=6/ grupo) e SF1-cre P110 α ^{flox/flox} (B; n= 6/grupo). Produção de CO₂ durante o período de 24 horas (C; n= 6/grupo), ciclo claro (D; n= 6/grupo) ou ciclo escuro (E; n= 6/grupo) em todos os quatro grupos. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *p<0.05 entre OVX+V e OVX+E2. Teste t student não pareado bicaudal, para comparação entre médias de 2 grupos foi utilizado.

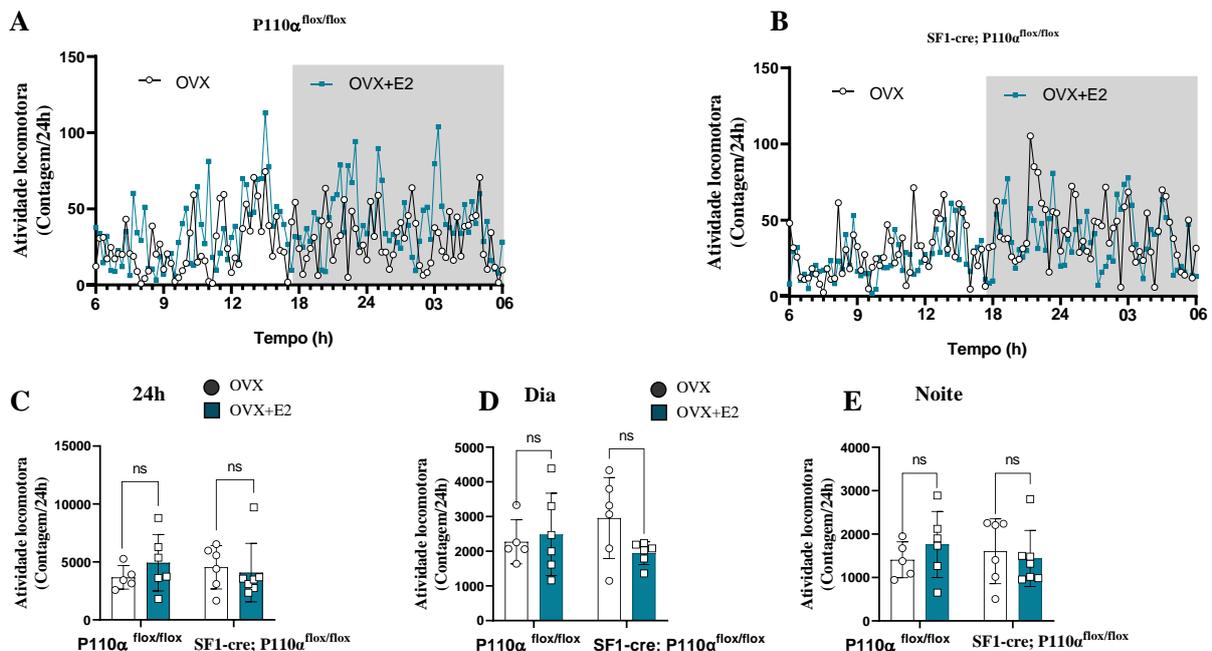


Figura 29. Efeito da deleção da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 do VMH em camundongos fêmeas OVX tratados com E2 na atividade locomotora. Atividade

locomotora em camundongos fêmeas $P110\alpha^{flox/flox}$ OVX ou OVX+E2 (A; $n=6$ / grupo) e SF1-cre $P110\alpha^{flox/flox}$ (B; $n= 6$ /grupo). Atividade locomotora durante o período de 24 horas (C; $n= 6$ /grupo), ciclo claro (D; $n= 6$ /grupo) ou ciclo escuro (E; $n= 6$ /grupo) em todos os quatro grupos. Os dados são apresentados como média \pm EPM. * $p<0.05$ entre OVX+V e OVX+E2. Teste t student não pareado bicaudal, para comparação entre médias de 2 grupos foi utilizado.

4.15. A deleção da subunidade catalítica $P110\alpha$ nos neurônios SF1 do VMH reduz os efeitos do 17β -estradiol em fêmeas OVX na indução da termogênese.

A ativação dos neurônios SF1 do VMH promove modulação simpática no TAM, promovendo aumento da produção de calor por meio da termogênese (XU et al., 2018). Assim, analisamos o efeito da deleção da subunidade catalítica $P110\alpha$ nos neurônios do VMH sobre a termogênese do TAM. Observamos por meio da termografia que camundongos $P110\alpha^{flox/flox}$ OVX tratados com E2 apresentaram aumento da temperatura da pele ao redor do TAM, porém esta resposta não foi observada em camundongos SF1-cre; $P110\alpha^{flox/flox}$ que receberam reposição hormonal (Figura 30A-B; $p < 0.05$). Além disso, não houve diferença entre os grupos experimentais na temperatura da cauda (Figura 30C) e temperatura retal (Figura 30D).

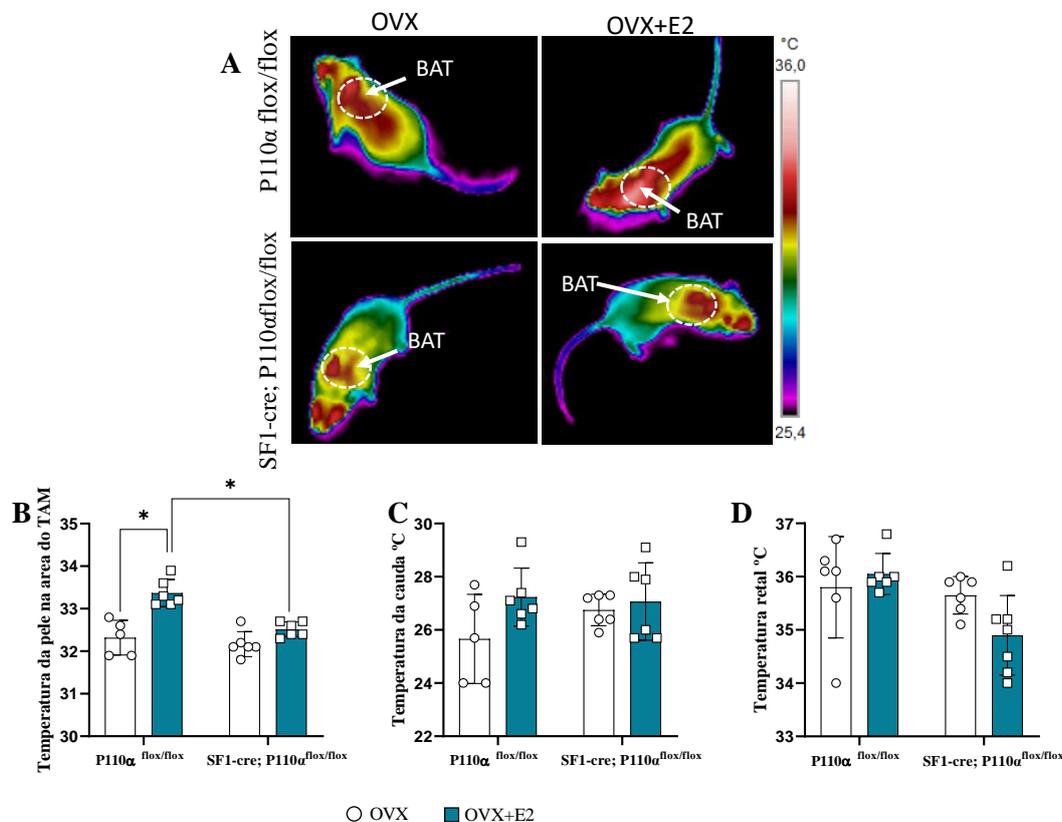


Figura 30. A deleção da subunidade catalítica $P110\alpha$ nos neurônios SF1 do VMH reduz os efeitos do E2 em fêmeas OVX na indução da termogênese. Imagem de termografia de

camundongos fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} e P110 α ^{flox/flox} OVX ou OVX+E2 (A); Temperatura da cauda (B; n=6/grupo); temperatura da pele ao redor do TAM (C; n=6/grupo) e temperatura retal (C). Dados como médias \pm EPM. *p < 0.05 entre os grupos, determinado por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey.

Analisamos a expressão gênica dos marcadores de termogênese como a UCP1, CIDEA, PPAR γ e PGC1 α . Os resultados evidenciam que nos camundongos fêmeas P110 α ^{flox/flox} OVX+E2, houve um aumento na expressão dos genes *UCP1* e *CIDEA* no TAM quando comparado ao grupo P110 α ^{flox/flox}. Por outro lado, esta resposta não foi observada nos animais SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} OVX tratados com E2 (Figura 31A-D; p < 0.05).

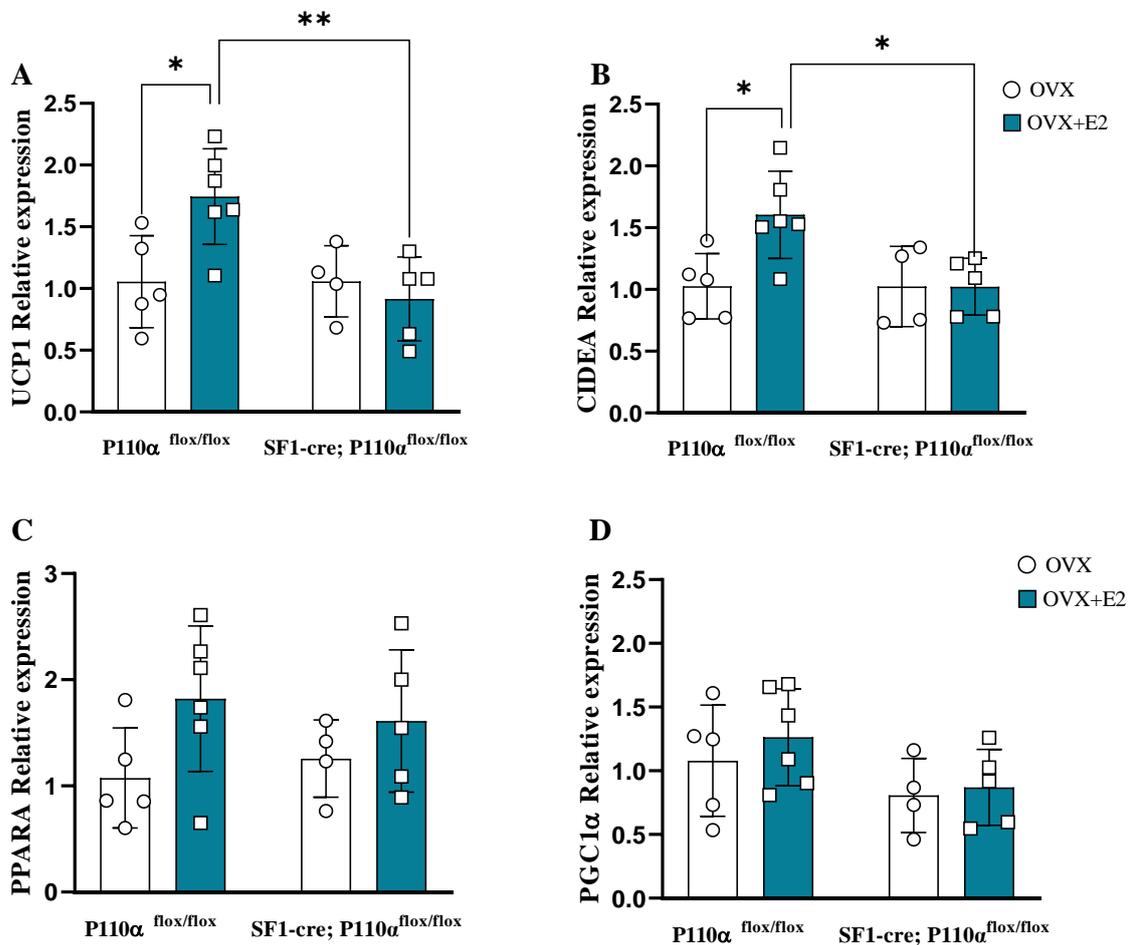


Figura 31. A deleção da subunidade catalítica P110 α nos neurônios SF1 do VMH reduz os efeitos do 17 β -estradiol em fêmeas OVX no aumento da expressão gênica dos marcadores de termogênese. Expressão relativa de RNAm da *Ucp1* (A; n= 5-6/grupo), *Cidea* (B; n= 5-6/grupo), *Ppara* (C; n= 5-6/grupo), e *Pgc1 α* (D; n= 5-6/grupo), no TAM dos camundongos fêmeas P110 α ^{flox/flox} e SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} com ou sem reposição hormonal

com E2. Dados como médias \pm EPM. * $p < 0.05$ entre os grupos, determinado por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey.

Para investigar a participação da atividade simpática na termogênese, analisamos as concentrações plasmáticas e teciduais de noradrenalina. Observamos que não houve alteração da noradrenalina circulante (Figura 32A). No TAM, camundongos $P110\alpha^{flox/flox}$ ovariectomizados que receberam reposição hormonal com E2 apresentaram aumento nas concentrações plasmáticas de noradrenalina. Por outro lado, em camundongos com atividade da PI3K reduzida no VMH, o E2 não foi capaz de aumentar a atividade simpática no TAM (Figura 31B; $p < 0.05$). Não houve diferença entre os grupos nas concentrações de noradrenalina no TABi (Figura 32C).

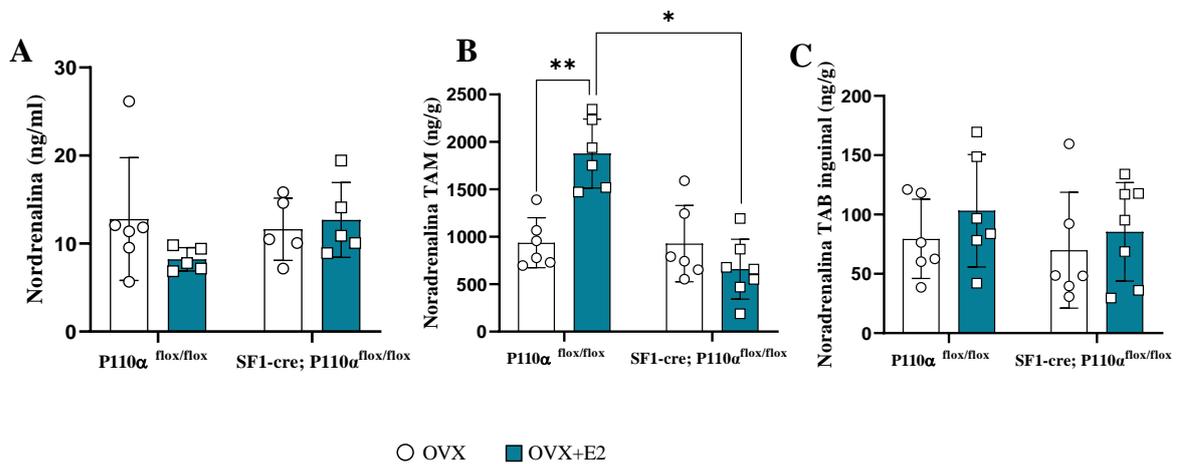


Figura 32. A deleção da subunidade catalítica $P110\alpha$ nos neurônios SF1 do VMH reduz os efeitos do 17β -estradiol em fêmeas OVX na indução da atividade simpática no TAM. Níveis plasmáticos de noradrenalina (A; $n=6$ /grupo). Concentração de noradrenalina no TAM (B; $n=6$ /grupo). Concentração de noradrenalina no TABi (C; $n=6$ /grupo). Dados como médias \pm EPM. * $p < 0.05$ entre os grupos, determinado por Two-Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey

Discussão

5. DISCUSSÃO

O VMH desempenha um papel importante na proteção contra a obesidade induzida por dieta (DIO), exercendo um efeito sobre a ingestão de alimentos e gasto energético (DHILLON et al., 2006; BINGHAM et al., 2008; XU et al., 2010, GONÇALVES, 2020). No entanto, os mecanismos intracelulares envolvidos nessas ações ainda são pouco compreendidos. Buscando preencher esta lacuna, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da deleção específica da subunidade catalítica P110 α da PI3K em neurônios SF1 do VMH sobre o peso corporal, ingestão alimentar, homeostase glicêmica, gasto energético e termogênese do TAM em camundongos machos e fêmeas. Para isso, utilizamos a metodologia cre-lox para gerar animais com ruptura da expressão da subunidade catalítica P110 α da PI3K em neurônios SF1, os quais constituem a maior população neuronal do VMH (CHOI et al., 2013).

Nossos resultados demonstram que sob RD, a deleção específica da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1 do VMH, não afeta a ingestão alimentar, peso corporal e controle glicêmico em camundongos machos. Contudo, há uma redução do consumo de O₂, e gasto energético nos animais com 18 semanas de idade; porém o menor gasto energético observado, não influenciou no ganho do peso corporal nos animais machos com deleção. Esses dados em conjunto, corroboram com o estudo realizado por XU et al., 2010 que demonstrou que a deleção da P110 α em neurônios do VMH em animais machos não altera a homeostase energética.

De maneira similar, camundongos fêmeas com a atividade da PI3K reduzida no VMH também não apresentaram alteração no peso corporal e controle glicêmico sob RD. Um estudo realizado por Saito e colaboradores, em contrapartida, demonstrou que fêmeas SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} alimentadas com dieta normocalórica, apresentam um discreto aumento do peso corporal e gasto energético quando comparadas ao grupo controle da deleção (SAITO et al., 2016). Contudo, não observamos esta mesma resposta de alteração no peso corporal e gasto energético em fêmeas.

Quando submetidos ao desafio metabólico com HFD, os resultados demonstram que a ausência da subunidade catalítica P110 α em neurônios SF1, promove um aumento de ganho de peso corporal sem alterar a ingestão alimentar nos camundongos machos. Observou-se também que os animais SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} apresentam uma redução do gasto energético.

Corroborando com os nossos achados, o estudo realizado por Xu et al, evidenciou pela primeira vez que a redução da atividade da PI3K no VMH promove aumento do peso corporal e redução do metabolismo em camundongos machos submetidos à HFD. Além disso, observou-se que o efeito da leptina em reduzir a ingestão de alimentos foi significativamente atenuado em camundongos machos com deleção da P110 α (XU et al., 2010). Considerando esses achados, podemos supor que a redução da atividade da PI3K no VMH contribui para a redução da ação da leptina na homeostase energética.

A desregulação no balanço energético observada em animais com deleção da subunidade P110 α nos neurônios SF1 quando submetidos à HFD, demonstra o papel do VMH no controle do peso corporal no contexto do balanço energético positivo. Diferentes modelos experimentais com animais geneticamente modificados resultaram em efeitos semelhantes aos observados em nosso estudo. A deleção de LepR nos neurônios SF1 do VMH, por exemplo, causa aumento do peso corporal dos animais apenas quando submetidos à HFD (DHILLON et al., 2006; BINGHAM et al., 2008). Essa mesma resposta foi observada com a deleção de moléculas como ER α e sirtuína 1 (SIRT1) ou do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) especificamente em neurônios SF1 do VMH (RAMADORI et al., 2011; XU et al., 2011, GONÇALVES et al., 2020). Todos esses achados enfatizam o papel dos neurônios SF1 na promoção de efeitos protetores sobre o ganho de peso corporal em situações de aumento do consumo calórico. Nesse contexto, nossos resultados reforçam um importante papel da via de sinalização da PI3K nos efeitos protetores do VMH contra DIO. Além disso, os presentes resultados indicam que a PI3K medeia a proteção contra DIO via neurônios do VMH por meio do aumento do gasto energético. No presente estudo observamos também que a diminuição da atividade de PI3K no VMH causa prejuízo na homeostase energética em animais alimentados com HFD em um padrão sexo-específico, ocorrendo um maior ganho de peso corporal em camundongos fêmeas.

O VMH além de exercer efeitos no controle da homeostase energética, também tem sido associado com importantes ações na homeostase glicêmica. A primeira evidência dessas ações foi feita por Borg e colaboradores que demonstraram que a lesão química do VMH em ratos resultava em perda da resposta contra à hipoglicemia promovida por hormônios contrarreguladores da insulina como glucagon, adrenalina e noradrenalina (BORG et al., 1994). Por outro lado, estudos demonstraram que a estimulação elétrica do VMH causa aumento da utilização de glicose em tecidos periféricos como o músculo esquelético e TAM (SHIMAZU et al., 1991; SUDO et al., 1991). Esses subtipos de sensores de glicose são

atualmente mais comumente referidos como neurônios ativados por alta glicose (GE) que quando acionados estimulam a captação de glicose pelo fígado, coração e músculo esquelético. E os neurônios ativados por baixa glicose (GI), que por sua vez, estimulam a liberação de catecolaminas pela glândula adrenal e o glucagon pelo pâncreas, resultando no aumento da produção de glicose pelo fígado. Aproximadamente metade dos neurônios GE no VMH também apresentam receptores para leptina (IRANI et al., 2008; SHIMAZU E MINOKOSHI, 2017). Esses dados em conjunto, sugerem um papel relevante do VMH em integrar sinais que regulam a homeostase glicêmica. Nossos resultados, por sua vez, demonstram que a ausência da subunidade catalítica P110 α da PI3K em neurônios SF1 promove uma redução na sensibilidade à insulina em machos e fêmeas alimentados com HFD. Neste contexto, um estudo realizado por Fujikawa e colaboradores evidenciou que a subunidade P110 β da PI3K no VMH regula a homeostase da glicose em camundongos machos. Assim sugerimos que há um papel importante dessa via de sinalização intracelular no controle glicêmico em um contexto de balanço energético positivo.

Camundongos knockout para SF1 desenvolvem obesidade principalmente porque apresentam redução no gasto energético (MAJDIC et al., 2002). No presente estudo, mostramos que o ganho de peso corporal em camundongos machos e fêmeas com ruptura de P110 α no VMH não é atribuído ao aumento da ingestão alimentar, mas sim à redução do gasto energético, de maneira semelhante ao que ocorre com camundongos nocaute para SF1. No nosso estudo encontramos uma diminuição do gasto energético sem haver alterações na atividade locomotora em animais com redução da atividade da PI3K no VMH. Assim, hipotetizamos que a termogênese do TAM poderia estar reduzida nos animais knockout, contribuindo para a redução do gasto energético observado.

Os resultados revelaram que em ambos os sexos, a deleção da subunidade P110 α promove uma redução na temperatura da pele ao redor do TAM e diminui a expressão do RNAm dos marcadores termogênicos como a *Ucp1* e a *Cidea*; indicando uma redução na termogênese. Estudos anteriores indicaram que a atividade do sistema nervoso simpático (SNS) é necessário para manter a capacidade termogênica do TAM (SHIMIZU et al., 2014) e a ativação dos neurônios SF1 do VMH contribui com a modulação simpática do TAM para induzir a termogênese (XU et al., 2018). A interrupção da sinalização do SNS promove um aumento de gotículas lipídicas promovendo o “branqueamento” do TAM, acompanhado por uma redução na atividade mitocondrial neste tecido adiposo (MOBBS et al., 2013). De fato, os camundongos que desenvolvem DIO, apresentam atividade do SNS prejudicada e clareamento

do TAM. Além disso, estudos anteriores mostraram que lesões no VMH causam disfunção mitocondrial e reduzem a oxidação de ácidos graxos, indicando que a integridade do VMH é necessária a função termogênica adequada do TAM (SEYDOUX, et al., 1981; SAITO & SHIMAZU, 1984). Nossos resultados por sua vez, mostram que o comprometimento da atividade da PI3K especificamente em neurônios SF1 do VMH, reduz a temperatura do TAM e marcadores de termogênese em camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD, indicando que a via de sinalização da PI3K no VMH contribui para a modulação da atividade simpática do TAM.

Nossos resultados demonstram a importância da via PI3K no VMH para atenuar a DIO e estão de acordo com estudos anteriores realizados por XU et al (2010). Além disso, nossos achados mostram pela primeira vez que em camundongos fêmeas alimentados com HFD, a redução da atividade de PI3K no VMH promove um aumento maior do peso corporal e adiposidade, quando comparado a camundongos machos. Semelhante ao que observamos neste estudo, Gonçalves e colaboradores, demonstraram que a redução da sinalização de STAT3, considerada uma das principais vias recrutadas pela leptina no VMH, promove maior ganho de peso em camundongos fêmeas quando comparados a camundongos machos alimentados com HFD (GONÇALVES et al., 2020). Tomados em conjunto, esses dados sugerem que fêmeas desafiadas com HFD se tornam mais suscetíveis a desenvolver distúrbios metabólicos como a obesidade, quando a atividade de vias de sinalização intracelular específicas, como STAT3 e PI3K no VMH são deficientes.

O hormônio estradiol, além de exercer funções importantes no sistema reprodutor feminino, também executa um papel relevante na regulação do balanço energético e peso corporal (WADE & GRAY, 1979). A redução da produção de E2 após a menopausa está associada a uma maior probabilidade de desenvolver obesidade e diabetes tipo 2 (CARR, 2003). Em animais experimentais, a diminuição dos níveis circulantes deste hormônio pela ovariectomia, leva ao desenvolvimento de hiperfagia, obesidade e hiperglicemia, que são revertidas pela reposição hormonal (SILVA et al., 2010; WADE & GRAY, 1979).

Uma vez produzido pelos ovários, o E2 liberado na corrente sanguínea medeia ações metabólicas controlando o peso corporal, distribuição de gordura e os níveis glicêmicos, por meio da ativação do receptor $ER\alpha$, como tem sido demonstrado em modelos experimentais utilizando camundongos mutantes *knockout* para o $ER\alpha$ ($ER\alpha^{-/-}$), nos quais a ablação da sinalização mediada por este receptor, resulta na síndrome metabólica (HEINE et al., 2000;

OGAWA et al., 2003; BRYZGALOVA et al., 2006). Além disso, as alterações metabólicas observadas em camundongos mutantes $ER\alpha^{-/-}$, não são evidentes no camundongo mutante para a isoforma β do receptor para E2 ($ER\beta^{-/-}$), o que confirma que a isoforma $ER\alpha$ medeia a maioria dos efeitos do hormônio ovariano no controle do balanço energético.

O VMH tem sido considerado um dos principais locais de ação do estradiol na homeostase energética, uma vez que o receptor $ER\alpha$ é expresso em grande quantidade na subdivisão ventral lateral do VMH (vlVMH) (VAN VENN et al., 2020). Estudos demonstraram que camundongos com silenciamento do gene *Era* especificamente no VMH, desenvolvem um fenótipo de obesidade similar ao observado no animal *knockout* para $ER\alpha$ (YOKOSUKA et al., 1997; MUSATOV et al., 2007). Além disso, a deleção de *Era* exclusivamente em neurônios SF1 do VMH promove aumento do peso apenas quando os animais são desafiados com HFD (XU et al., 2011).

O E2 via $ER\alpha$ é capaz de ativar diferentes vias de sinalização intracelular por meio de mecanismos não clássicos envolvendo receptores nucleares, incluindo a STAT3. Neste contexto, Gao e colaboradores evidenciaram que camundongos fêmeas com deleção de STAT3 no SNC e ovariectomizadas não apresentam redução no peso corporal com a reposição com E2 (GAO et al., 2007). Assim como a STAT3, foi descrita na literatura como uma via intracelular importante para as ações do hormônio E2 na homeostase energética, acreditamos que há uma interação entre a via de sinalização da PI3K e os receptores $ER\alpha$, em núcleos hipotalâmicos que regulam o peso corporal como o VMH. Um estudo realizado por MALYALA et al (2008), demonstrou por meio de hibridação *in situ*, que o E2 aumenta a expressão do RNAm da subunidade catalítica da PI3K no VMH. Além disso, uma única dose de injeção subcutânea de E2 aumenta significativamente a fosforilação da AKT no VMH, mas não no Arc (PARK, et al., 2011). Nossos resultados por sua vez, mostraram que a redução da atividade da PI3K no VMH, reduz parcialmente o efeito do hormônio ovariano E2 na redução do peso corporal, adiposidade e aumento do gasto energético em camundongos fêmeas ovariectomizadas que receberam reposição hormonal. Nossos resultados estão de acordo com o estudo realizado por Saito e colaboradores que evidenciaram que a redução da atividade da PI3K nos neurônios SF1 reduz parcialmente o efeito do E2 no controle do peso corporal (SAITO et al., 2016).

Um estudo realizado por MARTINEZ DE MORENTIN et al (2014), observou que camundongos fêmeas OVX tratadas com injeção central de E2 diretamente no VMH,

apresentam aumento da expressão da STA3 fosforilada, associado ao aumento da ativação simpática do TAM, resultando no aumento da termogênese. Além disso, os pesquisadores evidenciaram que os efeitos mediados pelo estradiol na atividade simpática do TAM via VMH, são dependentes dos receptores ER α e mediados pela inibição da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no VMH (MARTINEZ DE MORETIN et al., 2014). No presente estudo, demonstramos pela primeira vez que o E2 em neurônios SF1 do VMH recruta a via de sinalização intracelular da PI3K para induzir a atividade simpática e termogênese do TAM. Em conjunto, nossas descobertas evidenciam que os efeitos do E2 na homeostase energética são reduzidos em camundongos ovariectomizados com ruptura da subunidade P110 α nos neurônios SF1. Nossos resultados são consistentes com o papel do E2 no VMH sob o controle da homeostase energética já demonstrado na literatura.

A estimulação de neurônios ER α na região VMHvl usando a técnica quimiogenética, promove aumento da atividade do TAM, aumentando a produção de calor em camundongos machos e fêmeas, demonstrando que o E2 atua via VMH para aumentar o gasto energético (VEEN et al., 2020). Esses dados são reforçados pelo recente estudo realizado por Ye et al, (2022), demonstrando projeções de neurônios glutamatérgicos que expressam ER α do vlVMH para neurônios serotoninérgicos (5-HT) do DRN, as quais estão envolvidos com o aumento da termogênese do TAM. Considerando esses achados da literatura, podemos propor que a sinalização intracelular da PI3K pode ser recrutada com a ativação dos receptores ER α de neurônios do VMHvl, exercendo um papel importante no circuito hipotalâmico envolvido no controle do gasto energético.

Em resumo, nosso estudo demonstra um papel crucial da via de sinalização intracelular da PI3K em neurônios SF1 do VMH, na proteção contra DIO em um padrão sexo-específico (Figura 33). Assim, nossos achados complementam a literatura com dados importantes sobre o papel do VMH em proteger o organismo do excesso de ganho de peso frente a uma dieta rica em calorias e avança no conhecimento científico, contribuindo com os mecanismos intracelulares envolvidos na regulação da homeostase energética, que podem futuramente se tornar alvo no desenvolvimento de terapias direcionadas ao tratamento da obesidade. Além disso, nossos achados demonstram que a sinalização mediada pela PI3K nos neurônios SF1 é necessária para os efeitos do estradiol na homeostase energética, trazendo evidências científicas que a via da PI3K pode ser um novo alvo terapêutico a ser estudado na menopausa.

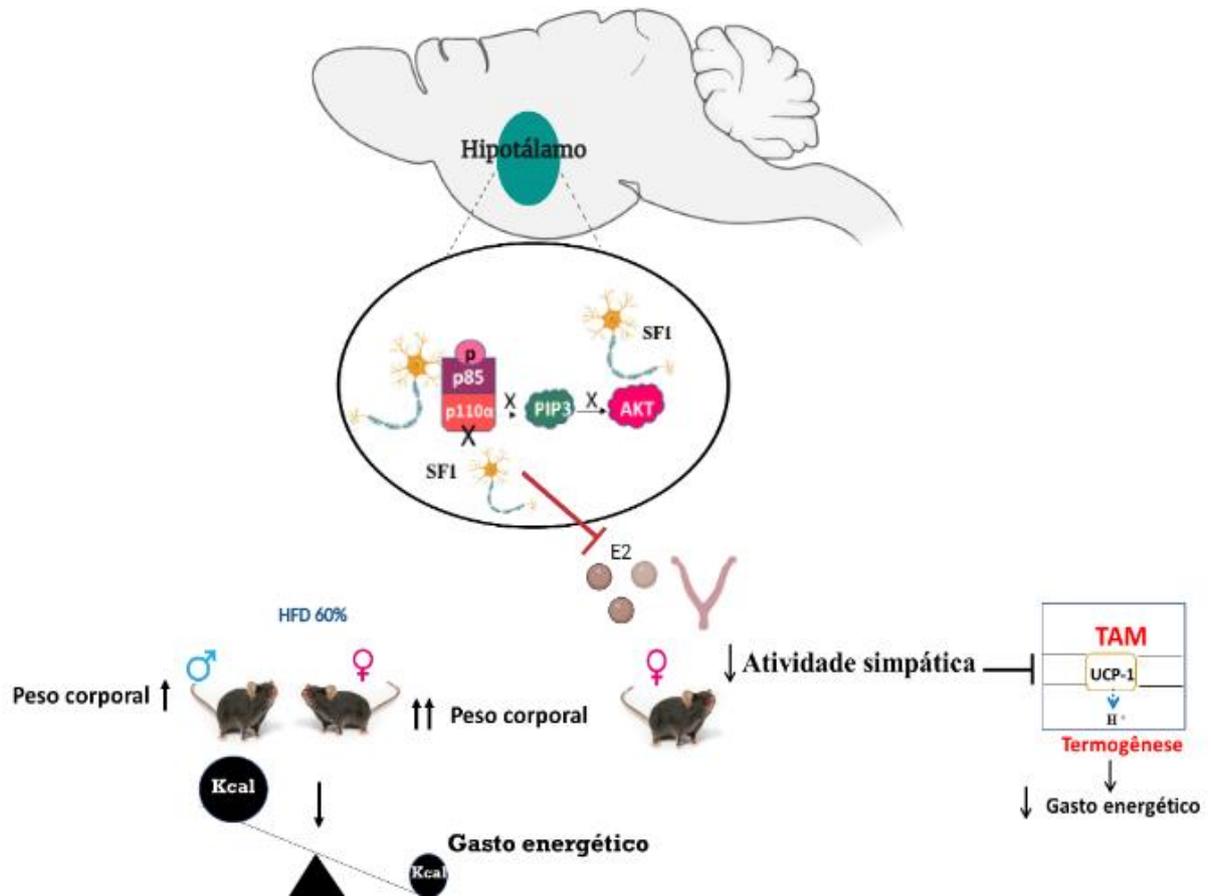


Figura 33. Esquema representativo dos efeitos da redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 do VMH, sobre o controle do peso corporal em camundongos machos e fêmeas desafiados com HFD; e nas ações do 17 β estradiol na homeostase energética.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Em suma, nossos resultados demonstram que a deleção da subunidade catalítica P110 α da PI3K no VMH, não altera o peso corporal e homeostase glicêmica sob dieta normocalórica. Por outro lado, a redução da atividade da PI3K em neurônios SF1 causa desbalanço energético sob dieta hiperlipídica de uma maneira sexo-específica. Além disso, a deleção da subunidade catalítica P110 α causou tolerância reduzida à insulina em camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD. O presente trabalho demonstrou também, que a via de sinalização intracelular da PI3K no VMH é necessária para mediar os efeitos do E2 no controle do peso corporal.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity* (Silver Spring, Md.), v. 14, p. 242S-249S, 2006.

AHIMA, R. S.; PRABAKARAN, D.; MANTZOROS, C.; QU, D.; LOWELL, B.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J. S. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, v. 382, n. 6588, p. 250–252, 1996.

BACHMAN, E. S.; DHILLON, H.; ZHANG, C-Y.; CINTS, S.; BIANCO, A.C.; KOBILKA, B.K. BetaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* v.297, p.843–845, 2012.

BALTHASAR, N.; DALGAARD, L. T.; LEE, C. E., YU, J.; FUNASHI, H.; WILLIAMS, T.; FERREIRA, M.; TANG, V.; MCGOVERN, R. A.; KENNY, C. D. et al. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*, v.123, p.493-505, 2005.

BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W.; SEELEY, R. J.; WOODS, S. C.; PORTE, D.; BREININGER, J. F.; JONAK, Z.; SCHAEFER, J.; KROUSE, M.; BURGHARDT, C.; ARTHUR CAMPFIELD, L.; BURN, P.; KOCHAN, J. P. Leptin Receptor Long-form Splice-variant Protein Expression in Neuron Cell Bodies of the Brain and Co-localization with Neuropeptide Y mRNA in the Arcuate Nucleus. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry Veterans Affairs Puget Sound Health Care System*. v. 47, n.3, p. 353-362, 1999.

BARTNESS, T.J.; RYU, V. Neural control of white, beige and brown adipocytes. *Int. J.Obes.Supp.Relat.Metab.Disord.* v.5, p.35–39, 2015a.

BARTNESS, T.J.; VAUGHAN, C. H.; SONG, C. K. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int. J.Obes (Lond)*, v. 34, p.36–S42, 2010b.

BATES, S.H.; STERARNS, W. H.; DUNDON, T. A.; SCUBERT, M.; TSO, A. W. K.; WANG, Y. STAT3 signaling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*, v.421, p.856–859, 2003.

BELL, C.G.; WALLEY, A.J.; FROGUEL, P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Gene*, n.6, v.3, p.221-34, 2005.

BROBERGER, C.; JOHANSEN, J.; JOHANSSON, C.; SCHALLING, M.; HOKFELT, T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. December, p. 15043–15048, 1998.

BINGHAM, N. C.; ANDERSON, K. K.; REUTER, A. L.; STALLINGS, N.R.; PARKER, K.L. Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. *Endocrinology*, v.149, n.5, p.2138-2148, 2008.

BOSTROM P, WU J, JEDRYCHOWSKI MP, KORDE A, YE L, LO JC, RASBACH KA, BOSTROM EA, CHOI JH, LONG JZ, KAJIMURA S, ZINGARETTI MC, VIND BF, TU H, CINTI S, HOJLUND K, GYGI SP. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like. *Spiegelman BM*, 2012.

BORGES, B.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CASTRO, M.; BITTENCOURT, J.C.; ELIAS, C.F.; ELIAS, L.L. Expression of hypothalamic neuropeptides and the desensitization of pituitary-adrenal axis and hypophagia in the endotoxin tolerance. *Horm Behav.* v,52, p.508-19, 2007.

BORG, W.P.; DURING, M.J.; SHERWIN, R.S.; BORG, M.A.; BRINES, M.L.; SHULMAN, G.I. Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. *J Clin Invest.* 1994 Apr;93(4):1677-82.

BUTERA, P.C.; CZAIA, J. A. Intracranial estradiol in ovariectomized guinea pigs: effects on ingestive behaviors and body weight. *Brain Res*, v. 322, p. 41–48, 1984.

BRYZGALOVA G, GAO H, AHREN B, ZIERATH JR, GALUSKA D, STEILER TL, DAHLMAN-WRIGHT K, NILSSON S, GUSTAFSSON JA, EFENDIC S, KHAN A. Evidence that oestrogen receptor- alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia.* v. 27, p.588-97, 2006.

BJØRBAEK C, UOTANI S, DA SILVA B, FLIER JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*, v. 51, p.32686- 95, 1997.

CALLE, E. E.; RODRIGUEZ, C.; WALKER-THURMOND, K.; THUN, M. J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med*, v. 348, p.1625-1638, 2003.

CAMHI, S.M.; BRAY, G.A.; BOUCHARD, C.; GEEWAY, F.L.; JONSON, W.D.; NEWTON, R.L. The relationship of waist circumference and BMI to visceral, subcutaneous, and total body fat: sex and race differences. *Obesity (Silver Spring)*, v.19, p.402–8, 2011.

CARR, M.C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 6, p.2404-11, 2003.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Ver*, v. 84, p. 277–359, 2004.

COLLINS, S.; YEHUDA-SHNAIDMAAN, E.; WANG, H. Positive and negative control of UCP1 gene transcription and the role of β -adrenergic signaling networks. *Int.J.Obes*, v.34, p.S28-S33, 2010.

COLLINS, S. β -Adrenoceptor Signaling Networks in Adipocytes for Recruiting Stored Fat and Energy Expenditure. *Front Endocrinol (Lausanne)*, v.2: 102, 2011.

CONTRERAS, C.; GONZALEZ, F.; FERNO, J.; DIÉGUEZ, C.; RAMOUNI, K.; NOGUEIRAS, R. The brain and brown fat. *Ann. Med.* V.47, p.150–168, 2014.

CLEGG, D.J.; AIR, E.L.; BENOIT, S.C.; SAKAI, R.S.; SEELEY, R.J.; WOODS, S.C. Intraventricular melanin-concentrating hormone stimulates water intake independent of food intake. *AmJ Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 284, p.494–9, 2003a.

CLEGG, D.J.; EDWARDS, G.L.; MARTIN, R.J. Central insulin potentiates eating elicited by 2-deoxy-D-glucose. *Physiol Behav*, v.78, p.331–6, 2003b.

CLEGG, D.J.; BENOIT, S.C.; AIR, E.L.; JACKMAN, A.; TSO P, Tso P, D’ALESSIO D. Increased dietary fat attenuates the anorexic effects of intracerebroventricular injections of MTII. *Endocrinology*, v.144, p.2941–6.28, 2003c.

CLEGG, D.J.; BROWN, L.M.; WOODS, S.C.; BENOIT, S.C. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*, v.55, p. 978–87, 2006.

CHOI YH, FUJIKAWA T, LEE J, REUTER A, KIM KW. Revisiting the Ventral Medial Nucleus of the Hypothalamus: The Roles of SF-1 Neurons in Energy Homeostasis. *Front Neurosci*, v.7, p.71, 2013.

DUBUC, P.U. Effects of estrogen on food intake, body weight, and temperature of male and female obese mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.180, p.468–73, 1985.

DEMERATH, E.W.; SUN, S.S.; ROGERS, N.; LEE, M.; CHOH, A.C. Anatomical patterning of visceral adipose tissue: race, sex, and age variation. *Obesity (Silver Spring)*. v.15, p. 2984–93, 2007.

DHILLON, H.; ZIGMAN, J. M.; YE, C.; LEE, C. E.; McGOVERN, R. A.; TANG, V. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron*, v.49, n.2, p.191-203, 2006.

EDWARDS, D.P. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol*, v.67, p.335–376, 2005.

ELIAS, C. F.; LEE, C.; KELLY, J.; ASCHKENASI, C.; AHIMA, R. S.; COUCEYRO, P. R.; KUHAR, M. J.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, v. 21, n. 6, p. 1375–1385, 1998.

ELIAS, C. F.; ASCHKENASI, C.; LEE, C.; KELLY, J.; AHIMA, R. S.; BJORBÆK, C.; FLIER, J. S.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*, v. 23, n. 4, p. 775–786, 1999.

ELMQUIST, J. K.; BJORBAEK, C.; AHIMA, R. S.; FLIER, J.S.; SAPER, C.; FLIER, J. S.; SAPER, C. B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*, v.395, n.4, p.535-547, 1998.

Fujikawa T, Choi YH, Yang DJ, Shin DM, Donato J Jr, Kohno D, Lee CE, Elias CF, Lee S, Kim KW. P110 β in the ventromedial hypothalamus regulates glucose and energy metabolism. *Exp Mol Med*, 2019.

FRANKLIN, K., PAXINOS, G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact 3^aed, 2008.

GAUTHIER, M.S.; MIYOSHI, H.; SOUZAA. S:C.; CACICDO, J. M.; SAHA, A:K.; GREENBERG, .S.; RUDERMAN, N.B..AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *J. Biol.Chem.* v.283, p.16514–16524, 2008.

GARCIA-GALIANO D, BORGES BC, DONATO J JR, ALLEN SJ, BELLEFONTAINE N, WANG M, ZHAO JJ, KOZLOFF KM, HILL JW, ELIAS CF. PI3K α inactivation in leptin receptor cells increases leptin sensitivity but disrupts growth and reproduction. *JCI Insight*. v. 23, 2017.

GAROFALO, M.A.R. et al. Effect of acute cold exposure on norephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *Journal of Autonomic nervous System*, v.60, p, 206-208, 1996.

GAVÉRIAUX-RUFF, C.; KIEFFER, BL. Conditional gene targeting in the mouse nervous system: insights into brain function and diseases. *Pharmacology and Therapeutics*. v.113. n.3. p. 619-634. 2007.

GAO Q, MEZEI G, NIE Y, RAO Y, CHOI CS, BECHMANN I, LERANTH C, TORAN-ALLERAND D, PRIEST CA, ROBERTS JL, GAO XB, MOBBS C, SHULMAN GI, DIANO S, HORVATH TL. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med*, v.13, p.89-94, 2007.

GOOFMAN-GRUEN, D.; BARRETT-CONNOR, E. Sex differences in measures of body fat and body fat distribution in the elderly. *Am J Epidemiol*. v.143, p.898–906, 1996.

GONÇALVES, G. H. M; TRISTÃO, S. M; VOLPI, R. E; ALMEIDA-PEREIRA, G; CARVALHO, B; DONATO, J. JR; DE CASTRO, M; ANTUNES-RODRIGUES, J; ELIAS,

L. L. K. STAT3 but Not ERK2 Is a Crucial Mediator Against Diet-Induced Obesity via VMH Neurons. *Diabetes*, v.70, p.1498–1507, 2021.

GROPP, E.; SHANABROUGH, M.; BOROK, E.; XU, A. W.; JANOSCHEK, R.; BUCH, T., PLUMI, L.; BALTHASAR, N., HAMPEL, B.; WAISMAN, A. et al. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat. Neurosci*, v.8, p.1289-1291, 2005.

HAGEMANN, D.; MEIER, J.J.; GALLWITZ, B.; SCHIMDT, W.E. Appetite regulation by ghrelin a novel neuro-endocrine gastric peptide hormone in the gut-brain-axis. *Z Gastroenterol*, v.41, p.929-36, 2003.

HARNO, E; COTTRELL, EC; WHITE, A. Metabolic pitfalls of CNS Cre-based technology. *Cell Metabolism*. v.18. n.1. p. 21-28. 2013.

HAMMES, S.R.; LEVIN, E.R. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev*, v.28, p.726–41, 2007.

HAQUE, M.S.; MINOKOSHI, Y.; HAMAI, M.; IWAI, M.; HORIUCHI, M.; SHIMAZU, T. Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes*, v.48, p.1706–1712, 1999.

HE, Q.; HORLICK, M.; THORNTON, J.; WANG, J.; PIERSON, R.N.; HESHKA, S. Sex and race differences in fat distribution among Asian, African- American, and Caucasian prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metab*, v.87, p.2164–70, 2002.

HEINE PA, TAYLOR JA, IWAMOTO GA, LUBAHN DB, COOKE PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 23, p.12729-34, 2000.

HETHERINGTON, A.W.; RANSON, S.W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat.Rec*, v. 78, p.149–172, 1940.

HEIMER, L.; NAUTA, W.J. The hypothalamic distribution of the strial terminalis in the rat. *Brain Res*, v.13, p.284–297, 1969.

HILL, J. W.; WILLIAMS, K. W.; YE, C.; LUO, J.; BALTHASAR, N.; COPPARI, R. Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *J. Clin.Invest*, v.118, p.1796–1805, 2008.

IKEDA, Y.; LUO, X.; ABBUD, R.; NILSON, J.H.; PARKER, K.L. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol*, v.9, p.478–486, 1995.

IRANI, B.G.; LE FOLL, C.; DUNN-MEYNELL, A.; LEVIN, B.E. Effects of leptin on rat ventromedial hypothalamic neurons. *Endocrinology*, v.149, p.5146–5154, 2008.

JIMENEZ, M.; LÉGER, B.; CANOLA, K.; LEHR, L.; ARBOIT, P.; SEYDOUX, J. Beta(1)/beta(2)/beta(3)-adrenoceptor knockout mice are obese and cold-sensitive but have normal lipolytic responses to fasting. *FEBS Lett.* v.530, p.37–40, 2002.

KAKOHARA, S.; BURCELIN, R.; HALAAS, J.L.; FRIEDMAN, J. M.; CHARRON, M.J. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, v.389, p.374–377, 1997.

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, p.221–244, 2006.

KIM, K.W.; ZHAO, L.; DONATO, J.; KOHNO, D.; XU, Y.; ELIAS, C.F. X. Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet induced thermogenesis and leptin action in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* v.108, p. 10673–10678, 2011.

KIM, S. H.; DESPRES, J. P.; KOH, K. K. Obesity and cardiovascular disease: friend or foe? *Eur. Heart J*, v. 37, p. 3560-3568, 2015.

KLEINRIDDERS, A.; KONNER, A. C.; BRUNING, J. C. CNS-targets in control of energy and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Pharmacol*, v.9, p.794-804, 2009.

LABBÉ, S.M.; LANFRAY, D.; MONGE-ROFARELLO, B.; BARTNESS, T.J.; RICHARD, D. Hypothalamic control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Syst Neurosci*, v.9, p.150, 2015a.

LABBÉ, S. M.; CARON, A.; BAKAN, I.; LAPLANTE, M.; CARPENTIER, A.C.; LECOMTE, R. In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced browning adipose tissue thermogenesis. *FASEB J.* v.29, p. 2046–2058, 2015b.

LIDELL, M.E.; BETZ, M. J.; ENERBACK, S. Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte* v.3, p.63–66, 2014.

LOWELL, B. B.; BACHMAN, E.S. Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis and obesity. *J. Biol.Chem.* v.278, p.29385–29388, 2003.

LÓPEZ, M.; DIÉGUEZ, C.; NOGUEIRAS, R. Hypothalamic GLP-1: the control of BAT thermogenesis and browning of white fat. *Adipocyte* v. 4, p.141–145, 2015.

MALYALA, A.; ZHANG, C.; BRYANT, D. N.; KELLY, M. J.; RØNNEKLEIV, O. K. PI3K signaling effects in hypothalamic neurons mediated by estrogen. *J Comp Neurol* Feb v. 506, p. 895-911, 2008.

MARANGON, P. B.; SILVA, L. E. C. M.; RORATO, R.; P. ALVES, G.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. K. Oestradiol Modulates the Effects of Leptin on Energy Homeostasis by Corticotrophin-Releasing Factor Type 2 Receptor. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 26, p.796–804, 2014.

MARTINEZ DE MORETIN, P. B.; GARCIA, I.; MARTINS, L.; LAGE, R.; FERNANDEZ-M et al. Estradiol Regulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis via Hypothalamic AMPK. *Cell Metab*, v.1, p.41-53, 2014.

MAJDIC G, YOUNG M, GOMEZ-SANCHEZ E, ANDERSON P, SZCZEPANIAK LS, DOBBINS RL, MCGARRY JD, PARKER KL. Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology*.v.143, p.607-14, 2002.

MAUVAIS-JARVIS, F., CLEGG, D.J., HEVENER, A.L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocrine Reviews*, v. 34, p.309-338, 2013.

MAJDIC, G.; YOUNG, M.; GOMEZ-SANCHEZ, E. Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology*. v.143, p.607–614, 2002.

MICHAELIDES, M. Obesity: Brain Mechanisms in Hypothalamic and Extrahypothalamic Regions. *Neuroscience in the 21st Century*, p.3247-3259, 2016.

MYERS, M. G and OLSON, D. P. Central nervous system control of metabolism. *Nature*, v.491, p.357-363, 2012.

MOBBS, C. V.; MORENO, C. L. & POPLAWSKI, M. Metabolic mystery: aging, obesity, diabetes, and the ventromedial hypothalamus. *Trends Endocrinol. Metab.* v.24, p,488–494, 2013.

MORIARTY, A.; MOORE, K. J.; SMUTKO, J. S.; MAYS, G. G.; WOOL, E. A.; MONROE, C. A.; TEPPER, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, v. 83, n. 7, p. 1263–1271, 1995.

MUSATOV S, CHEN W, PFAFF DW, MOBBS CV, YANG XJ, CLEGG DJ, KAPLITT MG, OGAWA S. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.104, p.2501-6, 2007.

NARAYANASWAMI, V.; DWOSKIN, L. P. Obesity: Current and Potential. Pharmacotherapeutics and Targets. *Pharmacol Ther*, v.170, p.116–147, 2017.

NISWENDER, K.D et al. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature*, v.413, p.794-5, 2001.

OGAWA S, CHAN J, GUSTAFSSON JA, KORACH KS, PFAFF DW. Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor alpha: specificity for the type of activity. *Endocrinology*, v. 144, p.230-9, 2003.

OLFIELD, B.J.; GILES, M.E.; WATSON, A.; ANDERSON, C.; COLVILL, L.M.; MCKINLEY, M. J. The neuro chemical characterization of hypothalamic pathways projecting polysynaptic ally to brown adipose tissue in the rat. *Neuroscience*, v.110, p.515–526, 2002.

PARKER, K.L.; RICE, D.A.; LALA, D.S.; IKEDA, Y.; LUO, X.; WONG, M.; BAKKE, M.; ZHAO, L.; FRIGERI, C.; HANLEY, N.A.; STALLINGS, N.; SCHIMMER, B.P. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog Horm Res*, v.57, p.19–36, 2002.

PARK, C. J. ET AL. ZHAO. Z.; GLIDEWELL-KENNEY, C.; LAZIC, M.; CHAMBON, P.; KRUST, A.; WEISS, J.; CLEGG, D. J.; ANDREA, D. J.; JAMESON, L.; LEVINE, J. E . Genetic rescue of nonclassical ER α signaling normalizes energy balance in obese Eralpha-null mutant mice. *J. Clin Invest*, v. 121, p. 604–612, 2011.

PATTERSON, C. M.; LESHAN, R. L.; JONES, J. C.; MYERS, M. G. Molecular mapping of mouse brain regions innervated by leptin receptor-expressing cells. *Brain Research*, v. 1378, p. 18–28, 2011.

PIETRAS, R.; NEMERE, I.; SZEGO, C. Steroid hormone receptors in target cell membranes. *Endocrine*, v.14, p.417–27, 2001.

PLUM. L et al. Enhanced leptin-stimulated Pi3k activation in the CNS promotes white adipose tissue trans differentiation. *Cell Metab*, v.6, p.431-45, 2007.

QIU J, FANG Y, RØNNEKLEIV OK, KELLY MJ. Leptin excites proopiomelanocortin neurons via activation of TRPC channels. *J Neurosci*,v. 27, p.1560-5, 2010a.

QIU, J.; ZHANG, C.; BORGQUIST, A.; NESTOR, C. C.; SMITH, A.W.; BOSCH, M.A.; KU, S.; WAGNER, E.J.; RONNEKLEIV, O.K.; KELLY, M.J. Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels. *Cell Metab*, v.19, p.682–693, 2014b.

RAMADORI G, FUJIKAWA T, ANDERSON J, BERGLUND ED, FRAZAO R, MICHÁN S, VIANNA CR, SINCLAIR DA, ELIAS CF, COPPARI R. SIRT1 deacetylase in SF1 neurons protects against metabolic imbalance. *Cell Metab*, v. 4, p.301-12, 2011.

REVANKAR, C.M.; CIMINO, D.F.; SKLAR, L.A.; ARTERBURN, J.B. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, v.307, p. 1625-30, 2005.

RICHARD, D.; PICARD, F. Brown fat biology and thermogenesis. *Front. Biosci. Landmark*, v.16, p.1233–1260, 2011.

RUUD, J.; STECULORUM, S.M.; BRUNING, C. Neuronal control of peripheral insulin sensitivity and glucose metabolism. *Nature Communications*, v.8, n. 15259, 2017.

RODRÍGUEZ, E. M.; BLÁZQUEZ, J. L.; GUERRA, M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides*, v.31, p.757-776, 2010.

ROH, E.; KIM, M.S. Brain regulation of energy metabolism. *Endocrinol, Metab (Seoul)* v.31, p.519-524, 2016.

SAITO, M. & SHIMAZU, T. Decreased rate of fatty acid synthesis in brown adipose tissue of hypothalamic obese rats. *FEBS Lett.* v.166, p.151–154, 1984.

SAITO, K.; HE, Y.; YANG, Y.; Zhu, L.; WANG, C.; XU, P.; HINTON, A. O. Y.; ZHAO, J.; FUKUDA, M.; TONG, Q.; CLEGGI, D.; XU, Y. PI3K in the ventromedial hypothalamic nucleus mediates estrogenic actions on energy expenditure in female mice. *Scientific Reports*, v. 6, p.23459. 2016.

SAHU, M.; ANAMTHATHMAKULA, P, AND SAHU, A. Hypothalamic phosphodiesterase-3B pathway mediates anorectic and body weight reducing effects of insulin in male mice. *Neuroendocrinology*, v.104, p.145–156, 2017.

SÁNCHEZ-ALEGRÍA, S.; FLORES-LEÓN, M.; AVILA-MUÑOZ, E.; RODRÍGUEZ-CORONA, N.; ARIAS, C. PI3K Signaling in Neurons: A Central Node for the Control of Multiple Functions. *Int J Mol Sci*, v. 19(12), p. 3725, 2018.

SEYDOUX, J., ROHNER-JEANRENAUD, F., ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F., JEANRENAUD, B. & GIRARDIER, L. Functional disconnection of brown adipose tissue in hypothalamic obesity in rats. *Pflug. Arch.* v.390, p.1–4 ,1981.

SHINODA, K.; LEI, H.; YOSHII, H.; NOMURA, M.; NAGANO, M.; SHIBA, H.; SASAKI, H., OSAWA, Y.; NINOMIYA, Y.; NIWA, O. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev Dyn*, v.204, p.22–29, 1995.

SHIMAZU T, SUDO M, MINOKOSHI Y, TAKAHASHI A. Role of the hypothalamus in insulin- independent glucose uptake in peripheral tissues. *Brain Res Bull*. v.27p. 501-4, 1991.

SHIMIZU, I.; SUDA, M.; HAVASHI, Y.; SHUAQ, J.; IKEGAMI, R.; KATSUMI, G.; KAVAMORI, H.; WALSH, K.; MINAMINO, T. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J. Clin. Invest.* v.124, p. 2099–2112, 2014.

Shimazu, T and Minokoshi, Y. Systemic Glucoregulation by Glucose-Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH). *J Endocr Soc.*1, v.1, p.449–459, 2017.

SILVA L.E.; CASTRO, M.; AMARAL, F.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L.L. Estradiol induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. *Braz J Med Biol Res*. v.43, p.759-66, 2010.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature*, v. 404, n. 6778, p. 661–671, 2000.

SCOTT, V.; KIMURA, N.; STARK, J.A.; LUCKMAN, S.M. Intravenous Peptide YY₃₋₃₆ and Y₂ Receptor Antagonism in the Rat: Effects on Feeding Behaviour. *J Neuroendocrinol*, v.17, p.452-7, 2005.

SKULACHEV, V.P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*, v.294, n.3, p.158-162, 1991.

SKULACHEV, V.P. Uncoupling new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*, v.1363, n.2, p.100-124, 1998.

STERNSON, S. M.; SHEPHERD, G. M. G.; FRIEDMAN, J. M. Topographic mapping of VMH → arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nature Neuroscience*, v. 8, n. 10, p. 1356–1363, 2005.

STE MARIE, L.; MIURA, G.I.; MARSH, D.J.; YAGALOFF, K.; PALMITER, R.D. A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.97, p.12339-12344, 2000.

SUDO M, MINOKOSHI Y, SHIMAZU T. Ventromedial hypothalamic stimulation enhances peripheral glucose uptake in anesthetized rats. *Am J Physiol*. v. 261, p.298-303, 1991.

TARTAGLIA, L. A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G. J.; CAMPFIELD, L. A.; CLARK, F. T.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MICEVYCH, P.E.; KELLY, M.J. Membrane Estrogen Receptor Regulation of Hypothalamic Function *Neuroendocrinology*, v.96, p.103–110, 2012.

TAYLOR, R.W.; GRANT, A.M.; WILLIAMS, S.M; GOULDING, A. Sex differences in regional body fat distribution from pre- to post puberty. *Obesity (Silver Spring)*, v.18, p.1410–6, 2010.

TODA, C.; SHIUCHI, T.; LEE, S.; YAMATO- ESAKI, M.; FUJINO, Y.; SUZUKI, A. Distinct effects of leptin and a melanocortin receptor agonist injected into medial hypothalamic nuclei on glucose uptake in peripheral tissues. *Diabetes*, v.58, p. 2757–2765, 2009.

TORRES, M. J et al. 17 β -Estradiol Directly Lowers Mitochondrial Membrane Microviscosity and Improves Bioenergetic Function in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* v.27, p.167-179, 2018.

TUNG, Y.-C. L.; MA, M.; PIPER, S.; COLL, A.; O’RAHILLY, S.; YEO, G. S. H. Novel Leptin-Regulated Genes Revealed by Transcriptional Profiling of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 47, p. 12419–12426, 2008.

WADA, N.; HIRAKO, S.; TAKENOYA, F.; KAGEYAMA, H.; OKABE, M.; SHIODA, S. Leptin and its receptors. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 61, p. 191–199, 2014.

WATERSON, M. J.; HORVATH, T. L. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab*, v. 22, p.962-970, 2015.

WADE, G.N.; GRAY, J.M. Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behav.* v. 22, p.583-93, 1979.

VAN VEEN et al., 2020. Hypothalamic estrogen receptor alpha establishes a sexually dimorphic regulatory node of energy expenditure. *Nat Metb*, v.2, p.351-363, 2020

VOSS-ANDREAE, A.; MURPH, J.G.; ELLACOTT, K.L.; STUART, R.C.; NILLNI, E.A.; CONE, R. D.; FAN, W. Role of the central melanocortin circuitry in adaptive thermogenesis of brown adipose tissue. *Endocrinology*, v.148, p.1550-1560, 2007.

WEARING, S.C.; HENNING, E.M.; BYRNE, N.M.; STEELE, J.R.; HILLS, A.P. Musculoskeletal disorders associated with obesity: a biomechanical perspective. *Obes Ver*, n.7, v.3, p.239-50, 2006.

XU, Y.; NEDUNGADI, T. P.; ZHU, L.; SOBHANI, N.; IRANI, B. G.; DAVIS, K. E.; ZHANG, X.; ZOU, F.; GENT, L. M.; HAHNER, L. D.; KHAN, S. A.; ELIAS, C. F.; ELMQUIST, J. K.; CLEGGI, D. J. Distinct Hypothalamic Neurons Mediate Estrogenic Effects on Energy Homeostasis and Reproduction. *Cell Metab*, v.14, p.453-65, 2011.

Xu Y, Hill JW, Fukuda M, Gautron L, Sohn JW, Kim KW, Lee CE, Choi MJ, Lauzon DA, Dhillon H, Lowell BB, Zigman JM, Zhao JJ, Elmquist JK. PI3K signaling in the ventromedial hypothalamic nucleus is required for normal energy homeostasis. *Cell Metab*, v.7;12, p.88-95, 2010.

XU, Y.; LÓPEZ, M. Central regulation of energy metabolism by estrogens. *Mol Metab*, 15, p.104-115, 2018.

YOKOSUKA M, OKAMURA H, HAYASHI S. Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon, and the amygdala in the rat. *J Comp Neurol*. v.389, p.81-93, 1997.

YE, H; FENG, B.; WANG, C.; SAITO, K.; YANG, Y.; IBRAHIMI, L.; SCHAUL, S.; PATEL, N.; SAENZ, L.; LUO, P.; LAI, P.; TORRES, V.; KOTA, M.; DIXIT, D.; CAI, X.; QU, N.; HYSEN, I.; YU, K.; JIANG, Y.; TONG, Q.; SUN, Z, ARENKIEL, B. R.; HE, Y.; XU, P.; 1,4 XU, Y. An estrogen-sensitive hypothalamus-midbrain neural circuit controls thermogenesis and physical activity. *Sci Adv*. v.21, 2022.

ZHAO, L.; KIM, K.M.; IKEDA, Y.; ANDERSON, K.K.; BECK, L.; CHASE, S.; TOBET, S.A.; PARKER, K.L. Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1 results in increased anxiety-like behavior. *Mol Endocrinol*, v.22, p.1403–1415. 2008.

ZHAO, L. et al. Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotropin function. *Development*, v. 128, p.147–154, 2001.

ZHANG, C.; BOCH, M.A.; RONNEKLEIV, O.K.; KELLY, M.J. Kisspeptin activation of TRPC4 channels in female GnRH neurons requires PIP₂ depletion and cSrc kinase activation. *Endocrinology*, v.154, p.2772–2783, 2013

ANEXOS

Anexo A- Artigos publicados



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/brainres

Research report

Chronic molecular hydrogen inhalation mitigates short and long-term memory loss in polymicrobial sepsis



Aline A. Jesus^a, Patrícia Passaglia^a, Bruna M. Santos^a, Isabelle Rodrigues-Santos^a, Rafael A. Flores^a, Marcelo E. Batalhão^b, Angelita M. Stabile^b, Evelin C. Cárnio^{a,b,*}

^a Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

^b Department of General and Specialized Nursing, School of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900 Brazil

HIGHLIGHTS

- We tested the memory benefits of chronic H₂ treatment in CLP-induced sepsis;
- Chronic H₂ treatment attenuated impaired short and long-term recognition memory in septic rats;
- Chronic H₂ treatment attenuated impaired learning ability in septic rats;
- H₂ attenuated impaired long-term associative memory in septic rats;
- Acute treatment with H₂ attenuated oxidative stress and neuroinflammation.

ARTICLE INFO

Keywords:

CLP
Memory damage
Cognition
Learning ability
Oxidative stress

ABSTRACT

The central nervous system (CNS) is one of the first physiological systems to be affected in sepsis. During the exacerbated systemic inflammatory response at the early stage of sepsis, circulatory inflammatory mediators are able to reach the CNS leading to neuroinflammation and, consequently, long-term impairment in learning and memory formation is observed. The acute treatment with molecular hydrogen (H₂) exerts important anti-oxidative, antiapoptotic, and anti-inflammatory effects in sepsis, but little is known about the mechanism itself and the efficacy of chronic H₂ inhalation in sepsis treatment. Thus, we tested two hypotheses. We first hypothesized that chronic H₂ inhalation is also an effective therapy to treat memory impairment induced by sepsis. The second hypothesis is that H₂ treatment decreases sepsis-induced neuroinflammation in the hippocampus and prefrontal cortex, important areas related to short and long-term memory processing. Our results indicate that (1) chronic exposure of hydrogen gas is a simple, safe and promising therapeutic strategy to prevent memory loss in patients with sepsis and (2) acute H₂ inhalation decreases neuroinflammation in memory-related areas and increases total nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), a transcription factor that regulates a vast group of antioxidant and inflammatory agents expression in these areas of septic animals.



Autonomic Disbalance During Systemic Inflammation is Associated with Oxidative Stress Changes in Sepsis Survivor Rats

Mateus R. Amorim^{1,2,6}, Aline A. de Jesus³, Nilton N. Santos-Junior³, Maria J. A. Rocha¹, Jonatas E. Nogueira⁴, Marcelo E. Batalhão⁵, Evelin C. Cárnio⁵ and Luiz G. S. Branco^{1,6} 

Received 26 July 2021; accepted 17 December 2021

Received 26 July 2021; accepted 17 December 2021

Abstract— Sepsis affects 31.5 million people worldwide. It is characterized by an intense drop in blood pressure driving to cardiovascular morbidity and mortality. Modern supportive care has increased survival in patients; however, after experiencing sepsis, several complications are observed, which may be potentiated by new inflammatory events. Nevertheless, the interplay between sepsis survivors and a new immune challenge in cardiovascular regulation has not been previously defined. We hypothesized that cecal ligation and puncture (CLP) cause persistent cardiovascular dysfunctions in rats as well as changes in autonomic-induced cardiovascular responses to lipopolysaccharide (LPS). Male Wistar rats had mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) recorded before and after LPS or saline administration to control or CLP survivor rats. CLP survivor rats had similar baseline MAP and HR when compared to control. LPS caused a drop in MAP accompanied by tachycardia in control, while CLP survivor rats had a noteworthy enhanced MAP and a blunted tachycardia. LPS-induced hemodynamic changes were related to an autonomic disbalance to the heart and resistance vessels that were expressed as an increased low- and high-frequency power of pulse interval in CLP survivors after saline and enhancement in the low-frequency power of systolic arterial pressure in control rats after LPS. LPS-induced plasma interferon γ , but not interleukin-10 surges, was blunted in CLP survivor rats. To further access whether or not LPS-induced autonomic disbalance in CLP survivor rats was associated with oxidative stress dysregulation, superoxide dismutase (SOD) activity and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) plasma levels changes were measured. LPS-induced oxidative stress was higher in CLP survivor rats. These findings indicate that key changes in hemodynamic regulation of CLP survivors rats take place in response to LPS that are associated with oxidative stress changes, i.e., reduced SOD activity and increased TBARS levels.



α -1 Adrenoceptor Activation in the Dorsal Raphe Nucleus Decreases Food Intake in Fasted Rats

Rafael Appel Flores^{1,2*}, Raoni Conceição Dos-Santos¹, Renata Steinbach², Isabelle Rodrigues-Santos¹, Aline Alves de Jesus¹, José Antunes-Rodrigues¹ and Marta Aparecida Paschoalini²

¹ Department of Physiology, Ribeirão Preto School of Medicine, São Paulo University, Ribeirão Preto, Brazil, ² Department of Physiological Sciences, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Kathleen S. Curtis,
Oklahoma State University Center
for Health Sciences, United States

Reviewed by:

Débora Simões A. Colombari,
São Paulo State University, Brazil
Zhi Yi Ong,
University of New South Wales,
Australia

*Correspondence:

Rafael Appel Flores
rafaelappelflores@gmail.com

Specialty section:

The dorsal raphe (DR) nucleus is involved in a myriad of physiological functions, such as the control of sleep-wake cycle, motivation, pain, energy balance, and food intake. We have previously demonstrated that in *ad libitum* fed rats the intra-DR administration of phenylephrine, an α -1 receptor agonist, does not affect food intake, whereas clonidine, an α -2 receptor agonist, potently stimulates food intake. These results indicated that in fed rats an increased adrenergic tonus blocked food intake, since the activation of α -2 auto-receptors, which decreases pre-synaptic release of adrenaline/noradrenaline, affected food intake. Thus, in this study we assessed whether the response to adrenergic stimuli would differ after overnight fasting, a situation of low adrenergic activity in the DR. Intra-DR administration of adrenaline and noradrenaline blocked food intake evoked by overnight fasting. Similarly, phenylephrine administration decreased hunger-induced food intake. These changes in food intake were accompanied by changes in other behaviors, such as increased immobility time and feeding duration. On the other hand, intra-DR administration of clonidine did not affect food-intake or associated behaviors. These results further support the hypothesis that in fed animals, increased adrenergic tonus in DR neurons inhibiting feeding, while in fasted rats the adrenergic tonus decreases and favors food intake. These data indicate a possible mechanism through which adrenergic input to the DRN contributes to neurobiology of feeding.

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.05.26.493640>; this version posted May 29, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Peripheral ghrelin administration prevents the behavioral effects of restraint stress in mice: possible implication of PVN^{CRH} neurons.

Raoni Conceição Dos-Santos¹, Rafael Appel Flores¹, Aline Alves de Jesus¹, Rodrigo Rorato², André Souza Mecawi², José Antunes-Rodrigues^{1*}, Lucila Leico Kagohara Elias^{1*}

1. Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

2. Department of Biophysics, Paulista School of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

* Both contributed as senior authors of the study

Corresponding author: Raoni Conceição Dos-Santos, raoniufrj@gmail.com. Prédio Central da Medicina, Av. Bandeirantes, 3900 - Campus da USP, Ribeirão Preto - SP, ZIP-code: 14049-900.

Abstract.

Abstract.

Ghrelin is a gut-derived hormone that is secreted during conditions of negative caloric balance and acts as a key modulator of feeding, increasing food intake and affecting several physiological systems such as metabolism, behavior and the control of endocrine and autonomic functions. Previous studies showed that ghrelin participates in the stress response, acting on hypothalamic paraventricular nucleus neurons that express corticotropin-releasing hormone (PVN^{CRH} neurons). In the present study, we investigated the effects of ghrelin administration on the behavioral responses to restraint stress in mice. In their homecage, C57Bl6 mice in basal conditions expressed the behaviors of surveying, walking, rearing, grooming and, to a lesser extent, digging, climbing and freezing. Restraint stress increased the time spent in grooming without significant changes in other behaviors. Ghrelin administration did not affect behavior in control mice, but it reversed the effect of restraint stress on grooming. Chemogenetic activation of PVN^{CRH} neurons by clozapine N-Oxide (CNO) administration in hM3Dq DREADD mice increased grooming, while ghrelin mitigated this effect. In addition, CNO administration decreased walking and rearing, both in the presence or absence of ghrelin. Food intake was increased by ghrelin administration, however, it was not affected by stress or CNO. These results indicate that ghrelin decreases the activity of PVN^{CRH} neurons, partially preventing the behavioral effects of restraint stress. The inhibitory input to PVN^{CRH} neurons probably arrives from other nuclei, since GABAergic neurons were not identified in the PVN neurons of these mice.

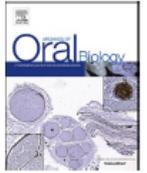
Key-words. Corticotropin-releasing hormone, hypothalamic paraventricular nucleus,



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/archoralbio



Orofacial anti-hypernociceptive effect of citral in acute and persistent inflammatory models in rats

Bruna M. Santos^{a,b,1}, Wanderson S. Santos^{a,1}, Isabelly G. Solon^a, Felipe S. Garcia^a,
Maycon T. Emilio-Silva^c, Aline A. Jesus^b, Clélia A. Hiruma-Lima^c, Glauce C. Nascimento^a,
Evelin C. Cárnio^b, Luiz G.S. Branco^{a,*}

^a Department of Basic and Oral Biology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida Do Café s/n, São Paulo, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of General and Specialised Nursing Ribeirão Preto, College of Nursing - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Department of Structural and Functional Biology (Physiology), Biosciences Institute, UNESP-São Paulo State University, CEP 13618-689 Botucatu, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Orofacial pain
Temporomandibular disorders
Inflammation
Trigeminal system
Formalin
Complete Freund's Adjuvant

ABSTRACT

Orofacial pain has significant psychological and physiological effects. Citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal) is the main component of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, an herb with analgesic properties. Although citral has been considered a potent analgesic, its putative effects on orofacial pain are still unknown.

Objective: The objective of this study is to test the hypothesis that citral modulates orofacial pain using two experimental models: formalin-induced hyperalgesia in the vibrissae area and during persistent temporomandibular hypernociception using Complete Freund's Adjuvant - CFA test.

Methods: For the formalin test, citral (100 and 300 mg/kg, oral gavage) or its vehicle (Tween 80, 1%) were given 1 h before the formalin injection subcutaneously (sc) into the vibrissae area. For the CFA model, we analyzed the prophylactic (100 mg/kg of citral by oral gavage, 1 h before CFA injection) and the chronic therapeutic (citral treatment 1-hour post-CFA injection and daily post-CFA injection) effect of citral or its vehicle in animals treated with CFA for 8 days.

Results: Citral caused a decrease in formalin-induced local inflammation and the time spent performing nociceptive behavior in a dose-dependent fashion. Similarly, prophylactic and therapeutic citral treatment decreased the CFA-induced persistent mechanical hypernociception in the temporomandibular area.

Conclusion: Our data strengthen the notion that citral plays a powerful antinociceptive role by decreasing orofacial hypernociception in formalin and CFA models.



Contents lists available at ScienceDirect

Peptides

journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Angiotensin-(1–7) improves tail skin heat loss and increases the survival of rats with polymicrobial sepsis

Patrícia Passaglia ^{a,*}, Hadder Batista Silva ^c, Aline Alves de Jesus ^b,
 Marco Antonio Maranhão Filho ^c, Isis Paiva Trajano ^b, Marcelo Eduardo Batalhão ^c,
 Luiz Carlos Carvalho Navegantes ^b, Luiz Guilherme Siqueira Branco ^{a,b},
 Evelin Capellari Cárnio ^{b,c}

^a Department of Oral and Basic Biology Ribeirão Preto, School of Dentistry of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Department of General Nursing, School of Nursing of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Angiotensin-(1–7)
 CLP
 Thermoregulation
 Fever
 Systemic inflammation
 Survival

ABSTRACT

Sepsis is a serious syndrome, characterized by the excessive release of inflammatory mediators and thermoregulatory changes, being fever the most common sign. However, despite the importance of Angiotensin (Ang)-(1–7) in controlling the inflammation, the role of the peptide in the febrile response and mortality in animals submitted to experimental model of sepsis is still not clear. In this way, we evaluate the effect of continuous infusion of Ang-(1–7) in inflammatory response, thermoregulation and in mortality of Wistar male rats submitted to colonic ligation puncture (CLP). Before CLP surgery, the infusion pumps (Ang-(1–7), 1.5 mg/mL or saline) were inserted into the abdominal cavity and maintained for 24 h. CLP rats showed a febrile response starting from 3 h after and persisted until the 24th hour of experiment. Continuous treatment with Ang-(1–7) attenuated the febrile response and reestablished the euthermia 11 h after CLP, until the end of experiment, which coincided with an increased heat loss index (HLI). This effect was associated with a decrease in production of pro-inflammatory mediators in liver, white adipose tissue (WAT) and hypothalamus. Moreover, an increase in norepinephrine (NE) content in intercapular brown adipose tissue (iBAT) was observed in CLP animals, which was attenuated with treatment with Ang-(1–7), and decreased mortality in CLP animals treated with Ang-(1–7). Taken together, the present study demonstrates that continuous infusion treatment with Ang-(1–7) can promote a global anti-inflammatory effect, reestablishing the tail skin heat loss as a key thermo-effector function, resulting in an increased survival of animals submitted to experimental sepsis.



Contents lists available at ScienceDirect

Brain, Behavior, & Immunity - Health

journal homepage: www.editorialmanager.com/bbih/default.aspx

Inhaled molecular hydrogen reduces hippocampal neuroinflammation, glial reactivity and ameliorates memory impairment during systemic inflammation

Júnia Lara de Deus^a, Mateus Ramos Amorim^{a,b}, Rui Milton Patricio da Silva Junior^c, Aline Alves Jesus^d, Procópio Cleber Gama de Barcellos Filho^d, Evelin Capellari Cárnio^e, Alexandra Olimpio Siqueira Cunha^d, Ricardo Maurício Leão^d, Luiz G.S. Branco^{a,*}

^a Department of Basic and Oral Biology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA

^c Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil

^e Department of General and Specialized Nursing, School of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cognition
Memory damage
Systemic inflammation

ABSTRACT

Sepsis is associated with numerous physiological and biochemical abnormalities that result in a life-threatening condition. The involvement of the Central Nervous System (CNS) during sepsis has received considerable attention, especially the hippocampus which plays a key role in the learning and memory processes. The increased interest in this limbic region during systemic inflammation (SI) is related to the number of sepsis survivor patients who have cognitive impairments. A single injection of lipopolysaccharide (LPS)-induced systemic inflammation is the most commonly used murine endotoxemia model because it replicates several pathophysiological changes observed in severe sepsis. Molecular hydrogen (H₂) has been used as an anti-inflammatory therapeutic strategy to prevent neuroinflammation. However, the mechanisms by which inhaled H₂ mitigate memory loss during SI remains unknown. To understand how H₂ acts in the hippocampus, the current study focused on specific mechanisms that may be involved in reducing neuroinflammation in rats during SI. We hypothesized that inhaled H₂ decreases LPS-induced hippocampal pro-inflammatory cytokines surges and this effect is associated with reduced memory loss. Using different and integrative approaches, *i.e.*, from hippocampal cells electrophysiology to animal behavior, we report that inhaled H₂ decreased LPS-induced peripheral and hippocampal inflammation, decreased microglial and astrocytic activation, lessen memory loss without affecting long-term potentiation (LTP). To our knowledge, this is the first evidence showing that inhaled H₂ reduces hippocampal microglial and glial cells inflammation, which may be associated with a reduced memory impairment induced by SI.

Anexo B- Manuscritos

ANEXO B - ARTIGO CIENTÍFICO

PI3K in the ventromedial hypothalamus attenuates diet-induced obesity and participates in estradiol actions on energy expenditure in female mice.

Aline Alves de Jesus¹, Raoni Conceição Dos-Santos², Isabelle Rodrigues-Santos¹, Hellen Veida-Silva³, Milene Mantovani Mata¹, Rafaella Eduarda Volpi¹, Gabriel Henrique Marques Gonçalves³, Luiz Carlos Navegantes¹, Carol Fuzeti Elias⁴, José Antunes-Rodrigues¹, Lucila Leico Kagohara Elias¹.

¹Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

²Department of Cell and Molecular Biology, Tulane University, New Orleans, LA, USA

³Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁴Department of Molecular & Integrative Physiology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA.

ABSTRACT

Obesity is associated with the development of several illnesses such as diabetes mellitus, cancer, and cardiovascular diseases. Understanding the mechanisms of body weight control is important for the development of effective therapeutic strategies against obesity. In response to the action of hormones such as leptin and 17β -estradiol (E2) the ventromedial hypothalamus (VMH) plays an essential role in the protection against diet-induced obesity (DIO), through the regulation of food intake and energy expenditure. However, little is known about the intracellular mechanisms involved in these effects. To assess the role of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling in neurons that express the steroidogenic factor 1 (SF1) in the VMH on energy homeostasis, we used cre-lox technology to generate male and female mice with specific disruption of catalytic subunit P110 α in SF1 neurons of the VMH. We demonstrated that the conditional knockout of P110 α in SF1 neurons of the VMH affects body weight, energy expenditure and thermogenesis in animals fed with high fat diet. In addition, we demonstrated that female mice with genetic inhibition of PI3K activity in VMH neurons, showed a sexual dimorphic obese phenotype, showing greater weight gain when compared to male counterpart mice. Further, inhibition of PI3K activity in the VMH partially blocked the effects of E2 on body weight regulation, stimulation of energy expenditure and thermogenesis in female ovariectomized mice. Collectively, our results indicate that PI3K activity in VMH neurons plays a relevant role to protect against DIO and contributes to the actions of estradiol in energy expenditure in females.

INTRODUCTION

Obesity is characterized as an increase in body weight, especially due to the accumulation of fat mass in adipocytes. Obesity is often caused by a long-term positive energy balance, which occurs due to excess food intake and decreased energy expenditure and is an important risk factor for the development of comorbidities, such as cardiovascular diseases (Kim et al., 2015), type 2 diabetes mellitus, cancer (Calle et al., 2003), and musculoskeletal disorders (Wearing et al., 2006). The regulation of body weight occurs through physiological adjustments that require the integration of various peripheral and central signals. The hypothalamus is the major regulator of energy homeostasis by promoting the control of food intake and energy expenditure (Myers and Olson, 2012). The ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) plays an important role in the control of body weight by inducing increased energy expenditure and regulating food intake (Dhillon et al., 2006; Bingham et al., 2008). Steroidogenic factor 1 (SF1) is an essential factor for the development of VMH, as demonstrated by its deletion in the hypothalamus (Ikeda et al., 1995) and also for the function of this region in the regulation of energy expenditure and body weight (Kim, 2011; Majdic et al., 2002).

The VMH receives different hormonal inputs involved in the regulation of energy homeostasis. Leptin and 17β -estradiol (E2) activate VMH neurons. Selective deletion of leptin receptor (LepR) and estrogen receptor- α (ER α) in SF1 neurons aggravates diet-induced obesity (DIO) (Bingham et al., 2008; Dhillon et al., 2006; Xu et al., 2010). However, little is known about the intracellular mechanisms by which VMH neurons regulate energy homeostasis.

Xu and collaborators previously demonstrated that male mice with specific disruption of the catalytic subunit P110 α of the enzyme phosphoinositide 3-kinase (PI3K)

in the VMH develop obesity and metabolic disturbances when fed with high fat diet (HFD) (Xu et al., 2010). A similar phenotype was also observed in animals with deletion of $P110\beta$ in VMH neurons (Fujikawa et al., 2019). These findings indicate that the PI3K intracellular signaling pathway in the VMH is required for the regulation of body weight under conditions of excessive energy intake, as occurs with exposure to HFD. However, despite the sex differences in the control of the body, the specific role of PI3K subunits in VMH to explain this gender difference is not well established.

Produced by the ovaries, the E2 in the central nervous system (CNS) plays an essential role in maintaining energy balance and body weight control, exerting protective effects against weight gain in both animals and humans (Mauvais-Jarvis et al., 2013; Maragon et al., 2014). $ER\alpha$ expressed in pro-opiomelanocortin neurons in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) regulates food intake (Xu et al., 2011; Pelletier et al., 2007), while neurons of the ventrolateral subdivision of ventromedial hypothalamic nucleus (vVMH) modulate two components of energy expenditure, spontaneous physical activity and thermogenesis in females (Xu et al., 2011; Musatov et al., 2007). However, the molecular mechanisms by which VMH neurons regulate energy homeostasis through estradiol/ $ER\alpha$ signaling remain to be fully elucidated. To fulfill this gap, we investigated the role of PI3K in SF1 neurons of the VMH on body weight control in male and female mice fed HFD and the participation of PI3K in the effects of E2 on energy homeostasis.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animal Care

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Ribeirao Preto Medical School (CEUA-FMRP number 076/2019). Mice were single housed at 22°C–24°C using a 12 h light/12 h dark cycle. The animals were fed a standard chow diet with ad libitum access to water and chow or HFD (Research

Diets, 5.24 kcal/g, 60% kcal from fat; New Brunswick, NJ). To generate animals with specific knockout of P110 α subunit in the VMH (SF1-cre;P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$) male mice, that were homozygous for the floxed P110 α allele and heterozygous for the Sf-1-Cre transgene were crossed with female mice homozygous for the floxed p110 α allele. Littermate homozygous mice for the floxed P110 α allele (P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$) served as controls (Ctr). For body weight and food intake recordings, animals were individually caged and fed with regular diet (RD) or HFD, with body weight and food intake being weekly registered.

Metabolic Cage Studies

Mice were individually housed at room temperature (22°C–24°C) under an alternating 12 h light/12 h dark cycle. After adaptation of 2 days, oxygen consumption (VO₂), carbon dioxide production (VCO₂) and locomotor activity (XTOT) were measured for 24h using the Comprehensive Laboratory Monitoring System (CLAMS, Columbus Instruments, OH). For standard regular diet experiments, we used body weight matched animals at 17 weeks of age. For HFD experiments, we submitted body weight matched animals at 17 weeks of age to HFD for one week and assessed the energy expenditure as described above. The energy expenditure was obtained based on the following formula: $EE = [VO_2 \times (3.815 + 1.232 \times RER)]$ (Garcia-Galiano et al., 2017).

Ovariectomy and 17 β -estradiol treatment.

After three consecutive estrous cycles, sixteen-week old female SF1-cre;P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ and P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ mice were anesthetized with inhaled isoflurane and subjected to bilateral ovariectomy. Half of these mice received subcutaneous implantations of pellets releasing 17 β -estradiol (0,18mg for 60 days OVX+E, Innovative Research of America) following ovariectomy. Body weight and food intake were daily monitored. A subset of these mice (n= 6 per treatment and genotype) was habituated to

the CLAMS chambers after the OVX surgery. After habituation for 2 days, VO₂ consumption, VCO₂ production, energy expenditure and locomotor activity were measured for one day, as described above.

Assessment of tail and brown adipose tissue (BAT) temperature

Tail and BAT temperature of free moving mice were assessed through infrared images using a thermogenic camera (FLIR E6; FLIR Systems Inc, Wilsonville, OR, USA). Images were analyzed using FLIR Tools software. All images were obtained at a distance of 1m between the researcher and the animals.

Blood sample collection

The animals were previously subjected to isoflurane inhalation. Subsequently, they were decapitated for blood collection. ELISA kits were used to measure plasma leptin (R&D Systems, Minneapolis, MN), and in-house radioimmunoassay was used for testosterone and corticosterone measurement as previously described by Borges et al., 2007. Plasma and tissue noradrenaline concentrations were performed using high-performance liquid chromatography (HPLC) as previously described by Garofalo et al (1996).

Real-time PCR

BAT samples were frozen under RNase-free conditions. The real-time PCR technique was performed using the Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System. The reactions were performed in volumes of 12µL, with 4µL of cDNA, using TaqMan 2x Master Mix reagent (Applied Biosystems), in probes and primers of the specific genes, *Ucp1* (Mm01244861_m1), *Ppargc1a* (Mm01208835_m1), *Ppara* (Mm00440939_m1) and *Cidea* (Mm00432554_m1).

Immunofluorescence

The animals were anesthetized and subjected to stereotaxic surgery for implantation of a cannula in the lateral ventricle (Anteroposterior: – 0.5 mm; lateral: – 1.0 mm; vertical: – 2.5 mm), following the coordinates of the atlas of Paxinos and Franklin (2008). After seven days of recovery, the animals were fasted for 12 h and subsequently received ICV injection of insulin (4.4 mU/2 μ l) (Sahu et al., 2017). Thirty minutes after the central injection of insulin, the animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg of body weight) and xylazine (10 mg/kg of body weight) and subjected to cardiac perfusion for the brain collection. Twenty-five micrometer coronal brain sections were used for the p-AKT labeling. Sections were blocked in 0.01 M PBS containing 10% normal horse serum, 0.1% Triton X-100 and 0.04% NaN₃ for 2 h at room temperature. Briefly, sections were incubated with the anti-phospho-AKT primary antibody [1:1000] (rabbit anti-pAKT, Cell Signaling # 2965) for 24 h at 4°C. After rinsing, the sections were incubated with a biotinylated donkey anti-rabbit secondary antibody (Alexa Fluor 594 [1:500] 1:200; ab150076) for 1h at room temperature. Images were obtained in the Leica TCS SP5 confocal microscope system equipped with 488-nm (argon-krypton) laser. For each group, all images were obtained at identical acquisition settings.

Statistical Analyses

The data obtained were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and analyzed using the Graphpad Prism Software version 8.02. For two-group comparisons, the two-tailed Student t test was used. The analyzes were also performed by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Sidak post-test. The significant level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Generation of mice lacking catalytic subunit P110 α of PI3K in VMH neurons

To generate animals with deletion of catalytic subunit P110 α of PI3K specifically in SF1 neurons, we sequentially crossed SF1-cre mice with P110 α^{floX} animals, generating the SF1-cre;P110 $\alpha^{\text{floX/floX}}$ mice. For control animals, we used P110 $\alpha^{\text{floX/floX}}$ littermate mice. The deletion of P110 α in SF1 neurons of the VMH was confirmed by immunohistochemistry for phosphorylated AKT (pAKT), considered the pathway recruited and activated through the action of PI3K. We found that central insulin stimulation in the P110 $\alpha^{\text{floX/floX}}$ animal promoted AKT phosphorylation in the VMH and adjacent regions, such as ARC. On the other hand, in SF1-cre; P110 $\alpha^{\text{floX/floX}}$ mice, there was a reduction in AKT phosphorylation in VMH (**Figure 1A**).

SF1 is also expressed in other regions such as the pituitary, adrenal gland and gonads, which are important for the regulation of metabolism (Zhao et al., 2001). Thus, we analyzed the effect of the P110 α deletion on the weight of the adrenal, testis, seminal vesicle, ovary and uterus. The deletion of P110 α in SF-1 neurons promoted a reduction in testis weight (**Figure 1B**, $p < 0.001$) However, no change in seminal vesicle weight was observed (**Figure 1C**), but we found similar values of plasma testosterone between SF1-cre; P110 $\alpha^{\text{floX/floX}}$ and P110 $\alpha^{\text{floX/floX}}$ mice at 20 weeks of age (**Figure 1D**), indicating that the gonadal activity was preserved. There were no differences in uterine and ovarian weight between the experimental groups (**Figure 1G-H**). In male (**Figure 1E-F**) and female (**Figure 1I-J**) mice, no difference was observed in adrenal weight and plasma corticosterone concentrations.

Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH impairs energy homeostasis in animals submitted to HFD in a sex-specific pattern.

Reduction of PI3K activity in SF1 neurons did not affect body weight and food intake in male mice (**Supplemental Figure S1A-B**) under regular chow diet. There was also no difference between genotypes in body weight in female mice (**Supplemental**

Figure S1D-E). In contrast, chow-fed female SF1-p110 α -KO mice showed modest but significant increases in food intake compared to controls (**Supplemental Figure S1F**; $p < 0.05$). In both male and female SF1-cre; P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ mice under regular chow diet showed similar liver, white adipose tissue, BAT weight and plasma leptin levels compared to respective P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ group (**Supplemental Figure S2A-D**).

SF1-cre; P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ male and female mice submitted to HFD presented a marked increase in body weight, compared to P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ control animals (**Figures 2A-B**; and **Figures 2D-E**; $p < 0.05$). However, no difference was observed in food intake (**Figures 2C and 2F**). Interestingly, in females, compared to male mice, the impact of reduction of PI3K activity in SF1 was more pronounced in body weight (30% x 14% at 18 weeks of age), respective female and male controls submitted to HFD. In addition, in contrast to males (**Supplemental Figure S2E-F**), females with reduced PI3K activity in the VMH showed an increase in liver, retroperitoneal white adipose tissue weight (**Supplemental Figure S2G**; $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively) and plasma leptin concentrations (**Supplemental Figure S2H**; $p < 0.001$).

Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH reduces energy expenditure and thermogenesis in males and females mice fed with HFD.

SF1-cre; P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ male mice showed decreased indirect calorimetry in the light and dark cycle (**Figure 3A-D**, $p < 0.05$), after one week of HFD compared to P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ mice with paired body weight, but with intact locomotor activity (**Figure 3E**). In SF1-cre; P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ females, we observed reduced oxygen consumption and energy expenditure in the dark cycle (**Figure 3F-G** and **Figure 3I**; $p < 0.001$ and $p < 0.05$). No differences were observed in VCO₂ production and locomotor activity in females (**Figure 3H and 3J**).

Using thermography, we also analyzed the tail temperature of males and females with a reduction in PI3K activity in SF1 neurons and no difference was found (**Figure 4A-B**), compared with respective controls. However, both female and male SF1-cre; P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ mice fed with HFD, showed a reduction in the skin temperature around the BAT when compared to respective P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ animals (**Figure 4C**, $p < 0.001$ and $p < 0.05$). Furthermore, we analyzed the mRNA expression of the thermogenesis markers in the BAT. There was a reduction in the expression of the uncoupling protein 1 (UCP-1) gene in the SF1-cre; P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ male mice, with no difference in the expression of other thermogenesis markers such as *Cidea*, *Ppara*, *Ppargc1a* (**Figure 4D**, $p < 0.001$). Female mice showed a reduction in the expression of the *Ucp1* and *Cidea* in the BAT. The expression of *Ppara*, *Ppargc1a* was similar between genotypes in females (**Figure 4E** $p < 0.05$). Taken together, the results demonstrate that deletion of the catalytic subunit P110 α in SF1 neurons reduces BAT thermogenesis.

Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH partially reduces the effects of 17 β -estradiol in OVX females on body weight control.

Given that deletion of PI3K in SF-1 neurons was shown to be more prominent in female mice to increase diet-induced weight gain, we then hypothesized that PI3K could mediate the E2 effects on body weight balance. To investigate this interaction, ovariectomized female mice of both genotypes were studied with or without E2 treatment. In both P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ and SF1-cre; P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$, OVX+E2 treatment significantly reduced body weight compared to respective OVX mice. However, the body weight-lowering effects of estradiol treatment was significantly lower in SF1-cre; P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ mice than in P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ mice (**Figure 5A-B**; $p < 0.05$). Furthermore, we found no difference between the experimental groups in food intake (**Figure 5C**).

To confirm the efficacy of the E2 treatment used in the experiments, uteri were weighed as an index of circulating E2 concentration. Uterine weight was greater in both P110 α ^{flox/flox} and SF1-cre; P110 α ^{flox/flox} ovariectomized animals that received the chronic treatment, when compared to untreated animals (**Figure 6A**; $p < 0.001$). To characterize metabolic phenotypes, we also analyzed adiposity. We observed that there was no difference between groups in the liver weight (**Figure 6B**). On the other hand, E2 treatment was able to reduce adiposity only in the P110 α ^{flox/flox} group (**Figure 6C**; $p < 0.001$), indicating a reduced effect of E2 treatment in SF1-cre; P110 α ^{flox/flox} mice. No difference was found between experimental groups in weight of inguinal fat tissue and BAT (Figure 6D-E).

Indirect calorimetry demonstrated that energy expenditure (**Figure 7A-E**) VO₂ (**Supplemental Figure S3**) and VCO₂ (**Supplemental Figure S4**) throughout the 24-hour period were increased in P110 α ^{flox/flox} OVX mice that received E2 treatment. However, estradiol treatment did not promote an increase in indirect calorimetry in SF1-cre; P110 α ^{flox/flox} mice. No difference was observed between groups in locomotor activity (**Supplemental Figure S5**).

Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH reduces the effects of 17 β -estradiol in OVX females on thermogenesis.

Activation of VMH SF1 neurons promotes sympathetic modulation in the BAT, promoting increased heat production through thermogenesis (Xu et al., 2018). Thus, we analyzed the effect of the P110 α deletion in VMH neurons on BAT thermogenesis. We observed that P110 α ^{flox/flox} OVX mice treated with E2 showed an increase in the skin temperature around the BAT, compared with the respective OVX group. However, remarkably this response was not observed in SF1-cre; P110 α ^{flox/flox} mice that received

estradiol replacement (**Figure 8A-B**, $p < 0.05$). Furthermore, there was no difference between experimental groups in the tail temperature (**Figure 8C**). To investigate the participation of sympathetic activity in the thermogenesis, we analyzed plasma and tissue concentrations of noradrenaline. There was no change in circulating noradrenaline (**Figure 8D**). In the BAT, ovariectomized $P110\alpha^{\text{flox/flox}}$ mice that received hormone replacement with E2, showed an increase in noradrenaline concentrations. In contrast, in mice with reduced PI3K activity in the VMH, E2 was not able to increase sympathetic activity in the BAT (**Figure 8E**; $p < 0.05$). There was no difference between groups in noradrenaline concentrations in inguinal white adipose tissue (**Figure 8F**).

We analyzed the gene expression of thermogenesis markers such as UCP1, CIDEA, $PPAR\gamma$ and $PGC1\alpha$. The results show that in the $P110\alpha^{\text{flox/flox}}$ OVX+E2 female mice, there was an increase in the expression of the UCP1 and CIDEA genes in the BAT when compared to the $P110\alpha^{\text{flox/flox}}$ group. On the other hand, this response was not observed in mice with reduced PI3K activity treated with E2 (**Figure 9A-B**; $p < 0.05$).

DISCUSSION

VMH plays an important role in protecting against diet-induced obesity (DIO) by exerting an effect on food intake and energy expenditure (Dhillon et al., 2006; Bingham et al., 2008; XU et al., 2010, Goncalves, 2020). However, the intracellular mechanisms involved in these actions are still little understood. Here we assessed the effect of specific deletion of the catalytic subunit $P110\alpha$ of PI3K in SF1 neurons of the VMH on body weight, food intake, energy expenditure and BAT thermogenesis in male and female mice. We found that decrease in PI3K activity in the VMH causes impairment on energy homeostasis in animals fed with HFD in a sex-specific pattern.

The dysregulation in energy balance observed in animals with P110 α deletion in SF1 neurons, when submitted to HFD, demonstrates the role of VMH in the control of body weight in the context of positive energy balance. Different experimental models with genetically modified animals resulted in similar effects. Deletion of LepR in SF1 neurons of the VMH, for example, causes an increase in the body weight of animals only under HFD (Dhillon et al., 2006; Bingham et al., 2008). This same response was observed with the deletion of molecules such as ER α and sirtuin 1 (SIRT1) or STAT3 specifically in SF1 neurons of the VMH (Ramadori et al., 2011; Xu et al., 2011, Goncalves et al., 2020). All these findings emphasize the role of SF1 neurons in promoting protective effects on body weight gain in situations of increased caloric consumption. In this context, our results reinforce an important role of PI3K signaling pathway in the protective effects of VMH against DIO. Furthermore, the present results indicate that PI3K mediates the protection against DIO via VMH neurons by increasing energy expenditure.

Xu et al, demonstrated for the first time that the deletion of P110 α in SF1 neurons promotes increased body weight and reduced metabolism in male mice under HFD. Furthermore, they showed that the effect of leptin in reducing food intake was significantly blunted in male P110 α knockout mice (Xu et al., 2010). Considering these findings, we can hypothesize that the reduction of PI3K activity in SF1 VMH neurons contributes to reduced leptin action on energy homeostasis.

SF1 knockout mice develop obesity mainly because they have a reduction in energy expenditure (Majdic et al., 2002). In the present study, we showed that the body weight gain in male and female mice with P110 α lacking in the VMH, is not attributed to the increase in food intake, but to the reduction in energy expenditure similarly to SF1 knockout mice. We found a decrease of energy expenditure but not changes in the

locomotor activity in animals with a reduction in PI3K activity in the VMH, so we hypothesize that thermogenesis could be reduced.

The results shown here revealed that in both sexes, deletion of P110 α in SF-1 neurons reduces the skin temperature around the BAT and decreases *Ucp1* mRNA expression, indicating a reduction in thermogenesis. Previous reports have indicated that the sympathetic nervous system (SNS) input is necessary to maintain the thermogenic capacity of BAT (Shimizu et al., 2014). Moreover, the activation of VMH SF1 neurons promotes sympathetic modulation of BAT thermogenesis (Xu et al., 2018). Disruption of SNS signaling promotes a whitening of BAT accompanied by a reduction in mitochondrial activity and the accumulation of lipid droplets (Mobbs et al., 2013). In fact, DIO mice show impaired SNS activity and BAT whitening. In addition, previous studies have shown that lesions in the VMH cause mitochondrial dysfunction and reduce fatty acid oxidation (Seydoux, et al., 1981; Saito & Shimazu, 1984), indicating that an intact VMH is important to maintain BAT function. Our results show that impairment of PI3K activity in VMH neurons reduces BAT temperature and thermogenesis markers in HFD-fed males and females, indicating that P110 α in the VMH might be a critical component for the SNS inputs to the BAT and thermogenesis.

Our results demonstrate the importance of the PI3K pathway in the VMH to attenuate DIO and corroborate previous studies carried out by Xu et al (2010). Furthermore, our findings show for the first time that in female mice fed with HFD, the reduction of PI3K activity in the VMH promotes a greater increase in body weight and adiposity when compared to male mice. We have previously shown that under obesogenic diet the reduction of STAT3 signaling, considered to be one of the main pathways recruited by leptin in the VMH, promotes greater body weight gain in female mice when compared to male mice (Gonçalves et al., 2020). Taken together, these data

suggest that females challenged with HFD become more susceptible to develop metabolic disturbances when the activity of specific intracellular signaling pathways such as STAT3 and PI3K in the VMH are impaired.

Sex differences in energy homeostasis are well established. Here, we found that the impairment in the body weight and adiposity in SF1-cre; P110 α ^{flox/flox} is more prominent in female mice under HFD. Lack of estradiol after menopause is associated with an increased likelihood of developing obesity and type 2 diabetes (Carr, 2003). In experimental animals, the decrease in circulating levels of E2 by ovariectomy leads to the development of hyperphagia, obesity and hyperglycemia, which are reverted by estradiol replacement (Silva et al., 2010; Wade & Gray, 1979). In addition, the VMH has been considered one of the main sites of action of the ovarian hormone in energy homeostasis, since the deletion of the ER α in SF1 neurons increases body weight in females fed with HFD (Xu et al., 2011).

The signaling pathway involved in the actions of E2 on energy homeostasis is not fully understood. However, a study carried out by Malyala et al (2008), demonstrated through in situ hybridization, that E2 increases the mRNA expression of the catalytic subunit of PI3K in the VMH. Furthermore, a single subcutaneous injection dose of E2 significantly increases AKT phosphorylation in the VMH, but not in the Arc (Park, et al., 2011). Our results showed that the reduction of PI3K activity in the VMH partially reduces the effect of E2 in reducing body weight, adiposity and increasing energy expenditure in ovariectomized female mice. Our results reinforce the study carried out by Saito and collaborators who similarly demonstrated that the reduction of PI3K activity in SF1 neurons partially reduces the effect of E2 on the control of energy homeostasis (Saito et al., 2016).

Stimulation of ER α neurons in the vVMH region using the chemogenetic technique, promotes increased BAT activity and heat production in male and female mice, evidencing that E2 acts via the VMH to increase energy expenditure (Veen et al., 2020). Our results demonstrate for the first time that without preserved PI3K activity in SF1 neurons, E2 treatment is ineffective in increasing sympathetic activity and BAT temperature. These data are reinforced by the recent study by Ye et al., (2022), showing a downstream pathway from ER α vVMH to 5-HT neurons in the dorsal raphe nucleus to increase BAT thermogenesis. Considering these findings from the literature, we can hypothesize that PI3K signaling might be recruited in the ER α -mediated activation of high-order hypothalamic circuitry involved in the control of energy expenditure.

In summary, our study shows that, PI3K pathway plays a crucial role in the protection against DIO via VMH neurons. Our results evidence that loss of activity of the catalytic subunit P110 α in VMH neurons reduces BAT temperature and energy expenditure in HFD-fed males and females mice, indicating that PI3K intracellular signaling in the VMH is a critical component for the sympathetic activity inputs to the BAT and thermogenesis. Furthermore, our findings demonstrate that P110 α mediated pathway in SF-1 neurons is required to the estradiol effects on the energy homeostasis under obesogenic diet.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Validation of deletion of catalytic subunit P110 α of PI3K in VMH neurons.

(A) Representative images of phosphorylated AKT (pAKT) in the medio-basal hypothalamus 30 minutes after insulin injection (i.c.v 4.4 mU/2 μ l) in SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} and P110 α ^{flox/flox} mice . Testicle weight (B; n=10); seminal vesicle weight (C; n=10); plasma testosterone levels (D; n= 10/group); adrenal weight (male: E; n=7 plasma corticosterone levels (male: F; n= 6-7); uterine (G; n=6-7/group) and ovary weight

of females in estrus (H; n=6-7/group); adrenal weight (I; n=8 -11/group); plasma corticosterone levels (female: J; n= 6). SF1-cre;P110 α ^{flx/flx} and P110 α ^{flx/flx} mice treated with regular diet (RD) at 20 weeks of age. Values are shown as \pm SEM and the two-tailed Student t test was used for two-group comparisons; p*** <0.0001 between groups.

Figure 2. Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH impairs energy homeostasis in animals subjected to HFD in a sex-specific pattern.

Male body weight (A; n = 6/group), body weight delta (B; n=6/group), cumulative food intake (C; n = 6/group); female body weight (D; n = 7-9/group), body weight delta (B; n=7-9/group), cumulative food intake (C; n= 7-9/group). Data in A and C panels are shown as means \pm SEM and the repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni test were used; p** <0.001 and *p <0.05. Differences between groups were determined by Two-Way ANOVA followed by Tukey post-hoc test.

Figure 3. Deletion of P110 α catalytic in SF1 neurons of the VMH decreases energy expenditure in males and females fed with HFD.

O₂ consumption over a 24h period (A; n=6/group); area under the curve (AUC) of O₂ consumption (B; n=6-7/group); AUC of carbon dioxide production (VCO₂) average over a 24h period (C; n=6-7/group); ambulatory movement (D; n=6/group); energy expenditure (E; n=6-7/group) in male mice. O₂ consumption over a 24h period (F; n=6/group); under the curve (AUC) of O₂ consumption (G; n=6-7/group); AUC of carbon dioxide production (VCO₂) average over a 24h period (H; n=6-7/group); ambulatory movement (I; n=6/group); energy expenditure (J; n=6-7/group) in female mice. Data as means \pm SEM and the two-tailed Student t test was used; *p <0.05.

Figure 4. Deletion P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH reduces BAT temperature and thermogenic markers in male and female mice subjected to HFD.

Thermographic images of SF1-cre;P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ and P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ male and female mice (A); Tail temperature (B; n=6/group) and skin temperature in BAT area in the dark circle (C; n=6/group). mRNA relative expression of *Ucp1*, *Cidea*, *Ppara*, *Ppargc1a* in the BAT of male (D; n= 5-7/group) and female SF1-cre;P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ and P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ mice (E; n= 6-7/group). Data as means \pm SEM and the two-tailed Student t test was used; p** <0.001 and *p <0.05 between groups.

Figure 5. Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH partially reduces the effects of 17 β -estradiol in OVX females on body weight control.

Body weight (A; n = 6/group); body weight delta (B; n=6/group) and cumulative food intake in OVX control or treated with 17 β -estradiol treatment in SF1-cre;P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ and P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ female mice treated with regular diet. Data as mean \pm SEM. P* <0.05 between groups determined by Two-Way ANOVA followed by Tukey post-hoc test.

Figure 6. Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH attenuates the effects of 17 β -estradiol in reducing adiposity in OVX female mice.

(A) Weight of uterus; (B) Liver; (C) retroperitoneal white adipose tissue weight (rWAT); (D) inguinal white adipose tissue (iWAT); (E) and brown adipose tissue (BAT) of SF1-cre;P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ and P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ female OVX mice with or without treatment with 17 β -estradiol (n=6/group). Data as means \pm SEM. p** <0.001 between groups determined by Two-Way ANOVA followed by Tukey post-hoc test.

Figure 7. Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH attenuates the effects of 17 β -estradiol in increasing energy expenditure.

Energy expenditure in OVX or OVX+E-treated of SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} and P110 α ^{flox/flox} female mice (n= 6/group). Data are presented as mean \pm SEM. $p^* < 0.05$ between OVX+V and OVX+E the two-tailed Student t test was used.

Figure 8. Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH attenuates the effects of 17 β -estradiol on sympathetic activity and thermogenesis in the BAT.

Thermographic images of SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} and P110 α ^{flox/flox} OVX mice with or without treatment with estradiol (n=6/group) (A); Tail temperature (B) and temperature skin BAT area (C). Plasma noradrenaline levels (D; n=6/group), noradrenaline concentration in the BAT (E; n=6/group) and inguinal white adipose tissue (F, iWAT, n=6/group). Data as means \pm SEM. $p^{**} < 0.001$ and $*p < 0.05$ between groups determined by Two-Way ANOVA followed by Tukey post-hoc test.

Figure 9. Deletion of the P110 α catalytic subunit in VMH SF1 neurons reduces the effects of 17 β -estradiol in OVX females on increasing gene expression of thermogenesis markers. Relative mRNA expression of Ucp1 (A; n= 5-6/group), Cidea (B; n= 5-6/group), Ppara (C; n= 5-6/group), and PGC1 α (D; n = 5-6/group), in the BAT of female mice P110 α ^{flox/flox} and SF1-cre;P110 α ^{flox/flox} with or without hormone replacement with E2. Data as means \pm SEM. $*p < 0.05$ between groups, determined by Two-Way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test

SUPPLEMENTAL DATA

Figure S1. Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH does not affect body weight in male and female mice under normal chow diet.

Male body weight (A; n = 10/group), body weight delta (B; n= 10/group), cumulative food intake (C; n = 10/group); female body weight (D; n = 9-11/group), body weight delta (B; n=9-11/group), cumulative food intake (C; n = 9-11/group). Data in A and C panels are shown as means \pm SEM and the repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni test were used. $P^* < 0.05$. Differences between groups were determined by Two-Way ANOVA followed by Tukey post-hoc test.

Figure S2. Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons increases adiposity in female mice fed HFD. Weight of liver, brown adipose tissue (BAT) and retroperitoneal white adipose tissue (rWAT) of SF1-cre;P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ and P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ male (A; n=10). Plasma leptin levels in male (B; n=7). Weight of liver, BAT and WAT of SF1-cre;P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ and P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ female mice (C; n=10). Plasma leptin levels in females (D; n=7) under normal chow diet. Weight of liver, BAT and rWAT of SF1-cre;P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ and P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ male mice (E; n=6). Plasma leptin levels in male (F; n=7). Weight of liver, BAT and WAT of SF1-cre;P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ and P110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ female mice (G; n=10). Plasma leptin levels in females (H; n=7) fed HFD. Data as mean \pm SEM and the two-tailed Student t test was used. $p^* < 0.05$ and $p^{**} < 0.001$ between groups.

Figure S3. Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH attenuates the effects of 17 β -estradiol in increasing oxygen consumption.

Oxygen consumption (VO₂) in OVX or OVX+E-treated (A) or SF1-p110 α -KO female mice (B; n= 6/group). VO₂ during the 24-hour period (C; n= 6/group), the light cycle (D; n= 6/group) or the dark cycle (E; n= 6/group) in all four groups. Data are presented as mean \pm SEM. $*p < 0.05$ between OVX+V and OVX+E the two-tailed Student t test was used.

Figure S4. Deletion of P110 α catalytic subunit in SF1 neurons of VMH attenuates the effects of 17 β -estradiol in increasing carbon dioxide production.

Carbon dioxide production (VCO₂) in OVX or OVX+E-treated (A) or SF1-p110 α -KO female mice (B; n= 6/group). VO₂ during the 24-hour period (C; n= 6/group), the light cycle (D; n= 6/group) or the dark cycle (E; n= 6/group) in all four groups. Data are presented as mean \pm SEM. *p <0.05 between OVX+V and OVX+E the two-tailed Student t test was used.

Figure S5. Effect of P110 α catalytic subunit deletion in SF1 neurons of VMH in OVX female mice treated with E2 on locomotor activity

Locomotor activity in OVX or OVX+E-treated (A) or SF1-p110 α -KO female mice (B; n= 6/group). Locomotor activity during the 24-hour period (C; n= 6/group), the light cycle (D; n= 6/group) or the dark cycle (E; n= 6/group) in all four groups. Data are presented as mean \pm SEM. p* <0.05 between OVX+V and OVX+E the two-tailed Student t test was used.

Acknowledgement

The authors would like to thank Maria Valci dos Santos and Lilian do Carmo Heck for their technical support.

Financial support

This work was supported by grants from the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP – Brazil: 2020/07368-7; scholarship to AAJ and grants 2020/07368-7, FAPESP grant 2018/18071-5. Coordination for Enhancement of Higher Education Personnel (Capes - Brazil) and CNPq.

Authors Contributions

Conceptualization: AAJ CEF JAR LLKE

Design and work methodology: AAJ RCS IRS MMM GGHM CEF JAR LLKE

Data collection: AAJ RCS IRS HVS REV LLKE

Data acquisition: AAJ RCS IRS HVS MMM REV LCN LLKE

Data analysis and interpretation: AAJ RCS IRS MMM REV GGHM LCN CEF JAR
LLKE

Funding acquisition, project administration, resources and supervision: JAR and LLKE

Writing: AAJ RCS LLKE

Statement of Ethics

All procedures were approved by the Committee for Animal Care and Use (CEUA-FMRP number 076/2019), of School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Conflict of Interest Statement

The authors report no conflicts of interest.

REFERENCE

Borges, B.C.; Antunes-Rodrigues, J.; Castro, M.; Bittencourt, J.C.; Elias, C.F.; Elias, L.L. Expression of hypothalamic neuropeptides and the desensitization of pituitary-adrenal axis and hypophagia in the endotoxin tolerance. *Horm Behav.* v,52, p.508-19, 2007.

Bingham NC, Anderson KK, Reuter AL, Stallings NR, Parker KL. Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. *Endocrinology.* v.149, p.2138-48, 2008.

Butler, A.A and Kozak, L.P. A recurring problem with the analysis of energy expenditure in genetic models expressing lean and obese phenotypes. *Diabetes.* v.59, p.323–329, 2010.

Carr, M.C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 6, p.2404-11, 2003.

Calle, E. E; Rodriguez, C; Walker-Thurmond, K; Thun, M.J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.*, v. 348, p.1625-1638, 2003.

Cao, X. et al. Estrogens stimulate serotonin neurons to inhibit binge-like eating in mice. *J Clin Invest* 124, 4351–4362, doi: 10.1172/JCI74726 (2014).

Castañeda, T.R.; Juřrgens, H.; Wiedmer, P.; Pfluger, P.; Diano, S.; Horvath, T.L.; Tang-Christensen, M.; and Tschoř, M.H. Obesity and the neuroendocrine control of energy homeostasis: the role of spontaneous locomotor activity. *J. Nutr.* 135, 1314–1319, 2005.

Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V, Kenny CD, Christiansen LM, White RD, Edelstein EA, Coppari R, Balthasar N, Cowley MA, Chua S Jr, Elmquist JK, Lowell BB. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron.* v.19, p-191-203, 2006.

Fujikawa T, Choi YH, Yang DJ, Shin DM, Donato J Jr, Kohno D, Lee CE, Elias CF, Lee S, Kim KW. P110 β in the ventromedial hypothalamus regulates glucose and energy metabolism. *Exp Mol Med.* v.6, p.1-9, 2019.

Garofalo, M.A.R. et al. Effect of acute cold exposure on norephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *Journal of Autonomic nervous System*, v.60, p, 206-208, 1996.

Garcia-Galiano, D.; Borges, B.C.; Donato, J.Jr.; Allen, S.J.; Bellefontaine, N.; Wang, M.; Zhao, J.J.; Kozloff, K.M.; Hill, J.W.; Elias, C.F. PI3K α inactivation in leptin receptor cells increases leptin sensitivity but disrupts growth and reproduction. *JCI Insight*, v.23, 2017.

Gonçaves, G. H. M.; Tristão, S. M.; Volpi, R. E.; Almeida-Pereira, G.; Carvalho, B.; Donato, J.Jr.; de Castro, M.; Antunes-Rodrigues, J.; Elias, L. L. K. STAT3 but Not ERK2 Is a Crucial Mediator Against Diet-Induced Obesity via VMH Neurons. *Diabetes*, v.70, p.1498–1507, 2021.

Ikeda, Y; Luo, X; Abbud, R; Nilson, J. H; Parker, K.L. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol*, v.9, p.478–486, 1995.

Maragon, P. B.; Silva, L. E. C. M.; Rorato, R.; P. Alves, G.; Antunes-RodriguesO, J.; Elias, L. L. K. Oestradiol Modulates the Effects of Leptin on Energy Homeostasis by Corticotrophin-Releasing Factor Type 2 Receptor. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 26, p.796–804, 2014.

Mauvais-Jarvis, F.; Clegg, D. J.; Hevener, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr.* v. 34, p.309–338, 2013.

Majdic, G.; Young, M.; Gomez-Sanchez, E. Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology.* v.143, p.607–614, 2002.

Mobbs, C. V.; Moreno, C. L. & Poplawski, M. Metabolic mystery: aging, obesity, diabetes, and the ventromedial hypothalamus. *Trends Endocrinol. Metab.* v.24, p.488–494, 2013.

Malyala, A.; Zhang, C.; Bryant, D. N. ; Kelly, M. J. ; Rønnekleiv, O. K. PI3K signaling effects in hypothalamic neurons mediated by estrogen. *J Comp Neurol* Feb v. 506, p. 895-911, 2008.

Musatov, S.; Chen, W.; Pfaff, D. W.; Mobbs, C. V.; Yang, X. J.; Clegg, D. J.; Kaplitt, M. G.; Ogawa, S. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v.104, p. 2501–2506, 2007.

Myres, M. G.; Jr and Olsoni, D. P. Central nervous system control of metabolism. *Nature*, v.491, p.357-363, 2012.

Pelletier, G.; Li, S.; Luu-The, V.; Labrie, F. Oestrogenic regulation of pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y and corticotrophin-releasing hormone mRNAs in mouse hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* v.19, p. 426–431, 2007.

Park, C. J. et al. Zhao. Z.; Glidewell-Kenney, C.; Lazic, M.; Chambon, P.; Krust, A.; Weiss, J.; Clegg, D. J.; Andrea, D. J.; Jameson, L.; Levine, J. E Genetic rescue of nonclassical ER α signaling normalizes energy balance in obese Eralpha-null mutant mice. *J. Clin Invest*, v. 121, p. 604–612, 2011.

Kim, K.W.; Zhao, L.; Donato, J.; Kohno, D.; Xu, Y.; Elias, C.F. X. Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet induced thermogenesis and leptin action in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* v.108, p. 10673–10678, 2011.

Kim, S. H.; Despres, J. P.; Koh, K. K. Obesity and cardiovascular disease: friend or foe? *Eur. Heart J*, v. 37, p. 3560-3568, 2015.

Ramadori, G.; Fujikawa, T.; Anderson, J. B. ED.; Frazao R.; Michán, S.; Vianna, C.R.; Sinclair, D.A.; Elias, C. F.; Coppari, R. SIRT1 deacetylase in SF1 neurons protects against metabolic imbalance. *Cell Metab.* v. 14, p.301-12, 2011.

Saito, K.; He, Y.; Yang, Y.; Zhu, L.; Wang C.; Xu, P.; Hinton, A. O. Y.; Zhao, J.; Fukuda, M.; Tong, Q.; Clegg, D.; Xu, Y. PI3K in the ventromedial hypothalamic nucleus mediates estrogenic actions on energy expenditure in female mice. *Scientific Reports*, v. 6, p.23459. 2016.

Saito, M. & Shimazu, T. Decreased rate of fatty acid synthesis in brown adipose tissue of hypothalamic obese rats. *FEBS Lett.* v.166, p.151–154, 1984.

Seydoux, J.; Rohner-Jeanrenaud, F.; Assimacopoulos-Jeannet, F.; Jeanrenaud, B. & Girardier, L. Functional disconnection of brown adipose tissue in hypothalamic obesity in rats. *Pflug. Arch.* v.390, p.1–4, 1981.

Shimizu, I.; Suda, M.; Havashi, Y.; Shuaq, J.; Ikegami, R.; Katsumi, G.; Kavamori, H.; Walsh, K.; Minamino, T et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J. Clin. Invest.* v.124, p. 2099–2112, 2014.

Silva L.E.; Castro, M.; Amaral, F.C.; Antunes-Rodrigues, J.; Elias, L.L. Estradiol induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. *Braz J Med Biol Res.* v.43, p.759-66, 2010.

Sahu, M.; Anamthathmakula, P, and Sahu, A. Hypothalamic phosphodiesterase-3B pathway mediates anorectic and body weight reducing effects of insulin in male mice. *Neuroendocrinology*, v.104, p.145–156, 2017.

Veen, E. V. J et al. Hypothalamic oestrogen receptor alpha establishes a sexually dimorphic regulatory node of energy expenditure. *Nat Metab.* V. 2, p. 351-363, 2020.

Xu, Y.; López, M. Central regulation of energy metabolism by estrogens. *Mol Metab*, 15, p.104-115, 2018.

Xu, Y.; Hill, J.W.; Fukuda, M.; Gautron, L.; Sohn, J.W.; Kim, K.W.; Lee, C.E.; Choi, M.J.; Lauzon, D.A.; Dhillon, H.; Lowell, B.B.; Zigman, J.M.; Zhao, J.J.; Elmquist, J.K. PI3K signaling in the ventromedial hypothalamic nucleus is required for normal energy homeostasis. *Cell Metab.* v.7, p.88-95, 2010.

Xu, Y.; Nedungadi, T. P .; Zhu, L.; Sobhani, N.; Irani, B.G .; Davis, K. E , Zhang, X.; Zou, F.; Lana, G. M , Hahner, L. D.; Khan, S. A .; Elias, C. F .; Elmquist, J. K Clegg, D. J. Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab.* v.14, p. 453–465, 2011.

Xu, Y.; Nedungadi, T. P .; Zhu, L .; Sobhan, N.; Irani, B. G .; Davis, K. E .; Zhang, X.; Zou, F.; Gent, L. M.; Hahner, L. D.; Sohaib, K. A .; Elias, C. F.; Elmquis, J. K. t, Clegg, D. J. Distinct Hypothalamic Neurons Mediate Estrogenic Effects on Energy Homeostasis and Reproduction. *Cell Metab*, v.14, p.453-65, 2011.

Wearing, S.C; Hennig, E. M; Byrne, N.M; Steele, J,R; Hills, A.P . Musculoskeletal disorders associated with obesity: a biomechanical perspective. *Obes Ver.* v.3, p.239-50, 2006.

Zhu, L.; Yang, Y.; Xu, P.; Zhou, F.; Yan, X.; Liao, L.; Xu, J.; O'Malley, B. W.; Xu, Y. Steroid receptor coactivator-1 mediates estrogenic actions to prevent body weight gain. *Wade, G.N.; Gray, J.M. Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. Physiol Behav.* v. 22, p.583-93, 1979.

Ye, H; Feng, B.; Wang, C.; Saito, K.; Yang, Y.; Ibrahimi, L.; Schaul, S.; Patel, N.; Saenz, L.; Luo, P.; Lai, P.; Torres, V.; Kota, M.; Dixit, D.; Cai, X.; Qu, N.; Hysen, I.; Yu, K.; Jiang, Y.; Tong, Q.; Sun, Z, Arenkiel, B. R.; He, Y.; Xu, P.; Xu, Y. An estrogen-sensitive hypothalamus-midbrain neural circuit controls thermogenesis and physical activity. *Sci Adv.* v.21, 2022.

FIGURES

Figure 1 (A-J)

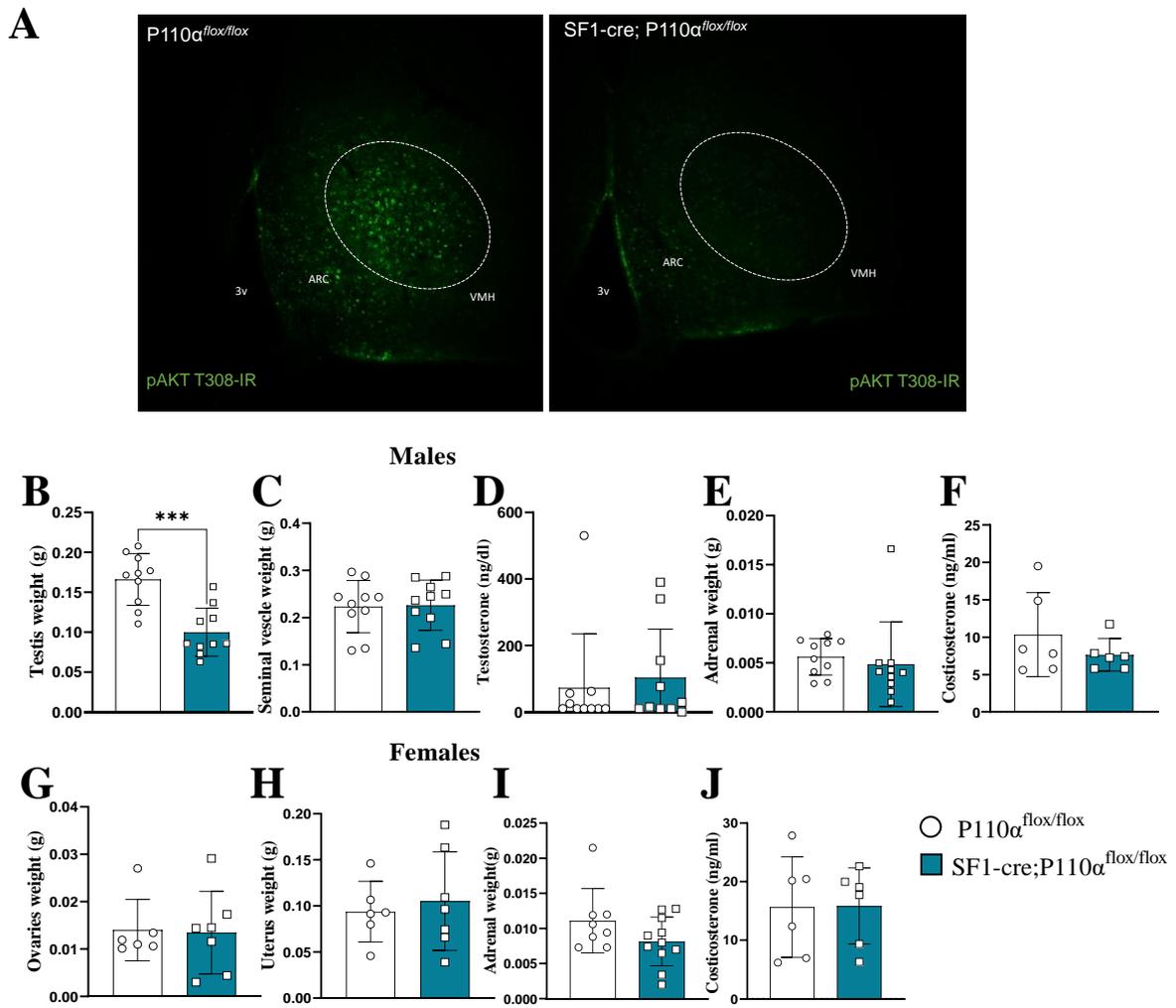


Figure 2 (A-F)

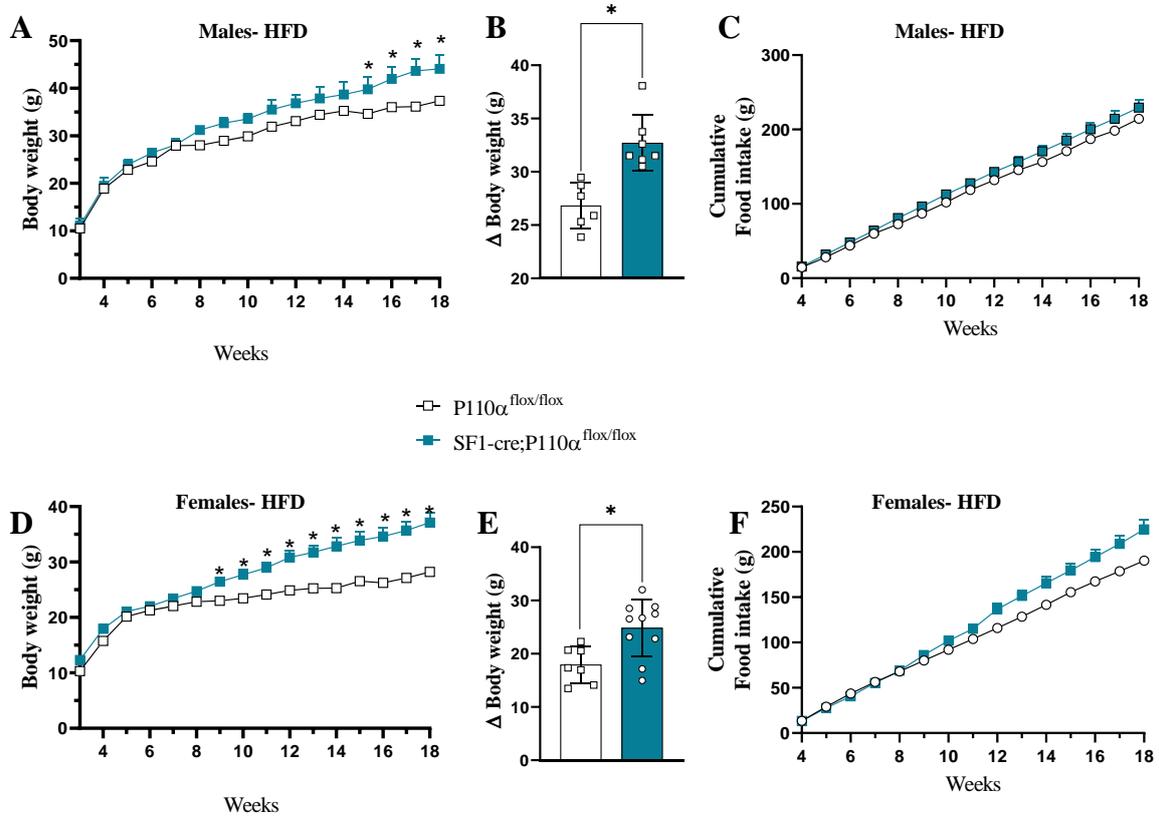


Figure 3 (A-J)

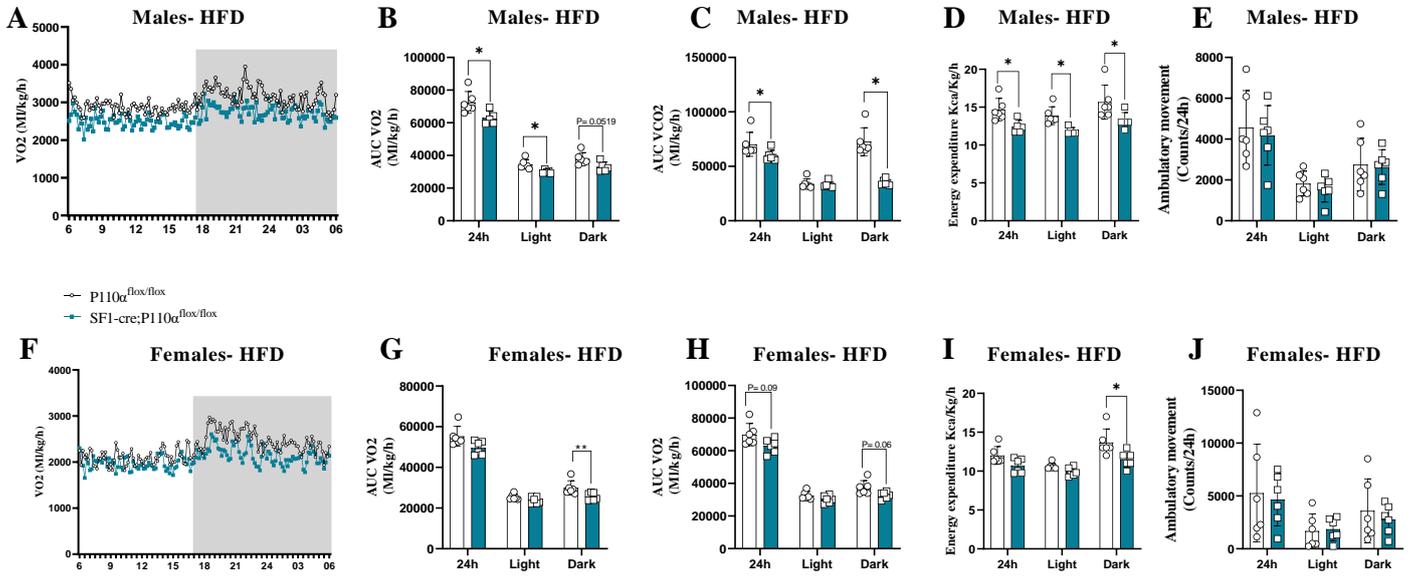


Figure 4 (A-E)

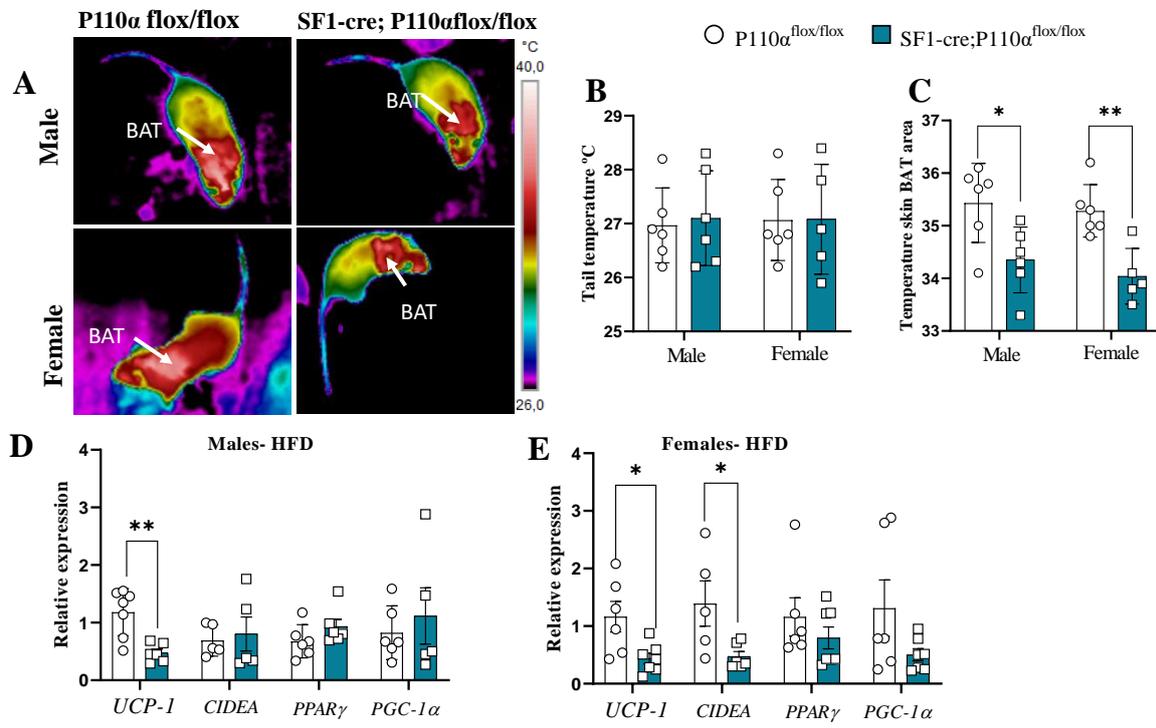


Figure 5 (A-C)

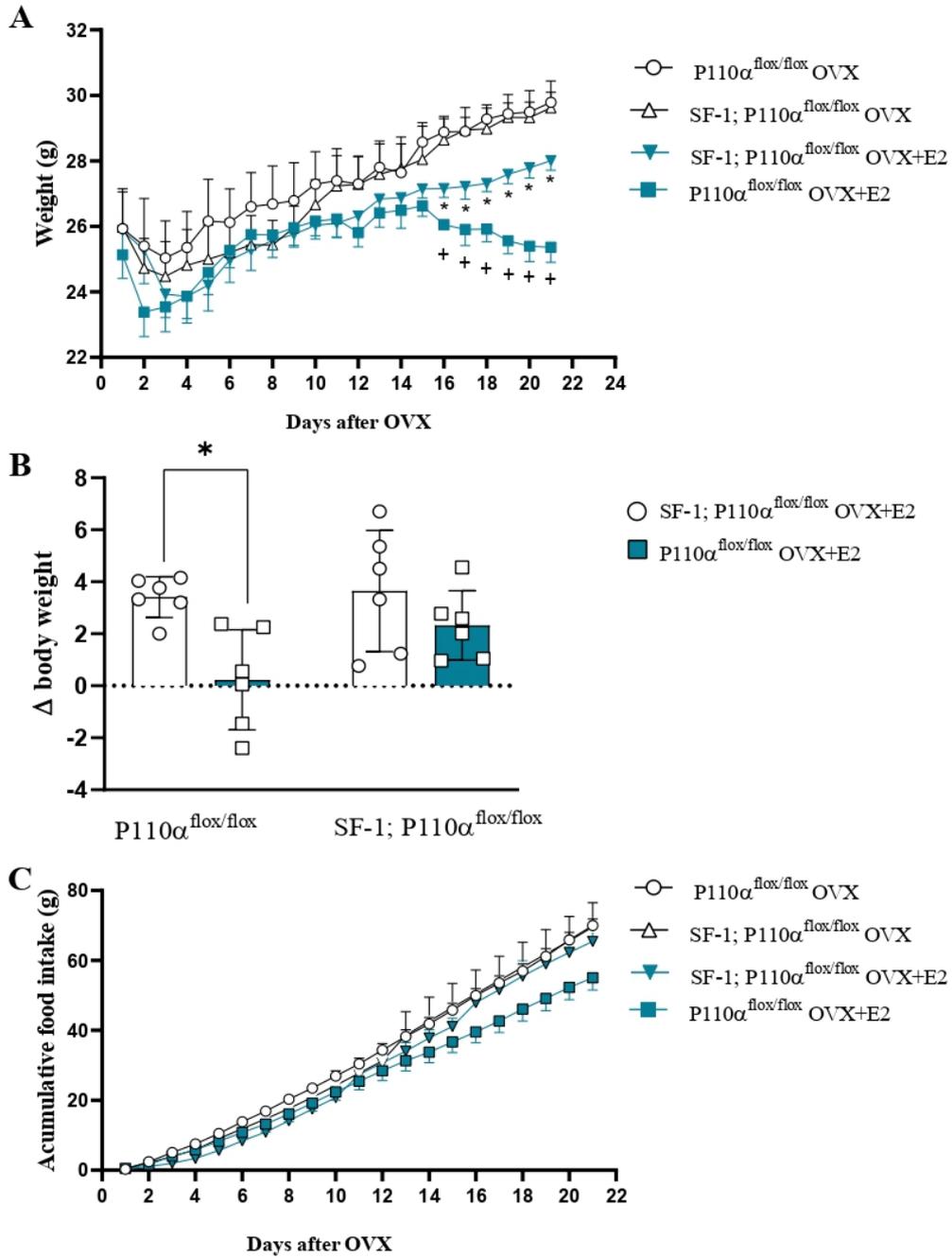


Figure 6 (A-E)

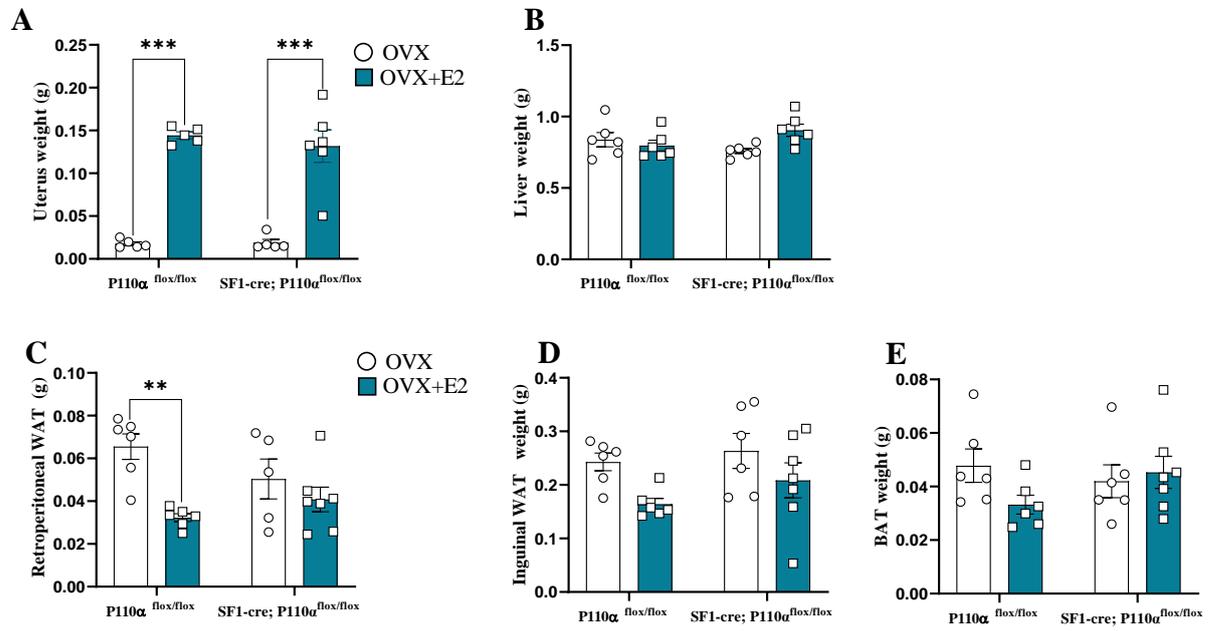


Figure 7 (A-E)

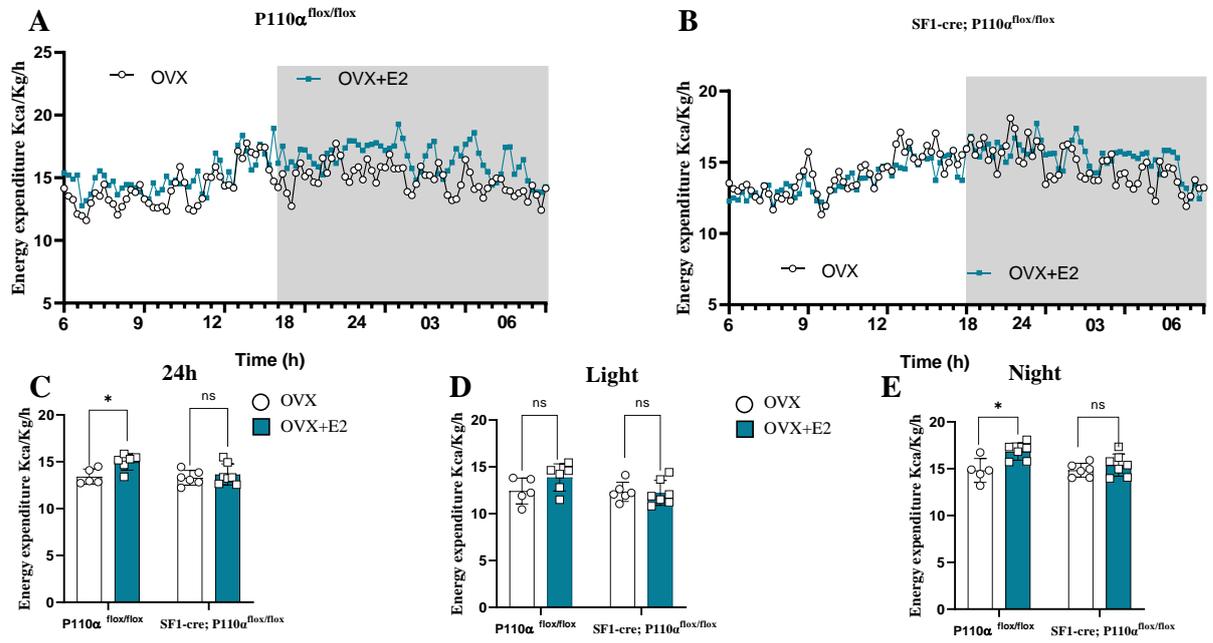


Figure 8 (A-F)

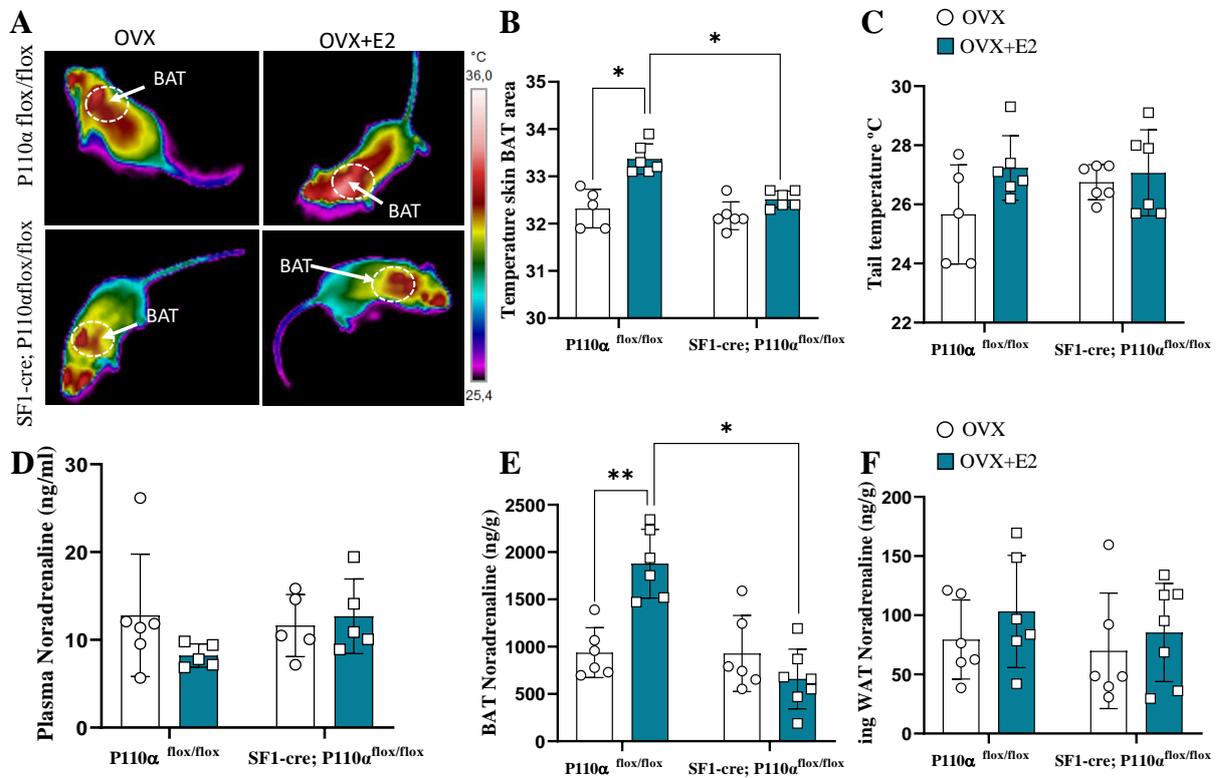
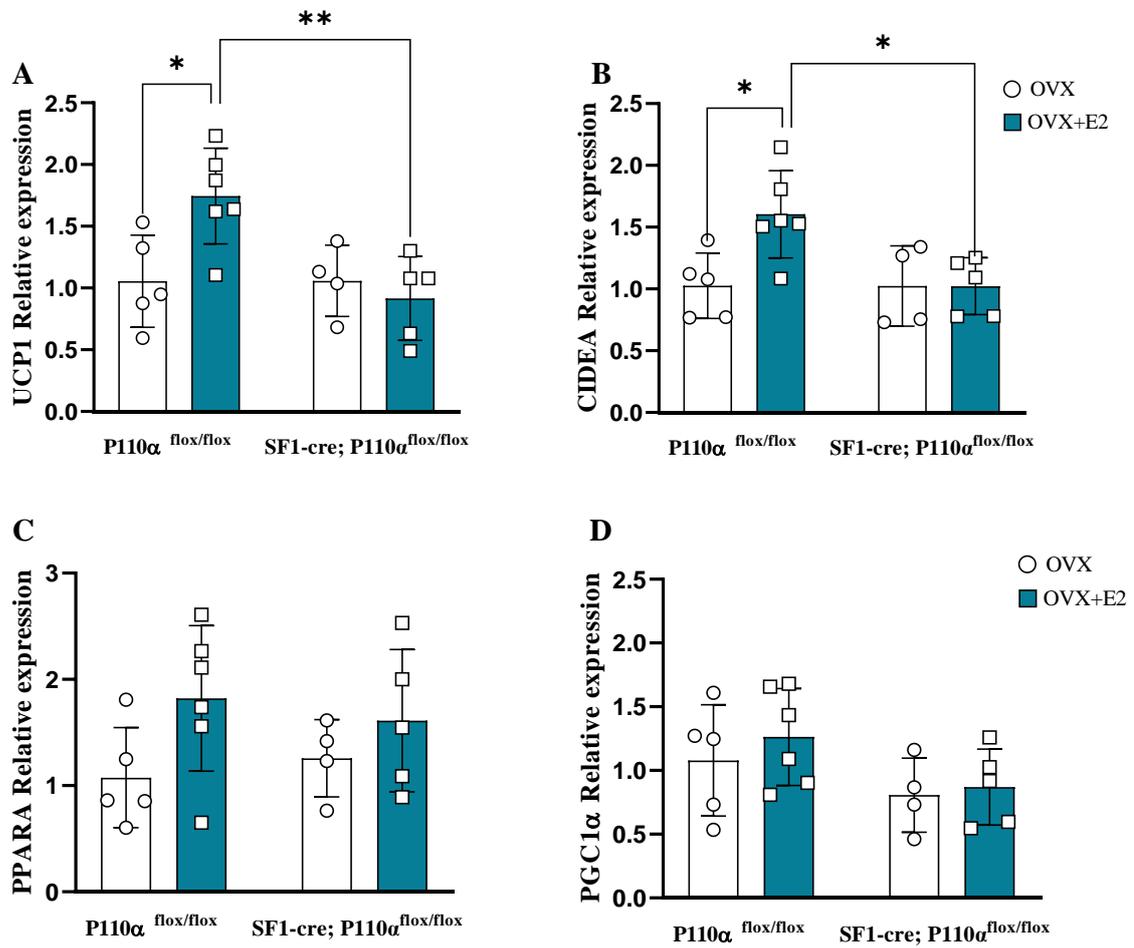


Figure 9 (A-D)



SUPPLEMENTAL DATA

Figure S1 (A-F)

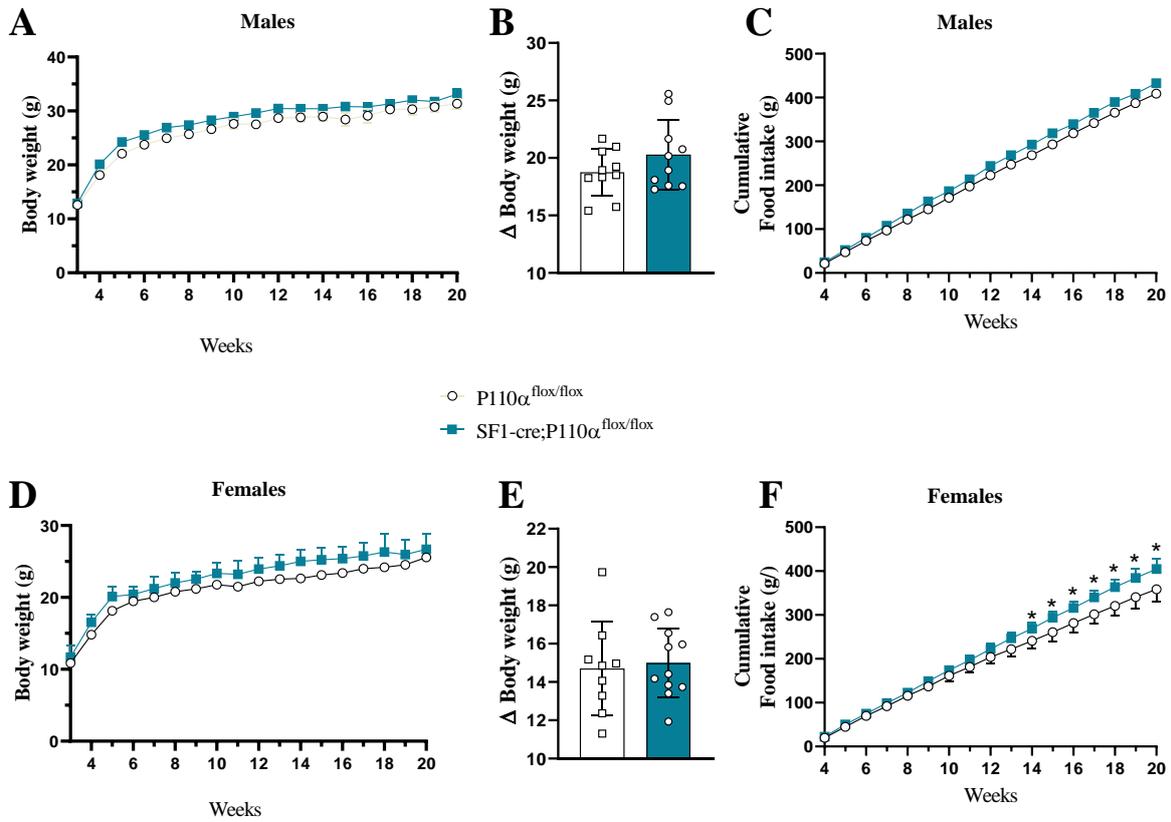


Figure S2 (A-H)

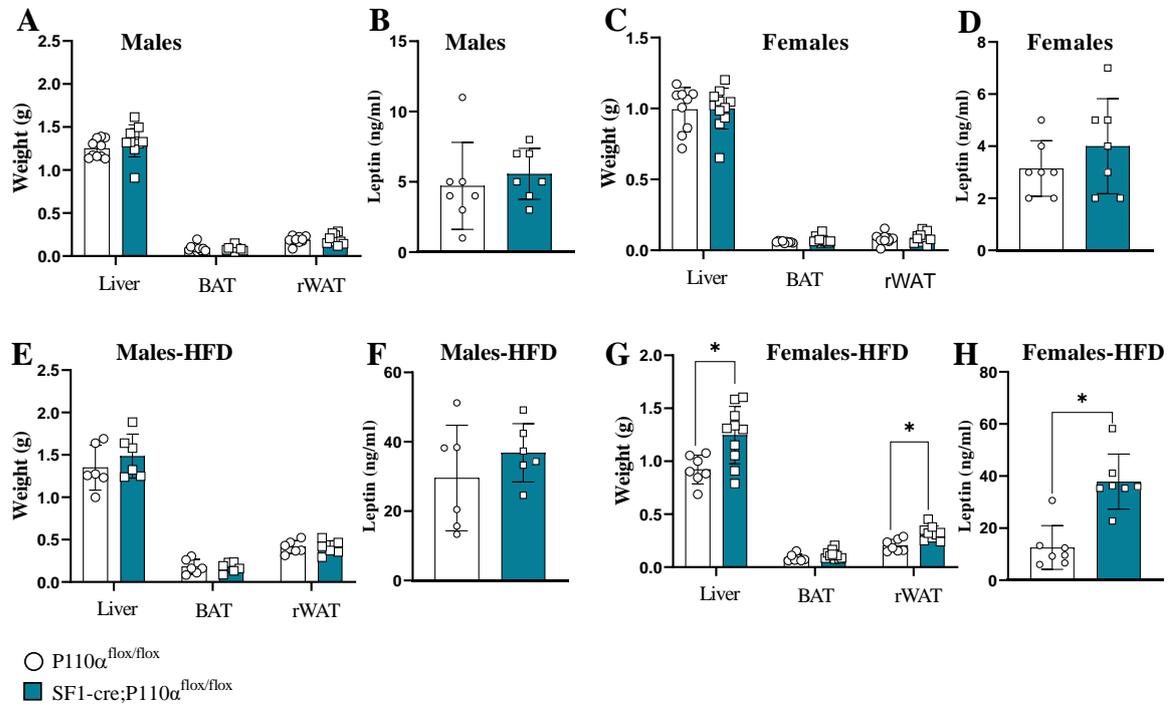


Figure S3 (A-E)

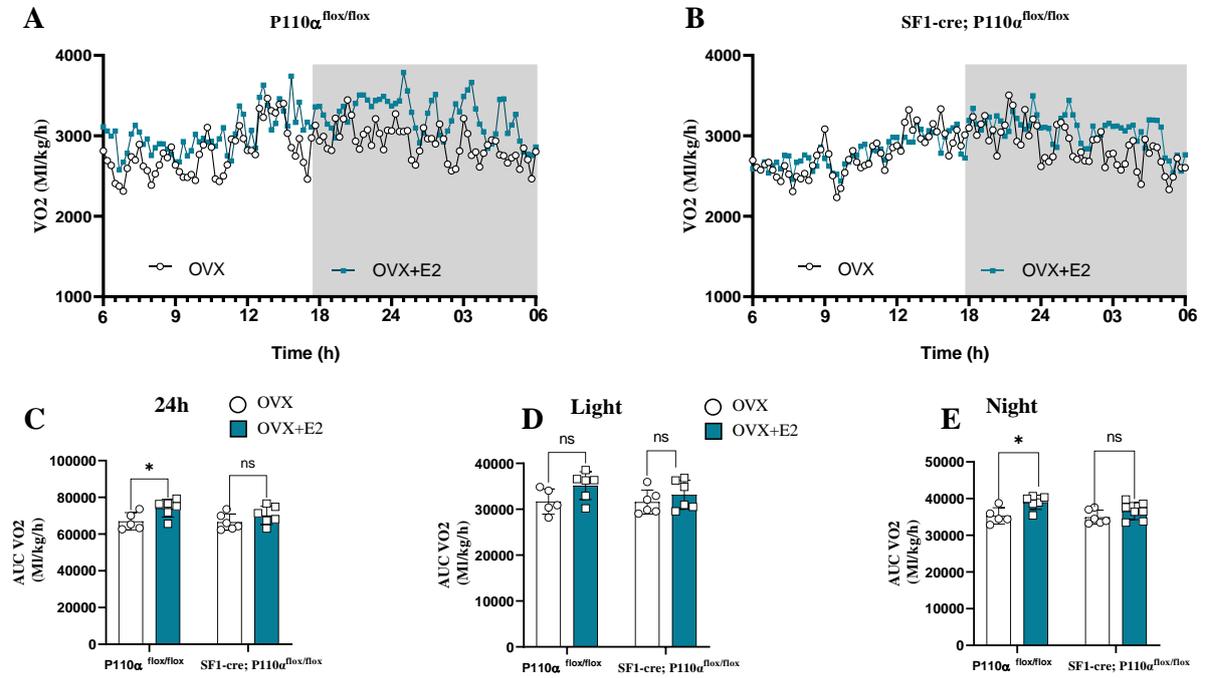


Figure S4 (A-E)

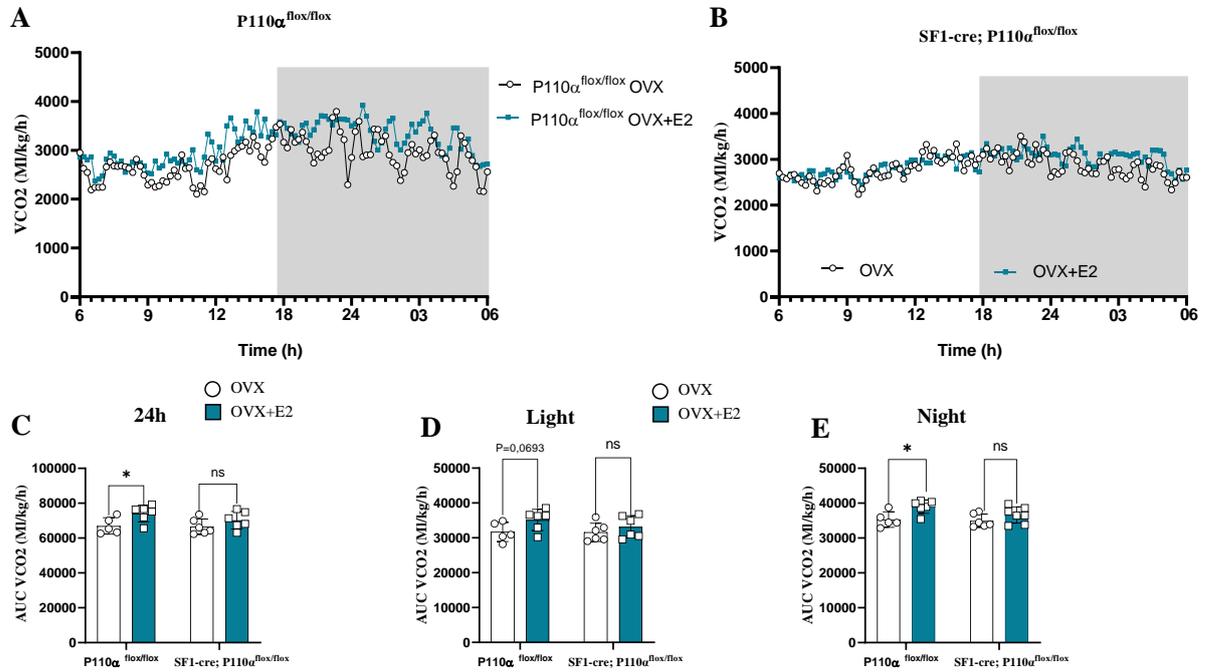


Figure S5 (A-E)

