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

GABRIEL OREFICE DE SOUZA

Avaliação de dimorfismo sexual na regulação central do metabolismo energético de camundongos

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

São Paulo 2020

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

GABRIEL OREFICE DE SOUZA

Avaliação de dimorfismo sexual na regulação central do metabolismo energético de camundongos

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Donato Júnior

Versão corrigida.

São Paulo 2020

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Souza, Gabriel Orefice Avaliação de dimorfismo sexual na regulação central do metabolismo energético de camundongos / Gabriel Orefice de Souza; orientador José Donato Júnior. -- São Paulo, 2020. 83 p. Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Dimorfismo Sexual. 2. Obesidade. 3. Dietas. 4. Grelina. 5. Hipotálamo. T. Júnior, José Donato, orientador. II. Titulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gabriel Orefice de Souza

Título da Dissertação/Tese: Avaliação de dimorfismo sexual na regulação central do metabolismo energético de camundongos

Orientador: Prof. Dr. José Donato Júnior

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

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

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



COMISSÃO DE ETICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Hode Liveeniting Terminic by Safety Observ, Butletik, Salo Paule, SP. An Protector Lines, Presen, 3418 (CR-II) 25508-055 CBLA-ICRUSP: Telefone (11) 5091-7723 (-enter coefficiency for CBLA-ICRUSP: Telefone (11) 5091-7723 (-enter coefficiency for

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Ação do hormônio do crescimento no sistema nervoso: relevância pora os funções neurals e na doenço", registrado sob o protocolo nº 73/2017, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em 07/07/2017 pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de 4 ano(s) a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: Dr.(a.) José Donoto Júnior

- Departamento: Fisiologia e Biofísica

- Membros da Equipe: Prysola Dryelle Sousa Tekseira, hadora Clivatti Furigo (Pós-Doutorando), Icaia Alfreda Bolivar Pedroso (Pós-Doutorando), Frederick Wasinski (Pós-Doutorando), Gisele Cristina Calto, Ana Maria P. Campo (Tecnico de Laboratório), Remata Frasão (Pesquisador Calabarador), Leandro Bueno Lima (Pós-Doutorando), Tabota Bohlen, Lucus Brecht Palos dos Santos (Iniciação Científica), Igor Tomaz (Iniciação Científica), Gabriel Orefice de Sousa (Iniciação Científica), Fernanda Machada (Pás-Graduando)

Ao final do periodo outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar ≥ esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, relatório finol de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira gara o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico <u>anexe ichura hyvendo</u> interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "The role of growth hormone in the brain: relevance for

neural functions and in disease", protocol nº 73/2017, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for Scientific Research Purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8", 2008, Decree nº 6899 passed on July 15", 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on 7/7/2017 by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for 4 year(s) from the date of approval.

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

- Tearn members: Pryscila Dryelle Sousa Teixerra, isodora Clivatti Funigo (Postdoctoral Researcher), roba Alfredo Bolivar Pedroso (Postdoctoral Researcher), Frederick Waxinoki (Postdoctoral Researcher), Greele Cristina Colto, Ana Maria P Campo (Laboratory Technique), Renata Frazão (Colaborator Researcher), Leondro Bueno Linia (Postdoctoral Researcher), Tabota Bohlen, Lucas Brecht Palos dos Santos (Undergraduate Student), Igor Tomas (Undergraduate Student), Gabriel Crefice de Souza (Undergraduate Student), Fernanda Machado (Gordoute Student).

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Unhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age- Weight	Total
Mus musculus	C578L/6 selvagem	Macho/Male	até 8 meses/months	170
Mus musculus	GHR-Box/Nestin-Cre	Macho/Male	até 20 meses/months	280
Mus musculus	db/db	Macho/Male	até 8 meses/months	30
Mus musculus	ab/ab	Macho/Male	até 8 meses/months	40
Mus musculus	lit/lit	Macho/Male	até 8 meses/months	30

Dedico esse trabalho ao meu Babalorixá Ibitaladeró (Pai Ibi), de nome Anderson Gabriel, que infelizmente deixou esse plano há dois meses, mas que eu sei que sempre estará espiritualmente presente. Muito obrigado por todos os ensinamentos, risadas, comidinhas gostosas e por toda a ajuda espiritual dada nesses dois anos de convivência. Sem sua ajuda nesse tempo, com certeza não estaria aqui hoje. Bom descanso junto ao nosso Pai Oxalá e até mais. Primeiramente gostaria de agradecer ao meu Pai Oxalá por todas as bençãos que eu tive durante esse percurso, e por sempre ter me mantido no caminho certo e ter me dado uma luz, mesmo quando as coisas pareciam impossíveis.

Ao meu orientador, Prof. José Donato Júnior, por ter confiado no meu trabalho mesmo durante momentos em que eu mesmo tive receio de fazer algo. Obrigado por todo o conhecimento adquirido, com certeza estou finalizando essa etapa com uma mentalidade diferente de quando eu ingressei no mestrado 2 anos atrás.

Aos meus familiares, principalmente meus pais, por sempre terem me incentivado a estudar, por terem me apoiado incondicionalmente nas minhas decisões e me dado força e ajuda quando eu necessitei. Não sou muito de dizer essas coisas, mas amo vocês. Do meu jeitinho retraído mesmo.

Ao meu falso indiozinho, Gustavo, muito obrigado por toda a ajuda dada para que eu estivesse finalizando meu mestrado hoje.

Muito obrigado Aninha, por todas as risadas, conversas, cafezinhos, festinhas no laboratório e "comilanças" dentro e fora do ICB. Você é simplesmente a pessoa mais sensacional que eu já conheci. É alguém que com certeza levarei para fora daqui, pois como dizem, é minha "mãe" de laboratório.

Obrigado Isadora por todo o conhecimento e expertise que você me passou desde o primeiro dia quando eu vim ao laboratório conversar sobre fazer IC. Se hoje eu tenho o conhecimento que eu tenho de laboratório, você tem grande parte nisso.

Aos meus colegas de laboratório, tanto os que já finalizaram, quanto os que ainda se encontram aqui, em especial o Will, muito obrigado por todas as risadas e por toda a ajuda durante esses anos de convívio.

Ao professor Mario Perello, do laboratório de neurofisiologia do Instituto Multidisciplinario de Biologia Celular na Argentina, pela colaboração para a execução desse projeto. Muito obrigado pelo conhecimento e por fornecer a grelina que foi utilizada nesse projeto. Agradeço também ao Franco, aluno do prof. Mario, por toda as dicas passadas a respeito da utilização desse hormônio.

A todas as pessoas que me ajudaram de maneira direta ou indireta, muito obrigado.

Agradeço especialmente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento concedido (processo institucional 156760/2018-5) para que eu fosse capaz de realizar esse trabalho. Muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica).

"As circunstâncias do nascimento de alguém são irrelevantes; é o que você faz com o dom da vida que determina quem você é."

- MEWTWO. Pokémon: O Filme – Mewtwo Contra-Ataca (2000).

RESUMO

SOUZA, G.O. Avaliação de dimorfismo sexual na regulação central do metabolismo energético de camundongos. 2020. – 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A manutenção do peso corporal "ideal" tem sido um dos maiores desafios enfrentados por homens e mulheres na atualidade. Vivemos hoje uma epidemia de obesidade, que vem causando redução na qualidade de vida e alta taxa de mortalidade em todas as faixas etárias. Por conta disso, diversas abordagens têm sido desenvolvidas para tratar a obesidade, sendo dietas balanceadas e atividades físicas as mais recomendadas. Entretanto, um dos maiores problemas encontrados hoje diz respeito a propensão que o organismo apresenta em adquirir de volta o peso perdido uma vez que os procedimentos utilizados para a perda de peso são parados. Uma característica que precisa ser levada em consideração é que homens e mulheres podem responder fisiologicamente de maneira diferente frente um mesmo tratamento. Assim, torna-se imperativo conhecer os mecanismos específicos que atuam de maneira a realizar a manutenção do peso corporal e a homeostase energética em ambos os sexos. Para testar a hipótese de que os circuitos neurais que regulam o balanço energético apresentam características sexualmente distintas, avaliamos camundongos machos e fêmeas em situações de balanço energético negativo, balanço energético positivo, bem como na responsividade a hormônios envolvidos na manutenção da homeostase energética. Nossos resultados mostraram que as fêmeas apresentam proteção contra os efeitos da restrição calórica. Vimos também que os machos são mais suscetíveis aos desbalanços metabólicos e glicêmicos causados por alimentação rica em gordura. As fêmeas apresentaram maior sensibilidade à leptina, resistência a grelina e baixa secreção de GH estimulada pela grelina. A ativação neuronal mediada pela grelina, leptina e por situação de jejum não apresentaram dimorfismo sexual. Em conjunto, nossos resultados demonstram que machos e fêmeas são diferentemente afetados por determinadas condições energéticas e apresentam distinta responsividade hormonal, embora a ativação neuronal seja a mesma entre os sexos. Com isso, mais pesquisas visando o desenvolvimento de terapias específicas para cada sexo podem ser boas opções para o tratamento de doenças como a obesidade.

Palavras-chave: Dimorfismo sexual. Obesidade. Dietas. Grelina. Hipotálamo

ABSTRACT

SOUZA, G.O. Evaluation of sexual dimorphism in the central regulation of energy metabolism in mice. 2020. – 81p. Dissertation (Master in Science) Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

Maintaining an "ideal" body weight today is one of the biggest challenges facing men and women. We are currently experiencing an obesity epidemic that has caused reduction in life quality and high mortality rates in all age groups. Several approaches were developed to treat obesity, with balanced diets and physical exercises being the most recommended. However, one of the biggest problems is the propensity to regain all the lost weight once treatments for weight loss stopped. It is noteworthy that men and women may present different physiological responses to the same treatment. Hence, it is important to know the specific mechanisms that regulates body weight and energy homeostasis in both sexes. With this in mind, to test the hypothesis that neural circuits regulating energy metabolism are sexually dimorphic, we evaluated male and female mice under negative and positive energy balance. Neuronal responsiveness to hormones involved in energy homeostasis maintenance, such as leptin and ghrelin, was also investigated. Our results show female mice are protected from caloric restriction effects, since they are more resistant to weight loss and have a faster recovery compared to male mice. Males are more susceptible to the metabolic and glycemic imbalances caused by high fat diet. Female mice display higher leptin sensitivity, ghrelin resistance and lower growth hormone secretion induced by ghrelin. Neuronal activation induced by ghrelin, leptin or 24 hours fasting were not different between sexes. Taken together, our results demonstrate that male and female mice are differentially affected by some energetic conditions and have different hormonal responsiveness. However, neuronal activation induced by hormones or 24h fasting does not show sexual dimorphism. Thus, development of specific therapies for each sex could be beneficial for treatment of obesity, increasing therapeutic efficacy.

Key-words: Sexual dimorphism. Obesity. Diets. Ghrelin. Hypothalamus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	1. C)imorfismos se	xuais na	homeos	tase metal	bólica	e na doen	ça	19
Figura	2.	Manutenção	do pe	so corpo	oral durar	ite a	restrição	alimentar	е
		realimentação)						42
Figura	3. C	composição co	rporal d	irante a r	estrição a	liment	ar e realim	entação	43
Figura	4. A	companhamer	nto glicê	mico e re	sposta hip	erfági	ca		44
Figura	5. C	Consumo de ox	igênio d	urante a	restrição a	limen	tar e realim	nentação	45
Figura	6. A	tividade ambu	latória d	urante a	restrição a	liment	tar e realim	entação	46
Figura	7. C	Coeficiente resp	oiratório	durante a	a restrição	alime	ntar e reali	mentação	47
Figura	8. V	ariação no pe	so corpo	ral duran	te consum	io con	n dieta hipe	erlipídica	48
Figura	9. C	composição co	rporal d	irante co	nsumo coi	n diet	a hiperlipíd	lica	49
Figura	10.	Consumo alim	entar du	rante cor	nsumo de	dieta ł	niperlipídica	a	50
Figura	11.	Consumo de o	xigênio,	atividade	e ambulató	ria e c	onsumo hí	drico duran	ite
		consumo de c	lieta hip	erlipídica					50
Figura	12.	Testes glicêmi	cos dura	ante alime	entação co	om die	ta padrão (e HFD	51
Figura	13.	Dosagem de le	eptina se	erica anin	nais em di	eta pa	drão e HFI	D	54
Figura	14.	Teste de sensi	ibilidade	a leptina	l				54
Figura	15.	Teste de sensi	ibilidade	a grelina	۱				56
Figura	16.	Capacidade de	e secreç	ão de GH	l estimula	da pel	a grelina		56
Figura	17.	Ativação neuro	onal indu	ızida por	24 horas o	de jeju	m		57
Figura	18.	Ativação neuro	onal indu	izida pela	a grelina				58
Figura	19.	Ativação neuro	onal indu	izida pela	a leptina				59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

 α - Alfa

- α-MSH Hormônio estimulador de melanócito alfa
- β Beta

γ – Gama

AgRP – Proteína relacionada ao Agouti

AgRP/Tom – Modelo animal que apresenta expressão da proteína fluorescente tdTomato

exclusivamente nos neurônios AgRP

- ARH Núcleo arqueado do hipotálamo
- AVPV Núcleo periventricular anteroventral

CART - Transcrito regulado por cocaína e anfetamina

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

c-fos - Marcador natural de ativação neuronal

CLAMS – Equipamento de calorimetria indireta (do Inglês "*Comprehensive Lab animal monitoring System*")

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Cre – enzima Cre recombinase

DAB - diaminobenzidina

DMH - Núcleo dorsomedial do hipotálamo

 $E_2 - 17\beta$ -estradiol

- $ER\alpha Receptor para estrógeno tipo \alpha$
- ERβ Receptor para estrógeno tipo β
- GABA ácido gama-aminobutírico
- GH Hormônio do crescimento
- GHSR Receptor secretagogo do hormônio do crescimento
- GnRH Hormônio liberador de gonadotrofinas
- GTT Teste de tolerância a glicose
- H₂O₂ Peróxido de hidrogênio
- HCI Ácido clorídrico
- HFD Dieta hiperlipídica

- i.p. injeção intraperitoneal
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- icv injeção intracerebroventricular
- IMC Índice de Massa Corpórea
- IR Receptor para insulina
- ITT Teste de sensibilidade a insulina
- JAK2 Proteína Janus quinase 2
- KPBS Tampão fosfato de potássio
- KPBS-T Tampão fosfato de potássio com Triton X
- LepR (Ob-Rb) Receptor para leptina
- LepR/Tom Modelo animal que apresenta expressão da proteína fluorescente tdTomato
- exclusivamente nos neurônios AgRP
- MC4R Receptor para melanocortina tipo 4
- mGH GH de camundongo
- mRNA RNA mensageiro
- NIH Instituto Nacional da Saúde (do Inglês "National Institute of Health)
- NPY Neuropeptídeo Y
- NTS Núcleo do trato solitário
- OVX Fêmeas ovarectomizadas
- PBS Tampão fosfato-salino
- PBS-T Tampão fosfato-salino com Tween-20
- POMC proopiomelanocortina
- pSTAT3 forma fosforilada do STAT3
- PVH Núcleo paraventricular do hipotálamo
- R.A. Restrição Alimentar
- RER Coeficiente respiratório
- SDS = Dodecil sulfato de sódio
- SNC Sistema nervoso central
- STAT3 Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
- TAB Tecido adiposo branco
- TAM Tecido adiposo marrom

- TH Tirosina Hidroxilase
- TRH Hormônio liberador de tireotrofina
- VCO₂ Produção de gás carbônico
- VMH Núcleo Ventromedial do hipotálamo
- VO₂ Consumo de oxigênio

SUMÁRIO

1	INT	ROD	UÇÃO	.16
	1.1	O di	imorfismo sexual está presente em diversos aspectos da fisiologia	.17
	1.2 distint	Hipo a?	otálamo e a regulação neural da ingestão alimentar: regulação sexualmente	.19
	1.3 distint	Sina as	alizadores adipostáticos: possíveis determinantes de respostas sexualmente	.22
	1.3.	1	Leptina	.22
	1.3.	2	Insulina	.24
	1.3.	3	Estrógenos	.25
	1.3.	4	Grelina	.27
2	JUS	STIFI	CATIVA	.29
3	OB.	JETI	VO	.30
	3.1	Obje	etivos específicos	.30
4	MA	TERI	AL E MÉTODOS	.31
	4.1	Anir	nais	.31
	4.1.	1	C57BL/6	.31
	4.1.	2	AgRP/Tomato	.31
	4.1.	3	LepR/Tomato	.32
	4.2 e sua	Cara recu	acterização dos efeitos metabólicos e glicêmicos induzidos pela restrição aliment peração	tar 32
	4.3 (HFD)	Ava	liação da predisposição à obesidade induzida pelo consumo de dieta hipercalório	са .33
	4.4	Ava	liação do perfil glicêmico de machos e fêmeas	.34
	4.5	Res	posta aguda à hormônios reguladores da ingestão alimentar	.34
	4.5.	1	Teste de sensibilidade à grelina	.34
	4.5.	2	Teste de sensibilidade à leptina	.35
	4.6	Aná	lise da secreção de GH estimulada pela grelina	.35
	4.7	Ava	liacão histológica neuronal	.37
	4.7.	1	Caracterização da ativação neuronal hipotalâmica induzida pelo jejum	.37
	4.7.	2	Caracterização da responsividade neuronal à leptina	.37
	4.7.	3	Avaliação do número de células responsivas à grelina no hipotálamo	.37
	4.7.	4	Microtomia	.37

4.7.5		5 Reação de Imuno-histoquímica
	4.8	Coleta de tecidos sem perfusão40
	4.9	Dosagem hormonal41
	4.10	Análise Estatística41
5	RES	SULTADOS
	5.1 restriti	Fêmeas apresentam proteção contra perda de peso durante condição energética iva42
	5.2 pela d	Machos são mais suscetíveis aos desbalanços metabólicos e glicêmicos induzidos lieta hiperlipídica47
	5.3 macho	Fêmeas apresentam maior sensibilidade às ações agudas da leptina do que os os53
	5.4	Fêmeas são mais resistentes às ações da grelina54
	5.5	Fêmeas apresentam baixa capacidade secretora de GH mediada pela grelina55
	5.6	Ativação neuronal no ARH induzida por jejum não apresenta dimorfismo sexual56
	5.7	Ativação neuronal no ARH induzida pela grelina não apresenta dimorfismo sexual57
	5.8 sexua	Ativação neuronal hipotalâmica mediada pela leptina não apresenta dimorfismo I58
6	DIS	CUSSÃO
7	CO	NCLUSÃO
R	EFERÉ	ÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Α	PÊND	ICE: ATA DA DEFESA

1 INTRODUÇÃO

Atualmente um problema crescente e preocupante para a sociedade moderna são os altos índices de incidência da obesidade (Hossain *et al.*, 2007). O desenvolvimento dessa doença atingiu níveis alarmantes no mundo inteiro, aumentando principalmente entre os adolescentes, embora os índices em crianças e adultos também tenha crescido (Ford *et al.*, 2014). Um censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2013, mostrou que cerca de 59,6% dos brasileiros adultos apresentavam sobrepeso (índice de massa corpórea [IMC] \geq 25kg/m²), sendo que desse total, aproximadamente 20,8% eram indivíduos obesos (IMC \geq 30 kg/m²).

A obesidade apresenta alto risco à saúde humana não apenas pelo excessivo acúmulo de gordura no organismo, mas também por propiciar o rápido desenvolvimento de outras comorbidades, como problemas cardiovasculares, diabetes, síndrome metabólica e alguns tipos de câncer, que quando somados, diminuem drasticamente a qualidade e expectativa de vida humana (Cummings and Schwartz, 2003; Roberts *et al.*, 2010). A relação entre o desenvolvimento dessas comorbidades e a obesidade é bem estabelecida nos homens, entretanto, não é bem caracterizada nas mulheres, sendo os mecanismos responsáveis por influenciar essas características distintas entre os sexos pouco compreendidos (Palmer and Clegg, 2015).

Sendo a obesidade caracterizada por progressivo acúmulo de adiposidade, decorrente principalmente por situações prolongadas de ingestão calórica superior ao gasto energético do organismo, diversos fatores são capazes de influenciar diretamente o seu desenvolvimento. Esses fatores podem ser tanto genéticos, ambientais ou sociais, como por exemplo a educação alimentar e a condição econômica (French *et al.*, 2001; Brantley *et al.*, 2005). Entretanto, acredita-se que os fatores genéticos sejam responsáveis pela maior parte da variabilidade do IMC (Ravussin and Bogardus, 2000). Devido à interação desse conjunto de fatores, torna-se difícil determinar com precisão se existem diferenças fisiológicas que propiciam o ganho de peso entre homens e mulheres (Palmer and Clegg, 2015).

1.1 <u>O dimorfismo sexual está presente em diversos aspectos da fisiologia</u>

Naturalmente, na maior parte das espécies de mamíferos existem diferenças na aparência física de machos e fêmeas, com o tamanho corporal sendo uma das características com distinções mais marcantes. Na maior parte dos casos, os machos sendo claramente maiores do que as fêmeas (Rosenfeld, 2004).

Se pensarmos em uma origem primária para essas diferenças entre os sexos, é bem estabelecido que existe um efeito direto dos cromossomos sexuais X e Y não apenas para o desenvolvimento das características fenotípicas, como também sobre a função celular do organismo masculino e feminino (Mauvais-Jarvis, 2015). Por exemplo, o cromossomo Y atuaria acelerando o metabolismo celular da glicose e o crescimento. Dessa forma, embriões XY apresentariam maior taxa metabólica e desenvolvimento mais rápido em relação a embriões XX. Com isso, papel importante seria atribuído a esses cromossomos para programar diferenças sexuais na regulação metabólica (Mauvais-Jarvis, 2015).

Nesse contexto, uma variável importante que precisaria ser levada em consideração é que o fator sexo pode afetar a fisiopatologia, prevalência e sintomas de diversas doenças. Essas diferenças sexuais representam uma característica de fundamental importância tanto na fisiologia quanto na doença pois representam fatores biológicos relacionados ao sexo que podem levar ao desenvolvimento de melhores tratamentos para as patologias (Mauvais-Jarvis, 2018).

Em humanos sabe-se que a composição corporal apresenta diferença significativa entre os sexos, com os homens possuindo geralmente mais massa magra muscular do que as mulheres, enquanto estas apresentam mais tecido adiposo (Wells, 2007). Esse dimorfismo sexual começa a aparecer logo no início da vida, mas torna-se mais proeminente a partir da puberdade, quando as mulheres passam a desenvolver mais massa adiposa e os homens mais massa magra (Wells, 2007).

Também é possível notar a partir desse período do desenvolvimento que o local de armazenamento dos estoques energéticos no tecido adiposo branco (TAB) difere entre os sexos. O TAB é dividido em subcutâneo ou visceral (Björntorp, 1997). O organismo das mulheres armazena a massa gorda preferencialmente nos depósitos subcutâneos, sendo os quadris, coxas e glúteos os principais locais para esse

armazenamento. Esse padrão de armazenamento confere às mulheres a forma corpórea de "pera" ou padrão ginóide (Enzi *et al.*, 1986; Palmer and Clegg, 2015). Por outro lado, o organismo dos homens armazena mais gordura nos depósitos viscerais, principalmente na região intra-abdominal, o que confere ao homem a forma corporal de "maçã" ou padrão androide (Enzi *et al.*, 1986; Palmer and Clegg, 2015).

Interessantemente o padrão ginóide das mulheres é defendido somente até a menopausa. Com o início desse período, o organismo das mulheres passa a armazenar gordura nos mesmos depósitos viscerais que os homens (Gambacciani *et al.*, 1997; Palmer and Clegg, 2015). Esses efeitos estão associados com a diminuição dos níveis circulantes de estrógenos, o que demonstra a importância dos hormônios sexuais para a manutenção da adiposidade nas mulheres (Lee *et al.*, 2009; Brown and Clegg, 2010).

Por conta dessa distribuição distinta, homens e mulheres podem ser diferentemente afetados pela obesidade. A deposição de gordura nos depósitos viscerais, como acontece nos homens, apresenta maior relação com o surgimento das comorbidades associadas a obesidade (Wajchenberg, 2000), uma vez que esse depósito é fonte de citocinas pró-inflamatórias que auxiliam no desenvolvimento da resistência à insulina (Trayhurn, 2005; Shulman, 2014). Esse tecido adiposo também é relativamente insensível à insulina, o que torna a ação desse hormônio prejudicada em indivíduos com obesidade visceral (Carey *et al.*, 1996). Por outro lado, o acúmulo de gordura nos depósitos subcutâneos caracteriza baixa mortalidade relacionada à diabetes bem como de problemas cardiovasculares (Van Pelt *et al.*, 2002). Com isso, fica claro que o desenvolvimento das comorbidades associadas a obesidade são mais decorrentes nos homens do que nas mulheres, embora elas se tornem mais propicias a desenvolver essas complicações quando chegam na menopausa e o padrão de adiposidade é alterado (Figura 1).



Figura 1. Dimorfismos sexuais na homeostase metabólica e na doença. O painel esquerdo representa os machos e o painel direito representa as fêmeas. Abreviações: ARH POMC = neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo que expressam a proopiomelanocortina; TAB = tecido adiposo branco; TAM = tecido adiposo marrom (Adaptado de (Mauvais-Jarvis, 2015)

Para que o peso e a composição corporal sejam mantidos dentro de um *set point* considerado ideal para o organismo, diversos mecanismos existem para perceber alterações no balanço energético e iniciar respostas que visam regular aspectos envolvidos na manutenção do peso corporal, tais como a ingestão alimentar e gasto energético. Dentre os principais reguladores do balanço energético, destaque é dado para o hipotálamo.

1.2 <u>Hipotálamo e a regulação neural da ingestão alimentar: regulação</u> <u>sexualmente distinta?</u>

O hipotálamo está localizado no diencéfalo e permite a conexão entre o sistema nervoso e o sistema endócrino por meio da glândula hipófise. É capaz de receber e integrar informações do ambiente, dos sistemas periféricos e de regiões cerebrais superiores, o tornando capaz de desempenhar papel importante na regulação da homeostasia. O hipotálamo também desempenha papel importante para o controle da homeostase glicêmica, sendo um alvo promissor para o desenvolvimento de terapias farmacológicas visando o tratamento de diversas doenças metabólicas (Donato, 2012)

O hipotálamo é uma das regiões cerebrais mais sexualmente distintas tanto anatomicamente quanto funcionalmente (Swaab and Fliers, 1985; Hofman and Swaab, 1989; Panzica and Melcangi, 2016). Dentre essas regiões, as mais bem caracterizadas são aquelas envolvidas no controle da reprodução e do comportamento sexual. Por exemplo, um sistema peptidérgico que é fortemente distinto entre os sexos é o sistema da kisspeptina. Esse sistema é caracterizado por duas populações neuronais: uma localizada no núcleo periventricular anteroventral (AVPV) e outra no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH). Esses neurônios se projetam principalmente para os neurônios que produzem o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que controlam a secreção das gonadotrofinas pela hipófise (Dungan *et al.*, 2006). Foi mostrado que esse sistema apresenta maior densidade de fibras e neurônios kisspeptinas nas fêmeas do que nos machos (Kauffman *et al.*, 2007).

Além das diferenças no número de células e fibras, a funcionalidade desses neurônios também pode ser divergente. A ativação de neurônios tirosina hidroxilase (TH) no AVPV das fêmeas é responsável por promover o comportamento maternal, enquanto nos machos a ativação dessa mesma população neuronal não apresenta efeitos no comportamento parental, mas caracteriza diminuição do comportamento agressivo para com outros machos (Scott *et al.*, 2015).

Embora diferenças entre machos e fêmeas tenham sido demonstradas no hipotálamo, pouco é conhecido sobre dimorfismos sexuais no controle central do metabolismo energético. A regulação desse aspecto envolve a integração de sinais nutricionais, hormonais e neurais no hipotálamo, sendo duas populações neuronais localizadas no ARH responsáveis por essa modulação.

Localizados lateralmente no ARH, os neurônios que co-expressam a proopiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) são os neurônios com efeitos anorexigênicos mais bem descritos no SNC, onde sua ativação é capaz de induzir a diminuição da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (Edwards *et al.*, 2000; Zhan *et al.*, 2013).

O neuropeptídeo POMC é clivado em subprodutos, sendo um deles o hormônio estimulador de melanócito α (α-MSH) (Krude *et al.*, 1998; Yaswen *et al.*, 1999). O α-MSH é capaz de atuar em neurônios localizados no núcleo paraventricular do

hipotálamo (PVH) que expressam o receptor para melanocortina 4 (MC4R) e possuem efeitos anoréticos (Shah *et al.*, 2014). A ação agonista do α-MSH sobre esses receptores possibilita maior estímulo dos sinais anorexigênicos, levando à diminuição da ingestão alimentar, aumento do gasto energético e alterações no metabolismo da glicose (Parton *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2014). Camundongos deficientes do MC4R apresentam hiperfagia e obesidade (Huszar *et al.*, 1997).

Em ambos os sexos a perda da expressão dos neurônios POMC no hipotálamo é responsável por aumento do consumo alimentar e diminuição do gasto energético com consequente aumento da adiposidade. Curiosamente, esses dois últimos efeitos sendo mais efetivos nas fêmeas do que nos machos (Burke *et al.*, 2016). Também já foi demonstrado que o hipotálamo das fêmeas apresenta maior abundância de projeções dos neurônios POMC e mais mRNA para esse neuropeptídeo, o que poderia estar relacionado com o menor consumo alimentar observado em fêmeas (Nohara *et al.*, 2011).

Enquanto os neurônios POMC/CART geram sinais anorexigênicos, os neurônios que co-expressam a proteína relacionada ao Agouti (AgRP) e o neuropeptídeo Y (NPY) estão localizados na porção ventromedial do ARH e representam a população neuronal responsável por ocasionar aumento do consumo alimentar e diminuição no gasto energético, dessa maneira auxiliando na conservação de energia e do peso corporal (Gropp *et al.*, 2005). O peptídeo AgRP liberado pela ativação desses neurônios atua como antagonista do MC4R, assim bloqueando os efeitos do α-MSH, ao passo que o NPY regula a atividade neuronal atuando em receptores Y (Gropp *et al.*, 2005; Luquet *et al.*, 2005). Esses neurônios também apresentam ação inibitória direta sobre os neurônios POMC, por meio de liberação sináptica de ácido γ amino-butírico (GABA) (Tong *et al.*, 2008).

Diferentemente dos neurônios POMC que atuam por meio da cascata de sinalização da melanocortina para induzir efeitos na ingestão alimentar e no gasto energético, os neurônios AgRP/NPY são capazes de modular esse comportamento de maneira independente dessa via, uma vez que os efeitos desses neurônios não são prejudicados pela deleção dos MC4Rs (Krashes *et al.*, 2011).

Sabe-se que a expressão de NPY é sexualmente distinta em roedores adultos, com os machos possuindo expressão maior de mRNA para esse peptídeo no ARH (Urban

et al., 1993). Em humanos, também foi sugerido que disfunções no sistema AgRP/NPY podem estar mais relacionadas com o desenvolvimento de problemas metabólicos como diabetes tipo 2 em homens (Campbell *et al.*, 2007).

Por outro lado, em roedores, aparentemente as fêmeas são mais sensíveis a manipulações do sistema AgRP/NPY. Em camundongos C57B1/J6 foi sugerido que a expressão de AgRP é maior nas fêmeas (Lensing *et al.*, 2016) e elas apresentam maior redução do gasto energético em resposta ao AgRP, embora a redução inicial seja mais rápida nos machos (Goodin *et al.*, 2008).

Essas duas populações neuronais estão anatomicamente localizadas próximas à eminência mediana, o que possibilita sua rápida ativação por fatores presentes na circulação que são capazes de transmitir para o SNC o estado energético do organismo (Schwartz *et al.*, 2000; Woods and Seeley, 2000).

1.3 <u>Sinalizadores adipostáticos: possíveis determinantes de respostas</u> <u>sexualmente distintas</u>

Dentre os fatores que regulam o metabolismo energético, merecem destaque os hormônios leptina, insulina e os esteroides sexuais (Schwartz *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1994; Brown and Clegg, 2010). Ainda, outro hormônio que vem ganhando bastante atenção por conta de seus efeitos sobre o balanço energético é a grelina (Wang *et al.*, 2014; Al Massadi *et al.*, 2017). Foi demonstrado a existência de dimorfismo sexual em relação as concentrações séricas desses hormônios, o que pode sinalizar que a mensagem que é transmitida para o SNC a respeito do balanço energético pode ser diferente entre os sexos e consequentemente pode coordenar mecanismos distintos para a regulação central do metabolismo energético.

1.3.1 Leptina

A leptina é um hormônio secretado pelos adipócitos em proporção direta com a adiposidade corporal, sendo o principal marcador dos estoques energéticos do organismo (Considine *et al.*, 1996). Assim, dentre suas funções, a principal é a de informar para o cérebro a condição energética do nosso corpo, coordenando funções como ingestão alimentar e gasto energético. A leptina também apresenta importante ação

na modulação da homeostase e dos eixos neuroendócrinos (Ramos-Lobo and Donato, 2017).

Os efeitos da leptina ocorrem por meio da ativação do seu receptor cognato, o LepR (também denominado Ob-Rb) (Bjørbaek *et al.*, 1997), que está presente em diversos tecidos periféricos e amplamente distribuído no SNC. De maneira simplista, quando a leptina ativa o seu receptor, ocorre recrutamento da proteína Janus quinase 2 (JAK2), que promove fosforilação de resíduos tirosina do LepR. A principal via de sinalização ativada nesse processo é a do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) (Vaisse *et al.*, 1996; Bates *et al.*, 2003), que após fosforilado (pSTAT3), migra para o núcleo celular e regula a transcrição gênica.

Sendo um hormônio responsável por informar o cérebro dos estoques energéticos, os efeitos induzidos pela ação da leptina ocorrem de maneira mais robusta em situações na qual a adiposidade pode sofrer rápidas alterações. É o que ocorre por exemplo em situações de jejum ou restrição calórica. Durante esses momentos, os níveis de leptina diminuem intensivamente (Leibel, 2002). Essa rápida redução promove alterações significativas no metabolismo e nos eixos neuroendócrinos que visam economizar energia para garantir a sobrevivência durante o período de escassez alimentar (Ramos-Lobo and Donato, 2017).

Com isso, através da integração de sinais nos neurônios do ARH essa diminuição da leptina circulante irá promover a procura por alimento, de maneira a restaurar os estoques energéticos (Belgardt and Brüning, 2010). Isso ocorre pois os neurônios AgRP que naturalmente estariam inibidos pela leptina, perdem esse tônus inibitório, podendo assim induzir a sensação de fome (Takahashi and Cone, 2005; Belgardt and Brüning, 2010). Concomitantemente, a redução nos níveis de leptina também previne a estimulação dos neurônios POMC, o que aumentaria a sensação de fome (Cowley *et al.*, 2001).

Além de efeitos na ingestão alimentar, a leptina também é capaz de afetar o gasto energético. Atuando em neurônios no núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH), a leptina promove o aumento do tônus simpático que é enviado ao tecido adiposo marrom (TAM), aumentando a termogênese (Enriori *et al.*, 2011). Animais com deleção do LepR nos neurônios do DMH são obesos, apresentam baixo gasto energético e diminuição da resposta termogênica (Rezai-Zadeh *et al.*, 2014). Ainda, a leptina pode influenciar o gasto energético por mecanismos neuroendócrinos através de ações nos neurônios TRH do PVH, afetando a função tireoidiana. Em situações de restrição calórica, por exemplo, a diminuição da leptina ocasiona supressão dos neurônios TRH, assim afetando a ação dos hormônios tireoidianos e economizando energia (Ahima *et al.*, 1996).

Estudos da literatura mostram que as concentrações circulantes de leptina são distintas entre os dois sexos. Isso pode acarretar em diferenças em relação à sensibilidade à leptina e pode estar relacionado com o diferenciado padrão de estocagem adiposa. Além de possuírem relativamente mais leptina circulante pelo fato de possuírem mais massa adiposa total, é sugerido que as fêmeas podem possuir maior sensibilidade central às ações da leptina em relação aos machos (Clegg *et al.*, 2003).

1.3.2 Insulina

A insulina é um dos principais hormônios anabólicos do organismo, sendo secretada pelas células β pancreáticas frente ao aumento da glicose circulante. É responsável por exercer diversas ações metabólicas, neuroendócrinas e neurotróficas, onde também foi descrito que também possui papel na regulação do peso corporal e da ingestão alimentar através de ação no SNC (Morton *et al.*, 2006; Pliquett *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2014).

As ações da insulina no SNC ocorrem por meio da ativação dos seus receptores específicos (IR) que estão distribuídos em padrões distintos em diversas regiões cerebrais, tais como o bulbo olfatório, córtex cerebral, hipotálamo e cerebelo, por exemplo (Schulingkamp *et al.*, 2000). Por meio desses receptores hipotalâmicos, a insulina é capaz de regular o peso corporal por meio de mecanismos semelhantes aos da leptina (Schwartz *et al.*, 2000; Belgardt and Brüning, 2010). Assim, a insulina atua promovendo excitação dos neurônios POMC e inibição dos neurônios AgRP, o que proporciona aumento dos sinais anorexigênicos, levando a diminuição da ingestão alimentar (Belgardt and Brüning, 2010; Qiu *et al.*, 2014). Administração intracerebroventricular (icv) de insulina promove expressão de c-fos nos neurônios POMC e diminuição do consumo alimentar (Qiu *et al.*, 2014). Com isso, por meio de ação hipotalâmica, a insulina é capaz

de induzir anorexia e perda de peso, enquanto a inibição da sua sinalização no hipotálamo gera efeito oposto (Obici *et al.*, 2002)

Assim como ocorre com a leptina, foi demonstrado que o cérebro dos machos apresenta maior sensibilidade às ações da insulina, além do fato de os machos apresentarem concentrações circulantes de insulina maior do que as fêmeas (Clegg *et al.*, 2003). Foi sugerido também que os níveis de andrógenos e de estradiol poderiam influenciar nessa sensibilidade central à insulina, uma vez que quando o organismo possui proporcionalmente menos estrógeno, ocorreria favorecimento dessa sensibilidade à insulina (Clegg *et al.*, 2006).

1.3.3 Estrógenos

Os estrógenos representam os principais hormônios sexuais femininos, cuja secreção pelas gônadas está sobre o controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Blaustein, 2008). O principal estrógeno é o 17β-estradiol (E2), que além de apresentar maior nível circulante, está envolvido em diversas funções fisiológicas, tais como o crescimento, desenvolvimento e principalmente na reprodução (Blaustein, 2008).

Além das ações clássicas, a adiposidade também pode ser modulada pelo estradiol (Gong *et al.*, 1989; Björntorp, 1997). A adiposidade visceral varia inversamente de acordo com os níveis de E2 (Björntorp, 1997), o que confere certa proteção às mulheres. Quando existe diminuição das concentrações séricas desse hormônio, como durante a menopausa, o padrão de adiposidade nas mulheres é alterado (Gambacciani *et al.*, 1997; Woods *et al.*, 2003). Com isso, o organismo feminino passa a armazenar gordura principalmente nos depósitos viscerais (Gambacciani *et al.*, 1997). Esses efeitos de ganho de peso e hiper adiposidade também podem ser vistos em fêmeas ovarectomizadas (OVX) (Clegg *et al.*, 2006). Tratamento com E2, mas não com progesterona, é capaz de prevenir esses efeitos obesogênicos (Schwartz and Wade, 1981), demonstrando assim importante papel protetor do estradiol.

O peso corporal e a distribuição da adiposidade são regulados pelo estrógeno através dos seus receptores nucleares, o receptor de estrógeno- α (ER α) e - β (ER β) (Brown and Clegg, 2010). Dentre esses receptores, o ER α é o principal para as ações do estradiol sobre o metabolismo energético, enquanto o ER β aparentemente funciona mais como um modulador das ações estrogênicas (Brown and Clegg, 2010). Fêmeas com

deleção global do ERα apresentam aumento de adiposidade devido a hiperfagia e baixo gasto energético (Heine *et al.*, 2000). Camundongos machos com deleção do ERα no cérebro apresentam desenvolvimento de obesidade modesta, o que sugere o papel desse receptor na regulação do peso corporal e adiposidade em ambos os sexos (Heine *et al.*, 2000).

Diversas áreas cerebrais envolvidas na regulação do comportamento alimentar expressam ERα, como por exemplo o ARH, o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) e núcleo do trato solitário (NTS) (Merchenthaler *et al.*, 2004). Nessas áreas as fêmeas apresentam maior expressão do ERα do que os machos, sugerindo um importante dimorfismo sexual (Cao and Patisaul, 2011). No ARH, cerca de 20-30% dos neurônios POMC expressam o ERα (De Souza *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011). Fêmeas com deleção do ERα nesses neurônios desenvolvem hiperfagia e ganho de peso modesto, enquanto machos com essa mesma deleção não apresentam nenhuma alteração de fenótipo (Xu *et al.*, 2011).

Administração de E2 diretamente no VMH de ratas é capaz de promover termogênese (Martínez De Morentin *et al.*, 2014). A deleção genética do ERα nesse núcleo induz obesidade nas fêmeas principalmente por mudanças no gasto energético ao invés de afetar o consumo alimentar, mas não afeta a homeostase energética nos machos (Musatov *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2011). Esses resultados indicam que o ERα nos neurônios POMC e no VMH contribuem para diferenças na regulação do peso corporal entre machos e fêmeas.

Os efeitos dos estrógenos sobre a ingestão alimentar também foram demonstrados por meio de experimentos com ratas submetidas à ovarectomia, onde estas apresentaram diminuição da produção de estrógenos e aumento sutil no consumo alimentar e no peso corporal (Asarian and Geary, 2002; Clegg *et al.*, 2006). Também foi proposto que os efeitos do estrógeno em modular o consumo alimentar ocorreria por meio de interação com outros peptídeos importantes para a regulação do consumo alimentar (Brown and Clegg, 2010). Por exemplo, para diminuir a ingestão alimentar, o estradiol pode atuar nos seus receptores no hipotálamo diminuindo a liberação e expressão de NPY (Wade *et al.*, 1985; Bonavera *et al.*, 1994). Deficiência de estradiol, por outro lado, resulta em aumento da expressão de NPY no PVH assim como aumento da expressão

de mRNA para NPY no ARH (Pelleymounter *et al.*, 1999; Ainslie *et al.*, 2001). Também, já foi mostrado que o estradiol atua diminuindo os sinais orexigênicos da grelina (Clegg *et al.*, 2007).

Os neurônios que expressam ERα estão localizados em diversos núcleos hipotalâmicos que também expressam o LepR, por isso inicialmente foi proposto que os neurônios que expressavam ERα também expressavam o LepR (Diano *et al.*, 1998). Entretanto, trabalhos mais recentes mostraram que a co-localização entre esses receptores no hipotálamo é baixa e restrita a alguns núcleos, como no ARH (28% de co-localização apenas) e tende a diminuir após a remoção das gonadas (Da Silva *et al.*, 2014). Ainda, as áreas que apresentavam grande co-localização são relacionadas com a regulação do eixo gonadal, enquanto nas regiões hipotalâmicas envolvidas com a homeostase energética, a co-localização foi mínima (Kim *et al.*, 2016). Esses trabalhos demonstram que a interação entre esses receptores não é necessária para os efeitos dos estrógenos em modular a homeostase energética.

1.3.4 Grelina

A grelina é produzida por células enteroendócrinas presentes na mucosa gástrica oxíntica e atua como um potente estimulador da secreção de GH (Kojima *et al.*, 1999; Wren *et al.*, 2001). Além disso, a grelina possui importante ação no metabolismo energético, sendo um dos poucos hormônios capazes de induzir a ingestão alimentar bem como aumentar a adiposidade (Tschöp *et al.*, 2000; Nakazato *et al.*, 2001). As ações da grelina para modular o comportamento alimentar, adiposidade e homeostase da glicose se dão principalmente através do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHSR), que é abundantemente expresso no hipotálamo (Guan *et al.*, 1997), principalmente nos neurônios AgRP/NPY (Zigman *et al.*, 2006).

Quando os neurônios AgRP são ativados pela grelina, ocorre expressão de c-fos, aumento da transcrição de neuropeptídios orexigênicos como AgRP e NPY, bem como os neurônios AgRP são despolarizados (Hewson and Dickson, 2000; Nakazato *et al.*, 2001; Lawrence *et al.*, 2002; Cowley *et al.*, 2003). Nos neurônios POMC, a grelina atua indiretamente gerando hiperpolarização e inativação da sua atividade, principalmente pela liberação de GABA mediada pela ativação dos neurônios AgRP (Cowley *et al.*,

2003). Ainda, a grelina também atua inibindo a secreção de α-MSH (Cowley *et al.*, 2003), dessa maneira possibilitando sinais orexigênicos mais potentes.

As condições metabólicas do organismo, assim como para outros hormônios, também são necessárias para regular as ações da grelina sobre a homeostase energética (Briggs and Andrews, 2011). Por exemplo, em animais com obesidade induzida por dieta, foi visto que a grelina periférica não consegue aumentar o consumo alimentar (Perreault *et al.*, 2004), bem como os circuitos do apetite relacionados com os neurônios AgRP são prejudicados (Bouret *et al.*, 2008). Um estudo demonstrou que em situação de balanço energético positivo, ocorre resistência à grelina, causada tanto por incapacidade da grelina em ativar os neurônios AgRP no ARH como em estimular a liberação de peptídeos em alvos sinápticos em outros núcleos hipotalâmicos (Andrews, 2011; Briggs *et al.*, 2011). Por outro lado, em situação de privação energética tais como jejum, má nutrição e anorexia nervosa, existe intensa liberação de grelina na circulação (Goldstein *et al.*, 2011; Mihalache *et al.*, 2016; Cabral *et al.*, 2017).

Similar à leptina e insulina, foi demonstrado que a ação da grelina no sistema nervoso de ratos machos e fêmeas ocorre de maneira diferente entre os sexos. Após tratar ratos machos, fêmeas intactas e fêmeas OVX com injeção intraperitoneal (i.p.) ou icv de grelina, foi visto que tanto nos machos como nas fêmeas OVX houve aumento no consumo alimentar em resposta à grelina, entretanto, as fêmeas intactas não apresentaram esse efeito. Mesmo aplicando doses distintas de grelina, as fêmeas intactas não tiveram aumento expressivo no consumo alimentar quando comparado com os outros dois grupos experimentais.

Nesse sentido, ficou demonstrado que a potência da grelina em estimular o consumo alimentar é menor em fêmeas intactas do que em machos ou fêmeas sem gônadas. De maneira a confirmar essa hipótese, as fêmeas OVX foram tratadas com estrógeno, e foi visto que a ação da grelina em estimular o consumo alimentar não estava mais presente (Clegg *et al.*, 2007). Assim, esse estudo demonstrou que as fêmeas não são responsivas às ações da grelina da mesma maneira que os machos e que os hormônios ovarianos estão envolvidos com esse eixo regulatório.

2 JUSTIFICATIVA

Fisiologicamente, o organismo dos homens e das mulheres podem apresentar características distintas no desenvolvimento e prevalência de doenças; assim como podem responder de maneira diferenciada à hormônios e medicamentos, o que acaba influenciando diretamente nas experimentações e testes clínicos (Lee, 2018). Por conta dessa questão, é imprescindível que o fator sexo seja considerado durante o desenvolvimento de pesquisas que visam melhorias à qualidade da saúde humana. Entretanto, até pouco tempo, esse pensamento não era realmente muito aplicado, tendo em vista que poucas pesquisas realmente utilizavam os dois sexos nos seus experimentos. Na grande maior parte dos trabalhos, havia predominância de experimentos com animais machos (Lee, 2018).

Recentemente, os *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos aprovaram políticas que requerem que os pesquisadores incluam nas suas pesquisas ambos os sexos, sendo essa inclusão um fator importante para a liberação de financiamento científico (Clayton and Collins, 2014). O fato de agências fomentadoras de pesquisa passarem a exigir a inclusão de machos e fêmeas nos projetos a serem financiados demonstra o quão importante é estudar os dimorfismos sexuais existentes nos circuitos que visam manter a nossa homeostase.

Com isso, devido à escassez de trabalhos científicos com fêmeas; bem como os diferentes níveis circulantes de hormônios reguladores do metabolismo energético e a diferenciada manutenção da composição corporal entre machos e fêmeas, achamos plausível estudar e identificar componentes sexualmente distintos envolvidos na circuitaria neural-hipotalâmica que regula o metabolismo energético e glicêmico de camundongos machos e fêmeas.

3 OBJETIVO

O principal objetivo desse trabalho consistiu em estudar como os mecanismos neurais e hormonais que regulam o peso corporal, o balanço energético e a glicemia podem apresentar características distintas entre os sexos.

3.1 Objetivos específicos

De maneira a atingir o objetivo do trabalho, propomos os seguintes objetivos específicos:

1. Comparar entre os sexos os efeitos induzidos por uma condição de balanço energético negativo (5 dias de restrição alimentar de 60%) e sua recuperação;

2. Comparar entre os sexos a predisposição à obesidade induzida pelo consumo de uma dieta hiperlipídica;

 Comparar entre machos e fêmeas o efeito induzido pelo jejum na expressão do marcador de ativação neuronal c-fos no ARH de camundongos;

4. Comparar entre machos e fêmeas o número de neurônios que são responsivos à leptina ou que expressam o receptor de leptina em diferentes núcleos hipotalâmicos;

5. Comparar entre machos e fêmeas o número de neurônios hipotalâmicos que são responsivos à grelina;

6. Estudar as diferenças entre machos e fêmeas na regulação glicêmica;

7. Comparar entre os sexos a sensibilidade aguda à hormônios envolvidos no controle da ingestão alimentar (leptina e grelina);

8. Avaliar entre os dois sexos a secreção de GH estimulada pela grelina

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes do NIH e com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para o cuidado e uso de animais de laboratório. Os experimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo número 73/2017).

Todos os animais utilizados foram mantidos em biotério com condições ambientais padrão, com ciclo claro/escuro de 12h/12h, temperatura de 21-23ºC, com acesso à água e ração *ad libitum*, exceto quando especificado.

4.1.1 C57BL/6

Camundongos selvagens C57BL/6 machos e fêmeas com 3 meses de vida foram utilizados para os experimentos *in vivo* e para experimentos histológicos com grelina.

4.1.2 AgRP/Tomato

Para a obtenção de animais que expressam a proteína fluorescente tdTomato somente em neurônios de interesse ao estudo, realizamos cruzamentos com dois modelos de animais geneticamente modificados por meio da tecnologia Cre-LoxP. Foram cruzados animais que expressam a enzima Cre recombinase condicionada ao promotor gênico dos neurônios AgRP (*Agrptm1(cre)Lowl/J*, The Jackson Laboratory) com outro modelo de animal geneticamente modificado chamado tdTomato-reporter (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}/J, The Jackson Laboratory). Esse segundo modelo possui um bloqueador de transcrição flanqueado por sítios LoxP que impede a expressão da proteína tdTomato. Quando cruzamos esses dois animais, a enzima Cre recombinase reconhece os sítios LoxP, removendo o bloqueador de transcrição e permitindo assim que a proteína tdTomato seja expressa.

Com isso geramos animais que expressam a proteína fluorescente tdTomato apenas nas células que expressam a enzima Cre, dessa maneira permitindo a visualização específica dos neurônios AgRP. Foram utilizados animais AgRP/Tomato machos e fêmeas com 3 meses de idade para experimentos histológicos.

4.1.3 LepR/Tomato

Outro modelo de animal geneticamente modificado que utilizamos são caracterizados por possuírem expressão da proteína fluorescente tdTomato somente nas células que expressam o receptor para leptina (LepR). Esses animais foram obtidos por meio do cruzamento de animais que possuem a enzima Cre recombinase condicionada ao promotor do gene do LepR (B6.129-Lepr^{tm2(cre)Rck}/J, The Jackson Laboratory) com o mesmo modelo geneticamente modificado tdTomato-reporter induzível por Cre citado anteriormente.

Desse cruzamento obtivemos animais que expressam a proteína tdTomato em todas as células que expressam o receptor para leptina (modelo *LepR/Tomato*). Foram utilizados animais LepR/Tomato machos e fêmeas com 3 meses de vida para experimentos histológicos.

4.2 <u>Caracterização dos efeitos metabólicos e glicêmicos induzidos pela</u> restrição alimentar e sua recuperação

Para avaliar entre os sexos os efeitos decorrentes de uma situação energeticamente restritiva, os animais (n=27 machos e 26 fêmeas) foram condicionados a protocolo de restrição alimentar (R.A.) de 60% com subsequente realimentação. Inicialmente, os animais foram individualizados por um período mínimo de 5 dias para habituação. Então, o consumo alimentar basal foi avaliado por cinco dias consecutivos, de maneira a obter a média do consumo normal desses animais. Dessa média, foi calculada a quantidade de ração a ser restrita, sendo fornecido diariamente, durante cinco dias de restrição, um único pellet de ração correspondente a 40% de seu consumo alimentar normal. Esse pellet de ração foi fornecido sempre ao final da tarde, duas horas antes do ciclo escuro do biotério iniciar. Posteriormente aos cinco dias de R.A., os animais tiveram acesso livre à ração durante o mesmo período de tempo para a avaliação da etapa de realimentação.

Durante todo esse processo experimental, os animais tiveram suas glicemias mensuradas diariamente através de um glicosímetro portátil (One Touch Ultra), bem como tiveram o peso e a composição corporal (massa magra e massa gorda) analisados através de um equipamento de ressonância magnética nuclear Minispec LF50 BCA Analyzer (Bruker Corporation, Alemanha).

Analisamos também o gasto energético e a atividade ambulatória (n=8 fêmeas e 8 machos) durante esse mesmo protocolo experimental por meio do equipamento de calorimetria indireta Oxymax/Clams (Comprehensive Lab Animal Monitoring System; Columbus Instruments). Esse equipamento analisa tanto o consumo de oxigênio (VO₂) como a produção de gás carbônico (VCO₂), o que nos permitiu calcular o gasto energético e o coeficiente respiratório (RER - razão VCO₂/VO₂) desses animais nas etapas de restrição alimentar e de realimentação. Complementar a esses parâmetros, o equipamento também permitiu mensurar a atividade ambulatória dos animais durante todo o protocolo experimental.

Para essas análises, os animais tiveram um período de adaptação de 2 dias ao equipamento. Na sequência, avaliamos um período basal e iniciamos o protocolo de R.A. e realimentação conforme mencionado acima.

4.3 <u>Avaliação da predisposição à obesidade induzida pelo consumo de dieta</u> <u>hipercalórica (HFD)</u>

Em outro grupo de animais (n=10 fêmeas e 9 machos), avaliamos como o consumo de uma dieta mais calórica pode afetar a predisposição ao desenvolvimento de obesidade em machos e fêmeas. Antes da exposição à essa dieta, os animais foram individualizados e tiveram seu consumo alimentar basal acompanhados por 3 dias. Posteriormente a este período, os animais foram pesados e analisamos a composição corporal por ressonância magnética conforme citado anteriormente. Nesse momento, a dieta convencional (2,99 kcal/g; 9,4% do conteúdo calórico derivado de gordura) foi substituída por uma dieta hipercalórica (60% do conteúdo calórico derivado de gordura; 5,24 kcal/g; D12492; Research Diets). A partir desse momento, analisamos o consumo

alimentar e a progressão da composição corporal 3 vezes na semana, por um período experimental total de 8 semanas.

Após 8 semanas consumindo dieta hiperlipídica, esses animais também foram analisados no equipamento de calorimetria indireta Oxymax/Clams de maneira a caracterizarmos o gasto energético desses animais em situação de balanço energético positivo da mesma forma que realizamos nos animais em restrição calórica.

4.4 <u>Avaliação do perfil glicêmico de machos e fêmeas</u>

Com o intuito de avaliar a regulação do perfil glicêmico entre os sexos, realizamos testes de tolerância à glicose (GTT) e testes de tolerância à insulina (ITT) em animais consumindo dieta padrão (n=10 fêmeas e 10 machos) e em animais consumindo HFD (n=10 fêmeas e 9 machos).

<u>GTT:</u> Para esse teste, avaliamos a tolerância do animal frente uma dose i.p. de glicose de 2 g/kg corporal do animal. Anteriormente ao teste, os animais tiveram suas rações removidas e a maravalha de suas caixas trocadas, de maneira a garantir período de 4 horas sem ingestão alimentar. A glicemia dos animais foi mensurada por meio de um glicosímetro portátil no ponto 0 (antes da administração i.p. de glicose) e nos pontos 20, 40, 60, 90 e 120 (após a administração de glicose) por meio da retirada de uma gota de sangue da veia caudal do animal. Após o teste, suas respectivas rações foram retornadas e os animais tiveram dois dias de recuperação antes da realização do próximo teste glicêmico.

<u>ITT:</u> O teste foi realizado com as mesmas condições experimentais do GTT citado acima, entretanto, nesse caso foi administrada injeção i.p. de insulina na dose de 1UI/kg corporal do animal.

4.5 Resposta aguda à hormônios reguladores da ingestão alimentar

4.5.1 Teste de sensibilidade à grelina

O teste consistiu em analisar a resposta orexígena a grelina frente a 3 condições diferentes: injeção subcutânea de grelina (Global Peptide, cat. No. C-et-004) na dose de 0,2µg/g; dose de 0,8µg/g e injeção controle de tampão fosfato de sódio (PBS). Para isso,

inicialmente os animais (n=10 fêmeas e 9 machos) passaram por 2 semanas de adaptação à injeção subcutânea de maneira a adaptar os animais ao estresse durante o teste para que não houvesse nenhum tipo de interferência nos resultados. Estando bem adaptados à injeção subcutânea, os animais foram pesados e foi administrada a dose correspondente de grelina ou PBS às 9 horas da manhã (horário saciado do animal) sem o animal estar em jejum, sendo a ração removida somente no horário na injeção.

Ao realizar a injeção da substância, foi fornecido um único pellet de ração previamente pesado (≅ 10g) onde acompanhamos o consumo alimentar e o peso corporal dos animais uma e duas horas após a administração da substância. Todos os animais foram testados nas três condições experimentais, com pelo menos um dia de descanso entre cada etapa, dessa forma cada animal servindo como controle dele mesmo.

4.5.2 Teste de sensibilidade à leptina

Para comparar a sensibilidade aguda à leptina em machos (n=9) e fêmeas (n=10), inicialmente mensuramos o peso corporal e a ração disponível para cada animal. Às 18 horas (2 horas antes do ciclo escuro do biotério iniciar) administramos leptina recombinante na dose de 2,5µg/g (NHPP – National Hormone and Peptide Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Torrance, CA). Avaliamos o consumo alimentar e o peso corporal de cada animal 14 horas e 24 horas após a administração de leptina. Os animais também foram testados nessas mesmas condições com a administração de solução PBS (controle), sendo que o consumo alimentar após administração de leptina foi comparado com o consumo alimentar após a aplicação da solução controle.

4.6 <u>Análise da secreção de GH estimulada pela grelina</u>

Com o intuito de verificar a capacidade secretora de GH estimulada pela grelina, adaptamos especificamente a metodologia de um protocolo de dosagem de GH presente na literatura (Steyn *et al.*, 2011) e que foi recentemente implementado ao laboratório (Wasinski *et al.*, 2020). Para isso, camundongos machos (n=10 salina e 16 grelina) e fêmeas (n=10 salina e 16 grelina) foram adaptados diariamente tanto à manipulação na cauda quanto a injeção subcutânea por 30 dias, de maneira a adaptar os animais ao
estresse durante o experimento bem como acostumá-los à manipulação. Esse experimento foi realizado sem os animais estarem em jejum (o que acarretaria em aumento na secreção endógena de grelina) e teve início às 12:30 (meio dia e meia), momento em que a secreção endógena de GH bem como de grelina não está aumentada.

No início do experimento, coletamos uma gota de sangue do epitélio caudal de cada animal referente ao momento basal (ponto 0), sendo que após essa coleta foi administrada uma injeção subcutânea de grelina (dose de 0.2µg/g animal) ou de PBS. A partir desse momento, realizamos mais quatro coletas seriadas de sangue referentes aos pontos de 10, 20, 30 e 40 minutos após a administração da substância. As amostras coletadas foram analisadas por meio de um ensaio de ELISA sensível para ao GH, sendo o ensaio realizado em uma placa de 96 poços (Corning Inc., Corning, NY).

Cada poço foi revestido com 50 µl de anticorpo de captura [Instituto Nacional de Diabetes e Doenças Digestivas e Renais (NIDDK) anti GH de rato (rGH) -IC-1 (feito em macaco), AFP411S, NIDDK-Hormônio Nacional e Programa Hipofisário (NHPP, Torrance, CA)] em diluição final de 1:40.000 e incubado durante a noite a 4ºC. Seguimos o ensaio preenchendo cada poço com 200 µl de tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em 0,05% PBS com Tween-20 [PBS-T, 0,05%]) de maneira a reduzir a ligação. Geramos uma curva padrão através da diluição em série de 2 µg de GH de camundongo (mGH) [referência mGH preparação, AFP-10783B, NIDDK-NHPP] em PBS-T suplementado com soro bovino (BSA) [0,2%, PBS-T / BSA]. Tanto os padrões consolidados bem como as amostras foram incubados com 50µl de anticorpo de detecção anti-soro para rGH (AFP5672099, NIDDK-NHPP) em uma diluição final de 1:40.000. Posteriormente, o complexo ligado foi incubado com 50 µl de anticorpo conjugado com peroxidase (anti-coelho, IgG; Sigma) em uma diluição final de 1:30.000. Após essa etapa, foi realizada uma reação colorimétrica enzimática com a adição de 100 µl de O-fenilenodiamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) em cada poço. Essa reação foi então interrompida com a adição de 50 µl de ácido clorídrico (HCl) 3M e a absorbância foi lida a um comprimento de onda de 490 nm. A concentração de GH em cada poço foi calculada por regressão da curva padrão.

4.7 Avaliação histológica neuronal

4.7.1 Caracterização da ativação neuronal hipotalâmica induzida pelo jejum

Com o intuito de avaliar se o número de células ativadas pelo jejum difere entre os sexos, camundongos adultos *AgRP/Tomato* de ambos os sexos (n=6 machos e 9 fêmeas) foram submetidos a 24 horas de jejum, conforme protocolo bem estabelecido pelo laboratório (Pedroso *et al.*, 2016). Passado esse período, os animais foram anestesiados com isofluorano e passaram por procedimento de perfusão transcardíaca utilizando-se bomba peristáltica e fixador formalina à 10% tamponada (150 – 200 mL por animal).

Ao fim da perfusão, os encéfalos dos animais foram coletados e mantidos em solução fixadora por 1 hora, onde posteriormente foram armazenados em solução a 0,1M de PBS contendo sacarose a 20% para crioproteção até o momento do processamento desses encéfalos.

4.7.2 Caracterização da responsividade neuronal à leptina

Para avaliar se o número de neurônios responsivos à leptina diverge entre machos e fêmeas, os camundongos *LepR/Tomato* (6 machos e 6 fêmeas) receberam injeção intraperitoneal de leptina recombinante de camundongo na dose de 2,5µg/kg. Uma hora e meia após a injeção, tempo suficiente para que ocorra ativação da via de sinalização da leptina e fosforilação do STAT3 (pSTAT3), os animais foram perfundidos e os encéfalos coletados e armazenados conforme mencionado no experimento anterior.

4.7.3 Avaliação do número de células responsivas à grelina no hipotálamo

Com o intuito de averiguar o número de neurônios hipotalâmicos responsivos à grelina (por meio da marcação de c-fos), camundongos adultos machos e fêmeas receberam injeção subcutânea de grelina na dose de 0.2µg/g (3 machos e 4 fêmeas) ou de PBS (grupo controle, 2 machos e 2 fêmeas). A perfusão transcardíaca desses animais foi realizada uma hora e meia após a injeção do hormônio, sendo os encéfalos armazenados da mesma maneira que nas situações anteriores.

4.7.4 Microtomia

No dia seguinte à realização da perfusão de cada experimento, os encéfalos coletados foram submetidos ao processo de microtomia em micrótomo de congelamento utilizando-se gelo seco. Para tanto, os encéfalos foram cortados em secções de 30 µm e coletados em 4 séries distintas. As séries foram armazenadas em solução anticongelante em freezer -20°C até serem utilizadas para reação de imuno-histoquímica.

4.7.5 <u>Reação de Imuno-histoquímica</u>

Para as marcações de c-fos através de *imunofluorescênci*a, inicialmente os cortes foram lavados em tampão fosfato de sódio (KPBS) a 0,02M, pH 7,4 e depois bloqueados em solução de KPBS-T (KPBS + Triton X) junto com soro normal de burro 3% (NDS). Após o bloqueio, os cortes encefálicos foram então incubados por 48 horas em anticorpo primário anti c-fos produzido em coelho (1:10.000, Ab-5, Millipore).

Após o período de incubação em anticorpo primário, os cortes encefálicos foram lavados em KPBS e então incubados em solução de KPBS-T juntamente com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com AlexaFluor⁴⁸⁸ (1:500, *#* 711-545-152, Jackson ImmunoResearch) por 90 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados em KPBS, montados em lâminas gelatinizadas, cobertos com o meio de montagem fluorescente Fluoromount G (Electron Microscopic Sciences, Hatfield, PA).

Para a marcação de c-fos por meio de *imunoperoxidase*, os cortes foram lavados em KPBS para completa remoção da solução anticongelante onde estavam armazenados. Posteriormente, os cortes foram submetidos a pré-tratamento em solução contendo KPBS-T e 0,3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 30 minutos. Após essa etapa, os tecidos passaram por nova lavagem em KPBS e realizamos a incubação destes por 48 horas em solução contendo KPBS-T mais azida, 3% de soro normal de burro e anticorpo primário anti c-fos produzido em coelho (1:20.000, Ab-5, Millipore).

No segundo dia do ensaio, iniciamos lavando os cortes em solução de KPBS e depois os incubamos em solução contendo KPBS-T e anticorpo secundário biotinilado anti coelho (1:1.000, #711-065-152, Jackson ImmunoResearch). Depois desse processo, os tecidos foram novamente lavados em KPBS e imersos em solução de KPBS contendo complexo de avidina e biotina (A 1:500; B 1:500, Vector Laboratories) por 1 hora, de maneira a amplificar a reação.

Para a etapa seguinte, os cortes encefálicos foram lavados em KBPS, seguido de lavagem em tampão acetato (0.1M, pH 6.0). Por fim, foram reagidos em solução contendo tampão acetato, DAB (200µl em cada 10 mL de solução), níquel sulfato (5% - 1mL a cada 10mL de solução) e H₂O₂ (1% - 3µl em cada 10mL de solução) por aproximadamente 4 minutos. A reação com DAB foi então interrompida com lavagens em tampão acetato, seguidas de lavagens em KPBS, e posteriormente montados em lâminas gelatinizadas que foram cobertas com meio de montagem DPX (Sigma, St. Louis, MO).

Para a marcação do pSTAT3 por meio de imunoperoxidase, inicialmente os casos dos animais que receberam injeção i.p. de leptina foram lavados em KPBS, seguido de imersão em solução contendo água, H₂O₂ (1%) e NaOH (1%) por 20 minutos. Os cortes foram então lavados em KPBS e passaram por vários processos de pré-tratamento, que incluíram imersão em solução contendo KPBS mais glicina (0,03%), seguido de lavagens em KPBS e imersão em solução contendo KPBS mais 0,3% dodecil sulfato de sódio (SDS). Os casos foram então bloqueados em solução de KPBS-T com soro normal de burro (3%) por 1 hora. Por fim, os casos foram incubados por 48 horas em solução de KPBS-T, soro normal de burro (3%) e anticorpo primário anti pSTAT3 feito em coelho (1:1.000, #9131, Cell Signaling).

Após as 48 horas, os casos foram lavados em KPBS e incubados por 1 hora em KPBS-T mais anticorpo secundário biotinilado anti coelho (1:1.000, #711-065-052, Jackson ImmunoResearch). Os cortes passaram por novas lavagens em KPBS e incubação por 1 hora em solução contendo complexo de avidina e biotina (A 1:500; B 1:500, Vector Laboratories). Por fim, os cortes foram lavados em KPBS, imersos em banho de tampão acetato (0.1M, pH 6.0) e reagidos com DAB e níquel da mesma maneira como foi citado anteriormente para a marcação de c-fos.

A reação foi parada em um banho de acetato e demais banhos em KPBS, onde os casos foram lavados nessa última solução e montados em lâminas gelatinizadas que foram por fim cobertas com DPX (Sigma, St. Louis, MO).

Para visualizar por meio de imunofluorescência as células que expressaram pSTAT3, inicialmente os cortes passaram pelos mesmos processos de pré-tratamento e

incubação em anticorpo primário realizado para a marcação com peroxidase citada acima. Após as 48 horas de incubação, os cortes encefálicos foram lavados em KPBS e então incubados em solução de KPBS-T juntamente com o anticorpo secundário anticoelho conjugado com AlexaFluor⁴⁸⁸ (1:500, #711-545-152, Jackson ImmunoResearch) por 90 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados em KPBS, montados em lâminas gelatinizadas e cobertos com o meio de montagem fluorescente Fluoromount G (Electron Microscopic Sciences, Hatfield, PA).

As lâminas foram fotografadas com uma câmera Zeiss Axiocam HRc que está acoplada a um microscópio de fluorescência Zeiss Axioimager A1 (Zeiss, Munique, Alemanha), o que permite fotografar tanto os casos reagidos com peroxidase (campo claro) quanto os reagidos com cromógenos fluorescentes.

Para a contagem das células que expressaram c-fos, para cada caso foram fotografadas duas fotos em níveis distintos do ARH. Para a contagem das células que expressaram o pSTAT3, foram fotografados dois níveis distintos do ARH, do VMH e da LHA. Também fotografamos um único nível do núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) e do núcleo pré mamilar ventral (PMV).

A marcação de c-fos e tdTomato (este não requer reação para sua visualização) nos neurônios AgRP, bem como a marcação de pSTAT3 e tdTomato nas células que expressam o receptor de leptina no encéfalo foram contabilizadas utilizando-se o programa ImageJ (<u>https://imagej.nih.gov/ij/</u>). No caso das áreas hipotalâmicas que foram fotografadas em mais de um nível, foi calculada a média das células contabilizadas em ambos os níveis.

4.8 <u>Coleta de tecidos sem perfusão</u>

Os animais não perfundidos foram eutanasiados ao final de cada experimento por meio de decapitação, a fim de obtermos amostras à fresco. Realizamos coletas de sangue que foram centrifugadas (por 10 minutos a 4000 rpm) a fim de obtermos somente a porção sérica para dosagens hormonais.

4.9 Dosagem hormonal

As amostras sorológicas coletadas durante as eutanásias foram utilizadas para a determinação das dosagens séricas de leptina, por meio de kit ELISA comercialmente disponível (#MOB00B, R&D Systems).

4.10 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados por meio do teste de t-Student, onde comparamos machos e fêmeas, ou por meio do teste de Análise de Variância (ANOVA) de medida repetida de duas vias. O programa GraphPad Prism foi utilizado para essas análises, sendo consideradas diferenças estatísticas sempre que o *P* for menor que 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 <u>Fêmeas apresentam proteção contra perda de peso durante condição</u> <u>energética restritiva</u>

Com o intuito de avaliarmos se existem diferenças entre os sexos frente a situação de balanço energético negativo bem como de sua recuperação, os animais foram submetidos a restrição alimentar de 60% por cinco dias consecutivos, seguido por cinco dias de realimentação. Desde o período basal até o último dia de realimentação, vimos que os machos apresentaram maior peso corporal do que as fêmeas (Figura 2A). Para compararmos se durante o protocolo experimental a variação de peso era distinta entre os sexos, calculamos a perda de peso durante o período de restrição alimentar e o ganho de peso durante a realimentação. Nossos resultados mostraram que os machos perdem mais peso do que as fêmeas a partir do terceiro dia de restrição calórica e demoram mais pra recuperar o peso quando o alimento volta a ser fornecido (Figura 2B).



Figura 2. Manutenção do peso corporal durante a restrição alimentar e a realimentação. A peso corporal total; **B** variação do peso corporal durante a restrição e a realimentação. n = 27 machos e 26 fêmeas. Abreviações: Basal = período antes da restrição alimentar; 1, 2, 3, 4 e 5 = dias de restrição alimentar ou realimentação. * = p<0,05 (t Student test). Todos os resultados foram expressos como ± SEM.

Para entendermos por meio de qual conteúdo ocorre essa variação no peso, analisamos a composição corporal durante esse período. Vimos que durante a restrição alimentar a diminuição de massa gorda ocorreu de maneira semelhante entre os grupos (Figura 3A). Durante a realimentação, os machos apresentaram maior massa gorda total do que as fêmeas, embora o ganho dessa massa tenha ocorrido de maneira semelhante entre os dois sexos (Figura 3B). Por serem mais pesados (Figura 2A), desde o início os machos também apresentaram maior massa magra em relação as fêmeas (Figura 3C), mas perderam mais desse componente a partir do segundo dia de restrição, recuperando mais lentamente a massa muscular do que as fêmeas (Figura 3D).



Figura 3. Composição corporal durante a restrição alimentar e realimentação. A massa gorda total; B variação da massa gorda; C massa magra total; D variação na massa gorda. n = 27 machos e 26 fêmeas. Abreviações: Basal (período antes da restrição alimentar); 1, 2, 3, 4 e 5 dias de restrição alimentar ou de realimentação. * = p<0,05 (t Student test). Todos os resultados foram expressos como ± SEM.

A variação glicêmica também foi analisada durante esse período. Durante a restrição alimentar e a realimentação a glicemia variou de maneira igual entre machos e fêmeas. Entretanto, no último dia de realimentação as fêmeas apresentaram recuperação da glicemia aos níveis basais, ao passo em que os machos apresentaram diminuição (Figura 4A). Essa diferença não pode ser explicada por alterações no consumo alimentar, uma vez que a resposta hiperfágica se mostrou igual entre os sexos durante a realimentação (Figura 4B).



Figura 4. Acompanhamento glicêmico e resposta hiperfágica. **A** glicemia; **B** consumo alimentar. n = 27 machos e 26 fêmeas. Abreviações: Basal = período antes da restrição alimentar; 1, 2, 3, 4 e 5 = dias de restrição alimentar ou de realimentação após a restrição. * = p<0,05 (t Student test). Todos os resultados foram expressos como ± SEM.

Para analisar o gasto energético durante situação de restrição calórica, um grupo de animais foi alojado no Oxymax/Clams, onde tiveram sua alimentação restringida da mesma maneira que o grupo anterior. Durante a restrição, ambos machos e fêmeas diminuíram o consumo de oxigênio (vO₂) de maneira semelhante (Figura 5A). Entretanto, durante a realimentação, vimos que as fêmeas apresentaram maior consumo de vO₂ do que os machos tanto no período claro (Figura 5B), escuro (Figura 5C), quanto 24 horas (Figura 5D).





Figura 5. Consumo de oxigênio durante a restrição alimentar e realimentação. **A** traçado com o vO₂ total durante a restrição e a realimentação; **B** vO₂ no período claro; **C** vO₂ no período escuro; **D** vO₂ no período de 24 horas. n = 8 machos e 8 fêmeas. Abreviações: Basal = período antes da restrição alimentar; 1, 2, 3, 4 e 5 = dias de restrição alimentar ou realimentação após a restrição. * = p<0,05 (t Student test). Todos os resultados foram expressos como \pm SEM.

Outro fator analisado e que poderia influenciar o gasto energético foi a atividade ambulatória. Nossos resultados mostraram que tanto no período claro, escuro ou de 24 horas, ambos os sexos aumentaram a ambulação durante o período de restrição calórica de maneira semelhante, assim como diminuíram a movimentação durante a realimentação da mesma maneira (Figura 6A, 6B, 6C e 6D).



Figura 6. Atividade ambulatória durante a restrição alimentar e realimentação. A traçado da atividade ambulatória total durante o período analisado; **B** atividade ambulatória no período claro; **C** atividade ambulatória no período escuro; **D** atividade ambulatória no período de 24 horas. n = 8 machos e 8 fêmeas. Abreviações: Basal = período antes da restrição alimentar; 1, 2, 3, 4 e 5 = dias de restrição alimentar ou realimentação após a restrição. Todos os dados foram analisados por t Student test e os resultados foram expressos como ± SEM.

Outro fator analisado durante a condição restritiva foi o coeficiente respiratório (Figura 7A). Durante a restrição calórica, vimos que as fêmeas apresentam diminuição desse parâmetro durante os três primeiros dias de restrição tanto no período claro (Figura 7B), escuro (Figura 7C) e de 24 horas (Figura 7D). A partir do quarto dia de restrição, o RER aumentou para valores iguais ao dos machos, não havendo diferença durante o período de realimentação em qualquer período (Figura 7A, 7B, 7C e 7D)



Figura 7. Coeficiente respiratório durante a restrição alimentar e realimentação. A traçado do coeficiente respiratório total durante o período analisado; B coeficiente respiratório no período claro; C coeficiente respiratório no período escuro; D coeficiente respiratório no período de 24 horas. n = 8 machos e 8 fêmeas. Abreviações: Basal = período antes da restrição alimentar; 1, 2, 3, 4 e 5 = dias de restrição alimentar ou realimentação após a restrição. Todos os dados foram analisados por t Student test e os resultados foram expressos como ± SEM.

5.2 <u>Machos são mais suscetíveis aos desbalanços metabólicos e glicêmicos</u> induzidos pela dieta hiperlipídica

Além de termos avaliado animais em situação de restrição calórica, submetemos um grupo de animais à suplementação com dieta hiperlipídica para analisarmos se a predisposição à obesidade ocorre de maneira sexualmente dimórfica. De maneira semelhante ao ocorrido na restrição alimentar, vimos que os machos são mais pesados do que as fêmeas durante todo o protocolo experimental (Figura 8A), bem como ganham mais peso, particularmente após 7 semanas consumindo dieta hiperlipídica (Figura 8B).



Figura 8. Variação no peso corporal durante consumo com dieta hiperlipídica. A peso corporal total (semanas); **B** ganho de peso corporal (semanas). n = 9 machos e 10 fêmeas. Abreviações: HFD = dieta hiperlipídica; Basal = período com dieta padrão; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 = semanas em HFD. * = p<0,05 (Two-way ANOVA e t Student test). Todos os resultados foram expressos como \pm SEM.

Em relação a composição corporal, vimos que a massa gorda variou de maneira semelhante (Figura 9A), sendo que os machos passaram a ganhar mais desse componente na oitava semana de dieta hiperlipídica (Figura 9B). Os machos também apresentaram mais massa magra total do que as fêmeas (Figura 9C), com o ganho desse componente sendo diferente entre os sexos somente na oitava semana (Figura 9D).



Figura 9. Composição corporal durante consumo com dieta hiperlipídica. **A** massa gorda total; **B** variação na massa gorda; **C** massa magra total; **D** variação na massa magra. n = 9 machos e 10 fêmeas. Abreviações: HFD = dieta hiperlipídica; Basal = período com dieta padrão; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 = semanas em HFD. * = p<0,05 (Two-way ANOVA e t Student test). Todos os resultados foram expressos como \pm SEM.

Também foi observado que durante período basal as fêmeas apresentaram maior consumo alimentar em relação aos machos. Com a alteração da dieta padrão para a dieta hiperlipídica, vimos diminuição do consumo alimentar nas fêmeas, enquanto os machos apresentaram aumento na ingestão calórica. Esse consumo tende a estabilizar por um período, onde durante a sétima e oitava semana observamos que as fêmeas novamente passaram a comer menos do que os machos (Figura 10A e 10B).



Figura 10. Consumo alimentar durante consumo de dieta hiperlipídica. **A** consumo alimentar expresso em gramas; **B** consumo alimentar expresso em quilocalorias (Kcal). n = 8 machos e 8 fêmeas. Abreviações: HFD = dieta hiperlipídica; Basal = período com dieta padrão; 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 = dias em HFD. * = p<0,05 (Two way ANOVA e t Student test). Todos os resultados foram expressos como \pm SEM.

Ao analisarmos o gasto energético desses animais, vimos que os machos apresentaram consumo de oxigênio menor do que as fêmeas tanto no período claro, escuro e 24 horas (Figura 11A), indicativo de que gastam menos energia. Ainda, esse consumo menor não pode ser explicado por alterações na atividade ambulatória, uma vez que não houve alterações nesse parâmetro entre os grupos (Figura 11B).



Figura 11. Consumo de oxigênio, atividade ambulatória e consumo hídrico durante consumo de dieta hiperlipídica. A consumo de oxigênio; B atividade ambulatória. n = 8 machos e 8 fêmeas. * = p<0,05 (Two-way ANOVA e t Student test). Todos os resultados foram expressos como ± SEM.

Também analisamos nesses animais, bem como em animais com dieta padrão, a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina por meio de testes glicêmicos. Observamos que quando alimentados com dieta padrão, machos e fêmeas apresentaram tolerância à glicose (Figura 12A) e sensibilidade à insulina similar (Figura 12B). Por outro lado, ao serem alimentados com a dieta hiperlipídica, vimos que os machos passaram a apresentar maior intolerância à glicose em relação as fêmeas (Figura 12C), assim como demonstraram possuir resistência à insulina (Figura 12D).



Figura 12. Testes glicêmicos durante alimentação com dieta padrão e com dieta hiperlipídica. . **A** teste de tolerância a glicose animais em dieta padrão; **B** teste de sensibilidade a insulina animais em dieta padrão; **C** teste de tolerância a glicose animais em HFD; **D** teste de sensibilidade a insulina animais em HFD. n = 10 machos e 10 fêmeas (chow); 9 machos e 10 fêmeas (HFD) Abreviações: GTT = teste de tolerância a glicose; ITT = teste de sensibilidade a insulina; 0 = momento anterior à injeção de glicose ou insulina; 20, 40, 60, 90, 120 = tempo em minutos das medições após a injeção de glicose ou insulina. HFD = dieta hiperlipídica. * = p<0,05 (Two-way ANOVA e t Student test). Todos os resultados foram expressos como ± SEM.

Avaliamos também se o padrão sérico de leptina em machos e fêmeas é alterado mediante consumo crônico de HFD. Conforme demonstrado na Figura 13A, naturalmente as fêmeas apresentam níveis séricos de leptina maiores do que os machos. Nossos resultados demonstram que durante o consumo crônico de dieta hiperlipídica, tanto machos como fêmeas apresentam aumento exacerbado dos níveis circulantes de leptina, ambos os sexos praticamente dobrando os níveis séricos desse hormônio. Entretanto, curiosamente esse aumento ocorreu de maneira semelhante entre os grupos, não havendo dimorfismo sexual nesse aspecto (Figura 13A).



Α

Figura 13. Dosagem de leptina sérica animais em dieta padrão e HFD. **A** Quantificação do número de células responsivas à leptina em núcleos hipotalâmicos e extra hipotalâmicos de fêmeas e machos. n = 6 machos e 6 fêmeas (chow); 9 machos e 9 fêmeas (HFD). Abreviações: ARH = núcleo arqueado do hipotálamo; DMH = núcleo dorsomedial do hipotálamo; LHA = área hipotalâmica lateral; PMV = núcleo prémamilar ventral; VMH = núcleo Ventromedial do hipotálamo. Todos os dados foram analisados por t Student test e os resultados foram expressos como \pm SEM.

5.3 <u>Fêmeas apresentam maior sensibilidade às ações agudas da leptina do que</u> os machos

Outro aspecto que analisamos com relação ao dimorfismo sexual foi a capacidade da leptina em induzir diminuição do consumo alimentar. Nossos resultados mostram que 14 horas após a administração da leptina, ambos os sexos apresentaram diminuição do consumo alimentar quando comparados com o consumo após administração de solução PBS (Figura 14A). Curiosamente, vimos que essa diminuição do consumo apresentou dimorfismo sexual, uma vez que as fêmeas tiveram maior diminuição da ingestão alimentar em relação aos machos (Figura 14A). Interessantemente, essa maior diminuição da ingestão alimentar nas fêmeas perdurou mesmo 24 horas após a administração de leptina (Figura 14B). Em relação ao peso corporal, vimos que as fêmeas tiveram maior diminuição da leptina (Figura 14B). Em relação ao peso corporal, vimos que as fêmeas tiveram maior diminuição do peso 14 horas após a administração de leptina em relação aos machos (Figura 14C). Entretanto, esse efeito não foi observado 24 horas após o início do teste (Figura 14D).



Figura 14. Teste de sensibilidade a leptina. **A** consumo alimentar 14 horas após injeção de PBS e leptina; **B** consumo alimentar 24 horas após injeção de PBS e leptina; **C** peso corporal 14 horas após injeção de PBS e leptina; **D** peso corporal 24 horas após injeção de PBS e leptina. n =9 machos e 10 fêmeas. Abreviações: PBS = solução controle; leptina = dose de 2,5µg/g. * = p<0,05 (Two-way ANOVA e t Student test). Todos os resultados foram expressos como ± SEM.

5.4 Fêmeas são mais resistentes às ações da grelina

Vimos que somente os machos apresentaram aumento no consumo alimentar uma e duas horas após injeção de grelina na dose de 0,2µl/g (Figura 15A e 15B). Pensando nisso, avaliamos se a baixa responsividade das fêmeas poderia ser devido à baixa sensibilidade a grelina. Assim, aplicamos uma dosagem de grelina quatro vezes maior (0,08µl/g) e vimos que as fêmeas apresentaram aumento no consumo alimentar assim como os machos, o que pode indicar que as fêmeas não são tão responsivas pois apresentam resistência à ação da grelina (Figura 15A e 15B).



Figura 15. Teste de sensibilidade a grelina. **A** consumo alimentar 1 hora após administração subcutânea de PBS ou grelina; **B** consumo alimentar 2 horas após administração subcutânea de PBS ou grelina. n = 9 machos e 10 fêmeas. Abreviações: PBS = solução controle; grelina = dose de 0,02 ug/g; grelina (0,08ug/g) = dose de 0,08ug/g. * = p<0,05 (Two-way ANOVA e t Student test). Todos os resultados foram expressos como ± SEM.

54

5.5 <u>Fêmeas apresentam baixa capacidade secretora de GH mediada pela</u> grelina

Baseado nos nossos resultados de responsividade à grelina, onde vimos que as fêmeas possuem certa resistência às ações desse hormônio, resolvemos analisar a capacidade de secreção de GH estimulada pela administração exógena de grelina, para verificar se nesse aspecto também existe dimorfismo sexual. Vimos que frente a administração de grelina, os machos são altamente responsivos, secretando entre 5 e 15 ng/ml de GH nos primeiros 20 minutos e mantendo secreção por até 40 minutos (Figura 16A). Por outro lado, embora as fêmeas tenham apresentado certa responsividade à grelina (Figura 16B), a secreção de GH foi mais baixa do que a dos machos e durou apenas 20 minutos (Figura 16C). Esses dados se mostram condizentes com os resultados vistos até então. Da mesma forma que a grelina não é tão eficaz em induzir o consumo alimentar nas fêmeas, a secreção de GH estimulada por esse hormônio também não ocorre na mesma magnitude vista nos machos.



Figura 16. Capacidade de secreção de GH estimulada pela grelina. A secreção de GH mediada pela grelina nos machos; B secreção de GH mediada pela grelina nas fêmeas; C comparação entre a secreção de GH de machos e fêmeas. n = 10 machos e 10 fêmeas (salina); 16 machos e 16 fêmeas (grelina). Abreviações: 0 = período basal sem injeção de grelina; 10, 20, 30, 40 = minutos após a injeção de grelina. * = p<0,05 (Two-way ANOVA e t Student test). Todos os resultados foram expressos como ± SEM.

5.6 <u>Ativação neuronal no ARH induzida por jejum não apresenta dimorfismo</u> <u>sexual</u>

Um dos aspectos morfológicos que avaliamos foi se a ativação dos neurônios AgRP apresenta dimorfismo sexual. Nossos resultados demonstram que tanto fêmeas (Figura 17A) como machos (Figura 17B) apresentam quantidade semelhante de neurônios AgRP em situação basal (Figura 17E). Quando submetidos a 24 horas de jejum, a quantidade de neurônios ativados no ARH de fêmeas (Figura 17C) e machos (Figura 17D) não apresentou dimorfismo sexual (Figura 17E).



Figura 17. Ativação neuronal induzida por 24 horas de jejum. **A** Fotomicrografias representativas mostrando os neurônios AgRP (em vermelho) no ARH de fêmeas; **B** Fotomicrografias representativas mostrando os neurônios ativados pelo jejum (c-fos – em verde) no ARH de fêmeas; **D** Fotomicrografias representativas mostrando os notrando os neurônios ativados pelo jejum (c-fos – em verde) no ARH de fêmeas; **D** Fotomicrografias representativas mostrando ativação neuronal basal x 24 horas de jejum. n = 6 machos e 6 fêmeas. Abreviações: 3V = terceiro ventrículo; AgRP = neurônios AgRP; ARH = núcleo arqueado do hipotálamo; c-fos = marcador de ativação

natural; tdTomato = proteína fluorescente vermelha. Todos os dados foram analisados por t Student test e os resultados foram expressos como ± SEM.

5.7 Ativação neuronal no ARH induzida pela grelina não apresenta dimorfismo sexual

Outro aspecto morfológico que avaliamos foi se a baixa responsividade das fêmeas à grelina poderia ser devido à baixa ativação neuronal no ARH. Quando administramos solução PBS, vimos que tanto no ARH de fêmeas (Figura 18A) como no ARH de machos (Figura 18B) a expressão de c-Fos foi praticamente inexistente. Em animais que receberam a injeção de grelina, vimos que tanto nas fêmeas (Figura 18C) como nos machos (Figura 18D) houve ativação neuronal no ARH. Embora machos e fêmeas tenham tido ampla ativação neuronal quando comparamos a injeção de PBS com a de grelina (Figura 18E), não houve dimorfismo sexual em relação a ativação neuronal mediada pela grelina (Figura 18E).



Figura 18. Ativação neuronal induzida por grelina. **A** Fotomicrografias representativas mostrando no ARH de fêmeas os neurônios ativados (c-fos – em preto) pela injeção de PBS; **B** Fotomicrografias representativas mostrando no ARH de machos os neurônios ativados (c-fos – em preto) pela injeção de PBS; **C** Fotomicrografias representativas mostrando no ARH de fêmeas os neurônios ativados (c-fos – em preto) pela injeção de grelina; **D** Fotomicrografias representativas mostrando no ARH de machos os

neurônios ativados (c-fos – em preto) pela injeção de grelina; **E** Quantificação ativação neuronal induzida por PBS e grelina. n = 2 machos e 2 fêmeas (salina); 3 machos e 4 fêmeas (grelina). Abreviações: 3V = terceiro ventrículo; ARH = núcleo arqueado do hipotálamo; c-fos = marcador de ativação natural. * = p<0,05 (t Student test). Todos os resultados foram expressos como ± SEM.

5.8 <u>Ativação neuronal hipotalâmica mediada pela leptina não apresenta dimorfismo</u> <u>sexual</u>

Também analisamos em diversos núcleos hipotalâmicos se a ativação neuronal induzida por administração exógena de leptina apresenta dimorfismo sexual. Conforme demonstrado na Figura 19A, a responsividade neuronal à leptina foi semelhante entre machos e fêmeas em todos os núcleos hipotalâmicos e extra hipotalâmicos estudados.



Figura 19. Ativação neuronal induzida pela leptina. **A** Quantificação do número de células responsivas à leptina em núcleos hipotalâmicos e extra hipotalâmicos de fêmeas e machos. n = 6 machos e 6 fêmeas. Abreviações: ARH = núcleo arqueado do hipotálamo; DMH = núcleo dorsomedial do hipotálamo; LHA = área hipotalâmica lateral; PMV = núcleo pré-mamilar ventral; VMH = núcleo Ventromedial do hipotálamo. Todos os dados foram analisados por t Student test e os resultados foram expressos como ± SEM.

6 DISCUSSÃO

Até pouco tempo, a maior parte das pesquisas clínicas e terapias desenvolvidas tinham como base a suposição de que machos poderiam servir como representantes da espécie. Ainda hoje, grande parte das pesquisas básicas realizadas com modelos animais utilizam somente machos em seus ensaios. Entretanto, cada vez mais evidências vem mostrando que o fator sexo é fundamental para a incidência e desenvolvimento de doenças como diabetes e obesidade. Estudos já demonstraram, por exemplo, que existem respostas sexualmente distintas a drogas anti-diabetogênicas, onde foi observado que machos e fêmeas podem responder melhor a diferentes medicamentos (Kim *et al.*, 2005; Donnelly *et al.*, 2006).

Uma vez que a maior parte das diferenças sexuais que estão relacionadas à diabetes e obesidade em humanos também são encontradas em modelos animais, tornase imperativo a utilização de ambos os sexos nas pesquisas, visando o desenvolvimento de terapias relevantes específicas para o tratamento desses problemas (Mauvais-Jarvis, 2018). Com base nessas informações, nós avaliamos diretamente como machos e fêmeas respondem frente a desafios metabólicos e hormonais, onde buscamos compreender se alguns componentes envolvidos com a regulação hipotalâmica do metabolismo energético apresentam dimorfismo sexual e estariam por trás das respostas metabólicas diferenciadas entre os sexos.

O primeiro desafio metabólico no qual submetemos nossos animais foi o de balanço energético negativo oriundo de restrição calórica de 60% por cinco dias consecutivos, situação capaz de alterar diversas características metabólicas visando reduzir o peso corporal (Hill *et al.*, 1985; Overton and Williams, 2004). Nossos resultados demonstraram que os machos são mais pesados e possuem mais massa magra do que as fêmeas durante todo o protocolo experimental. Durante a restrição alimentar, a perda de peso foi evidenciada principalmente por diminuição da massa magra com recuperação mais lenta pelos machos quando comparado às fêmeas. A massa gorda diminuiu de maneira semelhante entre os grupos.

Essa dinâmica de perda de peso pode apresentar relação com pressões evolutivas, uma vez que os estoques energéticos dos machos apresentam capacidade maior de mobilização por estarem nos depósitos viscerais (Enzi *et al.*, 1986). Por outro lado, uma vez que as fêmeas são capazes de gestar e lactar, seu organismo desenvolveu adaptações de sobrevivência que permitem maior resistência à perda de estoques energéticos durante situação restritiva. Isso é evidenciado pois o tecido adiposo subcutâneo, presente em maior proporção nas fêmeas, é mais adaptado ao armazenamento de longo termo, enquanto os adipócitos viscerais dos machos são metabolicamente mais ativos e sensíveis a lipólise, o que pode estar relacionado com a maior perda de peso corporal dos machos em relação as fêmeas (Karastergiou *et al.*, 2012; Palmer and Clegg, 2015).

Em uma situação energética normal, o organismo das fêmeas tende a incorporar ácidos graxos livres (AGL) em triglicerídeos, o que ajuda na manutenção da adiposidade. Nessa mesma condição os homens tendem a oxidar os AGL circulantes (Shi *et al.*, 2007). Em condições onde a demanda energética é alta, como durante exercícios, as fêmeas passam a oxidar maior proporção de lipídios do que de carboidratos, enquanto os machos vão essencialmente utilizar carboidratos como fonte de energia (Carter *et al.*, 2001; Henderson, 2014). Nossos resultados demonstram que durante a restrição alimentar, as fêmeas também apresentaram diminuição do RER e passaram a oxidar mais lipídios durante o início da restrição. Essa característica oxidativa e de diminuição do RER tem o intuito de preservar energia durante situação energética negativa, o que possibilitou recuperação mais rápida das fêmeas ao estado normal durante a realimentação, caracterizado pelo retorno da oxidação de carboidratos conforme demonstrado pelo aumento do RER.

Embora a perda de peso por meio de dietas calóricas seja considerada protetiva contra desenvolvimento de doenças crônicas, o estado catabólico promovido pela restrição alimentar não afeta apenas o tecido adiposo, mas também causa catabolismo de outros tecidos, como o músculo esquelético (Bosy-Westphal *et al.*, 2009). Vimos que durante a restrição alimentar, ambos os grupos apresentaram diminuição da massa magra, consistente com essa ação catabólica. Entretanto, os machos apresentaram

60

perda maior de massa magra do que as fêmeas, o que demonstra efeito mais potente da restrição calórica nos machos. Com o declínio metabólico ocorrido após a perda de massa magra, geralmente observa-se mudanças desfavoráveis na composição corporal por meio de reganho de massa adiposa (Dulloo *et al.*, 2012), o que é consistente com os fatos dos machos apresentarem maior proporção de massa gorda durante a realimentação em relação as fêmeas.

Em conjunto, nossos resultados de balanço energético negativo evidenciam que machos sofrem mais os efeitos negativos da restrição, principalmente por perderem massa magra. Por outro lado, as fêmeas apresentam regulação de diversos componentes metabólicos visando maior resistência à perda de peso e massa magra, o que embora garantiria sua sobrevivência em situações de escassez energética, atualmente poderia ser visto como um malefício, pois dificultaria uma rápida perda de peso.

Em seguida, buscamos compreender se essas diferenças entre machos e fêmeas também poderiam ser explicadas por ativação neuronal diferenciada no ARH. É sabido que o jejum é capaz de induzir a expressão gênica de AgRP no ARH, aumentando a procura por alimento (Schwartz et al., 1998; Briggs et al., 2011). Em situação basal, vimos que machos e fêmeas apresentam a mesma quantidade de neurônios AgRP. Durante o jejum de 24 horas, observamos que o número de neurônios ativados também não foi diferente entre os sexos. Isso pode indicar que esse parâmetro não é regulado de maneira distinta pelos neurônios AgRP, conforme havia-se proposto inicialmente, onde as fêmeas seriam mais sensíveis à ativação desse sistema (Lensing et al., 2016). Análises diretas da ativação neuronal de 18 horas de jejum comparado com 36 horas, demonstraram que não houveram diferenças na marcação de c-fos no ARH (Wu et al., 2014), o que juntamente com nossos resultados sugerem que o jejum não é capaz de recrutar mais neurônios AgRP/NPY para contornar essa situação. Outra explicação para essas diferenças poderia envolver dimorfismo sexual no sistema hipotalâmico da melanocortina. Realimentação após um período de jejum se mostrou capaz de aumentar em aproximadamente 20% a ativação de neurônios POMC (Wu et al., 2014). Comparado as fêmeas, machos apresentariam menor densidade de fibras neuronais de POMC no

ARH e menor expressão do gene e da proteína POMC (Nohara *et al.*, 2011). Essa maior expressão dessa população neuronal e a capacidade de ativação durante a realimentação poderia ser um dos mecanismos centrais envolvidos com a maior capacidade de recuperação que fêmeas apresentam em relação aos machos.

O consumo de HFD é um fator de risco para desordens metabólicas associadas à obesidade (Bessesen, 2008), onde os efeitos sobre a homeostase metabólica são influenciados pelo sexo (Medrikova *et al.*, 2012). Uma vez que grande parte dos estudos sobre desordens metabólicas por HFD são restritos a machos (Srinivasan and Ramarao, 2007), avaliamos se machos e fêmeas são diferentemente predispostos à obesidade por meio do consumo crônico de HFD. Em situações de balanço energético positivo, tal como o consumo de HFD, os adipócitos captam os AGL da circulação, o que leva ao aumento do tamanho e número de adipócitos, que é representado por aumento da massa adiposa corporal (Faust, 1984). Vimos que em relação as fêmeas, os machos apresentam maior ganho de peso em relação as fêmeas. Curiosamente, os machos foram mais obesos durante a 8ª semana de exposição ao HFD.

Um dos principais mecanismos de deposição adiposa nos machos envolve o armazenamento nos tecidos viscerais (Palmer and Clegg, 2015). Esse tipo de tecido apresenta características que contribuem para a resistência à insulina. A alta taxa lipolítica desse compartimento também é capaz de aumentar significantemente a quantidade de AGL que, ao serem acumulados de maneira ectópica no fígado, podem gerar aumento da produção hepática de glicose, hiperinsulinemia assim como outros fatores da síndrome metabólica (Shulman, 2014). Uma vez que ao final do experimento os machos apresentaram mais gordura do que as fêmeas, podemos supor que esse aumento tenha sido favorecido principalmente nesse tipo de depósito, o que pode ter contribuído para o desenvolvimento dos problemas metabólicos característicos da obesidade que foram observados nos machos.

Demonstramos também que os machos quando expostos à HFD apresentam piora glicêmica, desenvolvendo intolerância a glicose e resistência à insulina, enquanto as fêmeas apresentam certa proteção desses efeitos. Essa proteção das fêmeas aparentemente é conferida por meio dos estrógenos, que tornam as fêmeas menos

suscetíveis a essas complicações (Brown and Clegg, 2010; Palmer and Clegg, 2015). Entretanto, a partir da menopausa, quando o padrão adiposo das fêmeas é alterado dos depósitos subcutâneos para os viscerais, a prevalência da obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 tornam-se mais frequentes nas mulheres (Palmer and Clegg, 2015). Nesse sentido, tratamento com E2 em fêmeas deficientes de leptina (Lundholm *et al.*, 2019), ou fêmeas OVX em HFD (Riant *et al.*, 2009), confere melhora da tolerância a glicose e diminuição da resistência à insulina, o que demonstra a importância dos estrógenos para a proteção contra os efeitos deletérios da obesidade que foram observados nos machos.

Analisamos também a secreção de leptina em animais alimentados com dieta padrão e de animais em HFD. Os níveis de leptina estão diretamente relacionados com o aumento do peso corporal, o que implica que quanto maior for a adiposidade, maior será o nível plasmático desse hormônio (Considine *et al.*, 1996), que em condições patológicas pode caracterizar resistência a leptina e contribuir diretamente para o desenvolvimento de hiperglicemia (Toyoshima *et al.*, 2005). Observamos que em condições normais, as fêmeas são caracterizadas por maior nível de leptina (dobro em relação aos machos), o que é consistente com sua maior massa adiposa (Woods *et al.*, 2003). Entretanto, durante o desenvolvimento de obesidade induzida por dieta, os machos apresentam maior elevação das concentrações de leptina (672%) em relação ao basal, ao passo que nas fêmeas esse aumento foi de 263%. Essa diferença pode caracterizar resistência à leptina e influenciar para as pioras metabólicas e glicêmicas que foram observadas nos machos.

Também analisamos se machos e fêmeas respondem de maneira diferente a leptina. A literatura demonstra que machos e fêmeas apresentam sensibilidade central distinta à leptina (Clegg *et al.*, 2003) e que o estradiol é capaz de alterar essa sensibilidade central ocasionando alterações na distribuição adiposa (Clegg *et al.*, 2006). Nossos resultados demonstraram que tanto machos quanto fêmeas são responsivos a leptina, pois apresentaram diminuição do consumo alimentar por até 24 horas após administração do hormônio. Entretanto, somente as fêmeas apresentaram diminuição do peso corporal durante as primeiras 14 horas. Isso pode indicar que além de possuírem

mais leptina circulante, as fêmeas também são mais sensíveis aos efeitos da leptina. Analisamos se a responsividade neuronal à leptina apresenta dimorfismo sexual, podendo esse ser um dos motivos das fêmeas serem centralmente mais sensíveis a esse hormônio. A leptina age por meio de seu receptor LepR em diversos núcleos hipotalâmicos e extra hipotalâmicos que estão envolvidos com a regulação do metabolismo energético. Embora tenha sido sugerido que fêmeas possuíssem baixa densidade de LepR no ARH (Clegg *et al.*, 2006), nossos experimentos mostram que a ativação neuronal induzida pela leptina no ARH, DMH, LHA, PMV e VMH não apresenta dimorfismo sexual. Essa informação pode implicar que talvez existam outros mecanismos que não sejam a nível de receptor ou ativação neuronal coordenando essas ações sexualmente dimórficas no metabolismo energético.

Outro aspecto hormonal que avaliamos foi se machos e fêmeas são diferentemente responsivos às ações da grelina. A grelina promove suas ações biológicas por meio da ligação ao seu receptor GHSR, amplamente expresso na hipófise e no ARH (Cowley et al., 2003). Foi mostrado que a grelina modula a ingestão alimentar por meio de ação estimulatória sobre os neurônios AgRP/NPY e ação inibitória sobre os neurônios POMC. Administração de grelina induz expressão genica de AgRP/NPY e ativação de NPY (Chen et al., 2004), sendo que situações como jejum e HFD regulam a expressão de GHSR (Briggs et al., 2013). Após a administração de grelina em uma dose de 0,2ug/g, vimos que os machos apresentaram aumento do consumo alimentar, enquanto as fêmeas não foram responsivas. Trabalhos mostram que as fêmeas não são responsivas às ações da grelina em parte pela presença de estrógenos (Clegg et al., 2007). Uma vez que os estrógenos são removidos, as fêmeas apresentam certa responsividade (Clegg et al., 2007). Embora na ausência de estrógenos a grelina tenha aumentado o consumo alimentar nas fêmeas, testamos a hipótese de que ao invés das fêmeas não serem responsivas devido ao E2, elas são menos sensíveis aos efeitos orexigênicos desse hormônio. Assim, administramos uma dose quatro vezes maior de grelina (0,8ug/g) e vimos que embora essa maior dose não tenha sido capaz de aumentar a resposta nos machos, as fêmeas se tornaram tão responsivas quanto os machos. Nossos resultados podem indicar então que as fêmeas na realidade apresentam menor sensibilidade à grelina, sendo necessária doses maiores para que seus efeitos biológicos sejam efetuados. Analisamos então se essa menor sensibilidade das fêmeas à grelina poderia estar relacionada com uma menor ativação neuronal após sua administração. Vimos que após administração de grelina houve ampla ativação neuronal em ambos os sexos, demonstrando então que a menor sensibilidade à grelina nas fêmeas não é explicada por diferenças na ativação neuronal hipotalâmica.

Além das ações sobre a ingestão alimentar, outra função importante da grelina é o de induzir a secreção do hormônio do crescimento (GH) (Kojima *et al.*, 1999). Recentemente, estudos vem evidenciando ações centrais do GH na regulação do metabolismo energético, mostrando que o GH é essencial para a modulação de respostas neuroendócrinas que visam economizar energia em situações de restrição calórica e induzir a procura por alimento (Furigo *et al.*, 2019). Por termos visto que as fêmeas não são tão responsivas quanto os machos às ações orexigênicas da grelina, avaliamos se a capacidade de secreção de GH estimulada pela grelina apresentava diferenças entre os sexos. Nossos resultados mostram que por serem responsivos à grelina, os machos apresentam elevada secreção de GH, sendo que essa dura por um longo período. Interessantemente, vimos que as fêmeas apresentam baixa secreção de GH, sendo essa secreção não muito duradoura. Esses resultados podem reforçar que as fêmeas são menos sensíveis à grelina, e podem nos ajudar a entender os mecanismos por trás da dificuldade que as mulheres tem em perder peso após situações de dietas restritivas.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que machos e fêmeas são diferentemente afetados por desafios metabólicos, como restrição calórica e dieta hiperlipídica e apresentam dimorfismo sexual na maneira que regulam o metabolismo para enfrentar e sobreviver a esses desafios. Também, vimos que a sensibilidade a hormônios como leptina e grelina é diferente entre os sexos, o que demonstra que a informação regulatória que é integrada no sistema nervoso central deve ocorrer de maneira sexualmente distinta. Entretanto, nossos resultados histológicos demonstram que esses aspectos não são modulados por meio de alterações na ativação neuronal hipotalâmica induzida por esses hormônios ou por situação aguda de jejum (24 horas).

Com base nessas informações, fica claro que conhecer os mecanismos por trás dessas diferenças é crucial e pode ajudar no desenvolvimento de novas terapias e estratégias para combater o ganho de peso após o emagrecimento assim como pode fornecer pistas de como tratar de maneira específica doenças como a obesidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA, R. S. et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature,** v. 382, n. 6588, p. 250-2, Jul 1996. ISSN 0028-0836. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8717038</u> >.

AINSLIE, D. A. et al. Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. **Int J Obes Relat Metab Disord,** v. 25, n. 11, p. 1680-8, Nov 2001. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753591</u> >.

AL MASSADI, O. et al. Current Understanding of the Hypothalamic Ghrelin Pathways Inducing Appetite and Adiposity. **Trends Neurosci**, v. 40, n. 3, p. 167-180, 03 2017. ISSN 1878-108X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28108113</u> >.

ANDREWS, Z. B. Central mechanisms involved in the orexigenic actions of ghrelin. **Peptides,** v. 32, n. 11, p. 2248-55, Nov 2011. ISSN 1873-5169. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21619904</u> >.

ASARIAN, L.; GEARY, N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. **Horm Behav,** v. 42, n. 4, p. 461-71, Dec 2002. ISSN 0018-506X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488112</u> >.

BATES, S. H. et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. **Nature,** v. 421, n. 6925, p. 856-9, Feb 2003. ISSN 0028-0836. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594516</u> >.

BELGARDT, B. F.; BRÜNING, J. C. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1212, p. 97-113, Nov 2010. ISSN 1749-6632. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21070248</u> >.

BESSESEN, D. H. Update on obesity.J Clin Endocrinol Metab, v. 93, n. 6, p. 2027-34,Jun2008.ISSN0021-972X.Availableat:<</td>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539769>.

BJÖRNTORP, P. Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases. **Nutrition,** v. 13, n. 9, p. 795-803, Sep 1997. ISSN 0899-9007. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9290093</u> >. BJØRBAEK, C. et al. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. **J Biol Chem,** v. 272, n. 51, p. 32686-95, Dec 1997. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405487</u> >.

BLAUSTEIN, J. D. An estrogen by any other name .. **Endocrinology**, v. 149, n. 6, p. 2697-8, Jun 2008. ISSN 0013-7227. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18493023</u> >.

BONAVERA, J. J. et al. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology**, v. 134, n. 6, p. 2367-70, Jun 1994. ISSN 0013-7227. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8194462</u> >.

BOSY-WESTPHAL, A. et al. Contribution of individual organ mass loss to weight loss-
associated decline in resting energy expenditure. Am J Clin Nutr, v. 90, n. 4, p. 993-1001,
Oct 2009. ISSN 1938-3207. Available at: <
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19710198 >.

BOURET, S. G. et al. Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in dietinduced obese rats. **Cell Metab,** v. 7, n. 2, p. 179-85, Feb 2008. ISSN 1550-4131. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18249177</u> >.

BRANTLEY, P. J.; MYERS, V. H.; ROY, H. J. Environmental and lifestyle influences on obesity. **J La State Med Soc,** v. 157 Spec No 1, p. S19-27, Jan 2005. ISSN 0024-6921. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15751906</u> >.

BRIGGS, D. I.; ANDREWS, Z. B. A recent update on the role of ghrelin in glucose homeostasis. **Curr Diabetes Rev,** v. 7, n. 3, p. 201-7, May 2011. ISSN 1875-6417. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21539509</u> >.

BRIGGS, D. I. et al. Diet-induced obesity attenuates fasting-induced hyperphagia. **J Neuroendocrinol**, v. 23, n. 7, p. 620-6, Jul 2011. ISSN 1365-2826. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518036</u> >.

BRIGGS, D. I.; Calorie-restricted weight loss reverses high-fat diet-induced ghrelin resistance, which contributes to rebound weight gain in a ghrelin-dependent manner. **Endocrinology**, v. 154, n. 2, p. 709-17, Feb 2013. ISSN 1945-7170. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23307790</u> >.

BROWN, L. M.; CLEGG, D. J. Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 122, n. 1-3, p. 65-73, Oct

2010. ISSN 1879-1220. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20035866</u> >.

BURKE, L. K. et al. Sex difference in physical activity, energy expenditure and obesity driven by a subpopulation of hypothalamic POMC neurons. **Mol Metab**, v. 5, n. 3, p. 245-252, Mar 2016. ISSN 2212-8778. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977396</u> >.

CABRAL, A. et al. Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System? Int J Mol Sci, v. 18, n. 3, Mar 2017. ISSN 1422-0067. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28294994</u> >.

CAMPBELL, C. D. et al. Association studies of BMI and type 2 diabetes in the neuropeptide Y pathway: a possible role for NPY2R as a candidate gene for type 2 diabetes in men. **Diabetes**, v. 56, n. 5, p. 1460-7, May 2007. ISSN 1939-327X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17325259</u> >.

CAO, J.; PATISAUL, H. B. Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors α and β and Kiss1 in neonatal male and female rats. **J Comp Neurol**, v. 519, n. 15, p. 2954-77, Oct 2011. ISSN 1096-9861. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21484804</u> >.

CAREY, D. G. et al. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. **Diabetes,** v. 45, n. 5, p. 633-8, May 1996. ISSN 0012-1797. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621015</u> >.

CARTER, S. L.; RENNIE, C.; TARNOPOLSKY, M. A. Substrate utilization during endurance exercise in men and women after endurance training. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 6, p. E898-907, Jun 2001. ISSN 0193-1849. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350771</u> >.

CHEN, H. Y. et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. **Endocrinology,** v. 145, n. 6, p. 2607-12, Jun 2004. ISSN 0013-7227. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14962995</u> >.

CLAYTON, J. A.; COLLINS, F. S. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. **Nature,** v. 509, n. 7500, p. 282-3, May 2014. ISSN 1476-4687. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24834516</u> >.

CLEGG, D. J. et al. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. **Diabetes,** v. 55, n. 4, p. 978-87, Apr 2006. ISSN 0012-1797. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567519</u> >.

CLEGG, D. J.;. et al. Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. **Diabetes,** v. 56, n. 4, p. 1051-8, Apr 2007. ISSN 0012-1797. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251274</u> >.

CLEGG, D. J. et al. Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. **Diabetes,** v. 52, n. 3, p. 682-7, Mar 2003. ISSN 0012-1797. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12606509</u> >.

CONSIDINE, R. V. et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **N Engl J Med,** v. 334, n. 5, p. 292-5, Feb 1996. ISSN 0028-4793. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8532024</u> >.

COWLEY, M. A. et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature,** v. 411, n. 6836, p. 480-4, May 2001. ISSN 0028-0836. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11373681</u> >.

COWLEY, M. A. et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. **Neuron,** v. 37, n. 4, p. 649-61, Feb 2003. ISSN 0896-6273. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12597862</u> >.

CUMMINGS, D. E.; SCHWARTZ, M. W. Genetics and pathophysiology of human obesity. **Annu Rev Med,** v. 54, p. 453-71, 2003. ISSN 0066-4219. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414915</u> >.

DA SILVA, R. P. et al. Leptin resistance is not the primary cause of weight gain associated with reduced sex hormone levels in female mice. **Endocrinology,** v. 155, n. 11, p. 4226-36, Nov 2014. ISSN 1945-7170. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25144922</u> >.

DE SOUZA, F. S. et al. The estrogen receptor α colocalizes with proopiomelanocortin in hypothalamic neurons and binds to a conserved motif present in the neuron-specific enhancer nPE2. **Eur J Pharmacol**, v. 660, n. 1, p. 181-7, Jun 2011. ISSN 1879-0712. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21211522</u> >.

DIANO, S.; KALRA, S. P.; HORVATH, T. L. Leptin receptor immunoreactivity is associated with the Golgi apparatus of hypothalamic neurons and glial cells. **J Neuroendocrinol**, v.

10, n. 9, p. 647-50, Sep 1998. ISSN 0953-8194. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9744481</u> >.

DONATO, J. The central nervous system as a promising target to treat diabetes mellitus. **Curr Top Med Chem,** v. 12, n. 19, p. 2070-81, 2012. ISSN 1873-4294. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167796</u> >.

DONNELLY, L. A. et al. The effect of obesity on glycaemic response to metformin or sulphonylureas in Type 2 diabetes. **Diabet Med,** v. 23, n. 2, p. 128-33, Feb 2006. ISSN 0742-3071. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16433709</u> >.

DULLOO, A. G.; JACQUET, J.; MONTANI, J. P. How dieting makes some fatter: from a perspective of human body composition autoregulation. **Proc Nutr Soc,** v. 71, n. 3, p. 379-89, Aug 2012. ISSN 1475-2719. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22475574</u> >.

DUNGAN, H. M.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1154-8, Mar 2006. ISSN 0013-7227. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373418</u> >.

EDWARDS, C. M. et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, glucagon-like peptide-1 and corticotrophin releasing factor inhibit feeding via agouti-related protein independent pathways in the rat. **Brain Res,** v. 866, n. 1-2, p. 128-34, Jun 2000. ISSN 0006-8993. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10825488</u> >.

ENRIORI, P. J. et al. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. **J Neurosci**, v. 31, n. 34, p. 12189-97, Aug 2011. ISSN 1529-2401. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21865462</u> >.

ENZI, G. et al. Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography. **Am J Clin Nutr**, v. 44, n. 6, p. 739-46, Dec 1986. ISSN 0002-9165. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3788827</u> >.

FAUST, I. M. Role of the fat cell in energy balance physiology. **Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis,** v. 62, p. 97-107, 1984. ISSN 0091-7443. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6364276</u> >.
FORD, E. S.; MAYNARD, L. M.; LI, C. Trends in mean waist circumference and abdominal obesity among US adults, 1999-2012. **JAMA**, v. 312, n. 11, p. 1151-3, Sep 2014. ISSN 1538-3598. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25226482</u> >.

FRENCH, S. A.; STORY, M.; JEFFERY, R. W. Environmental influences on eating and physical activity. **Annu Rev Public Health,** v. 22, p. 309-35, 2001. ISSN 0163-7525. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274524</u> >.

FURIGO, I. C. et al. Growth hormone regulates neuroendocrine responses to weight loss via AgRP neurons. **Nat Commun**, v. 10, n. 1, p. 662, 02 2019. ISSN 2041-1723. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30737388</u> >.

GAMBACCIANI, M. et al. Body weight, body fat distribution, and hormonal replacement therapy in early postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 2, p. 414-7, Feb 1997. ISSN 0021-972X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9024228</u> >.

GOLDSTEIN, J. L. et al. Surviving starvation: essential role of the ghrelin-growth hormone axis. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 76, p. 121-7, 2011. ISSN 1943-4456. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785007</u> >.

GONG, E. J.; GARREL, D.; CALLOWAY, D. H. Menstrual cycle and voluntary food intake. **Am J Clin Nutr,** v. 49, n. 2, p. 252-8, Feb 1989. ISSN 0002-9165. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2916445</u> >.

GOODIN, S. Z. et al. Effect of gonadectomy on AgRP-induced weight gain in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 295, n. 6, p. R1747-53, Dec 2008. ISSN 0363-6119. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18922963</u> >.

GROPP, E. et al. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. **Nat Neurosci,** v. 8, n. 10, p. 1289-91, Oct 2005. ISSN 1097-6256. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16158063</u> >.

GUAN, X. M. et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 48, n. 1, p. 23-9, Aug 1997. ISSN 0169-328X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9379845</u> >.

HEINE, P. A. et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 23, p. 12729-34, Nov 2000. ISSN 0027-8424. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11070086</u> >.

HENDERSON, G. C. Sexual dimorphism in the effects of exercise on metabolism of lipids to support resting metabolism. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 5, p. 162, 2014. ISSN 1664-2392. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339941</u> >.

HEWSON, A. K.; DICKSON, S. L. Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. **J Neuroendocrinol**, v. 12, n. 11, p. 1047-9, Nov 2000. ISSN 0953-8194. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11069119</u> >.

HILL, J. O.; LATIFF, A.; DIGIROLAMO, M. Effects of variable caloric restriction on utilization of ingested energy in rats. **Am J Physiol**, v. 248, n. 5 Pt 2, p. R549-59, May 1985. ISSN 0002-9513. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3993813</u> >.

HOFMAN, M. A.; SWAAB, D. F. The sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the human brain: a comparative morphometric study. **J Anat,** v. 164, p. 55-72, Jun 1989. ISSN 0021-8782. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2606795</u> >.

HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; EL NAHAS, M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. **N Engl J Med**, v. 356, n. 3, p. 213-5, Jan 2007. ISSN 1533-4406. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17229948</u> >.

HUSZAR, D. et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. **Cell**, v. 88, n. 1, p. 131-41, Jan 1997. ISSN 0092-8674. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9019399</u> >.

KARASTERGIOU, K. et al. Sex differences in human adipose tissues - the biology of pear shape. **Biol Sex Differ,** v. 3, n. 1, p. 13, May 2012. ISSN 2042-6410. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22651247</u> >.

KAUFFMAN, A. S. et al. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. **Endocrinology,** v. 148, n. 4, p. 1774-83, Apr 2007. ISSN 0013-7227. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17204549</u> >.

KIM, J. S. et al. Leptin Signaling Is Not Required for Anorexigenic Estradiol Effects in Female Mice. **Endocrinology,** v. 157, n. 5, p. 1991-2001, 05 2016. ISSN 1945-7170. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26937712</u> >.

KIM, Y. M. et al. Predictive clinical parameters for therapeutic efficacy of rosiglitazone in Korean type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 67, n. 1, p. 43-52, Jan 2005. ISSN 0168-8227. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620433</u> >.

KOJIMA, M. et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature,** v. 402, n. 6762, p. 656-60, Dec 1999. ISSN 0028-0836. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10604470</u> >.

KRASHES, M. J. et al. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. **J Clin Invest**, v. 121, n. 4, p. 1424-8, Apr 2011. ISSN 1558-8238. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364278</u> >.

KRUDE, H. et al. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. **Nat Genet,** v. 19, n. 2, p. 155-7, Jun 1998. ISSN 1061-4036. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620771</u> >.

LAWRENCE, C. B. et al. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. **Endocrinology,** v. 143, n. 1, p. 155-62, Jan 2002. ISSN 0013-7227. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751604</u> >.

LEE, C. G. et al. Adipokines, inflammation, and visceral adiposity across the menopausal transition: a prospective study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 4, p. 1104-10, Apr 2009. ISSN 1945-7197. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19126626</u> >.

LEE, S. K. Sex as an important biological variable in biomedical research. **BMB Rep,** v. 51, n. 4, p. 167-173, Apr 2018. ISSN 1976-670X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29429452</u> >.

LEIBEL, R. L. The role of leptin in the control of body weight. **Nutr Rev,** v. 60, n. 10 Pt 2, p. S15-9; discussion S68-84, 85-7, Oct 2002. ISSN 0029-6643. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12403079</u> >.

LENSING, C. J. et al. Ac-Trp-DPhe(p-I)-Arg-Trp-NH2, a 250-Fold Selective Melanocortin-4 Receptor (MC4R) Antagonist over the Melanocortin-3 Receptor (MC3R), Affects Energy Homeostasis in Male and Female Mice Differently. **ACS Chem Neurosci,** v. 7, n. 9, p. 1283-91, 09 2016. ISSN 1948-7193. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27385405</u> >.

LUNDHOLM, L. et al. The estrogen receptor α-selective agonist propyl pyrazole triol improves glucose tolerance in ob/ob mice: potential molecular mechanisms. **J Endocrinol**, v. 243, n. 2, p. X1, 09 2019. ISSN 1479-6805. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32150359</u> >.

LUQUET, S. et al. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. **Science,** v. 310, n. 5748, p. 683-5, Oct 2005. ISSN 1095-9203. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254186</u> >.

MARTÍNEZ DE MORENTIN, P. B. et al. Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. **Cell Metab**, v. 20, n. 1, p. 41-53, Jul 2014. ISSN 1932-7420. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24856932</u> >.

MAUVAIS-JARVIS, F. Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. **Biol Sex Differ,** v. 6, p. 14, 2015. ISSN 2042-6410. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339468</u> >.

MAUVAIS-JARVIS, F. Gender differences in glucose homeostasis and diabetes. **Physiol Behav,** v. 187, p. 20-23, 04 2018. ISSN 1873-507X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28843891</u> >.

MEDRIKOVA, D. et al. Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: adipose tissue expandability and glycemic control. **Int J Obes (Lond),** v. 36, n. 2, p. 262-72, Feb 2012. ISSN 1476-5497. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21540832</u> >.

MERCHENTHALER, I. et al. Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. **J Comp Neurol**, v. 473, n. 2, p. 270-91, May 2004. ISSN 0021-9967. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15101093</u> >.

MIHALACHE, L. et al. Effects of ghrelin in energy balance and body weight homeostasis. **Hormones (Athens),** v. 15, n. 2, p. 186-196, Feb 2016. ISSN 2520-8721. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27376422</u> >.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature,** v. 443, n. 7109, p. 289-95, Sep 2006. ISSN 1476-4687. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988703</u> >.

MUSATOV, S. et al. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 104, n. 7, p. 2501-6, Feb 2007. ISSN 0027-8424. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17284595</u> >.

NAKAZATO, M. et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature,** v. 409, n. 6817, p. 194-8, Jan 2001. ISSN 0028-0836. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11196643</u> >.

NOHARA, K. et al. Early-life exposure to testosterone programs the hypothalamic melanocortin system. **Endocrinology,** v. 152, n. 4, p. 1661-9, Apr 2011. ISSN 1945-7170. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21303958</u> >.

OBICI, S. et al. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. **Nat Neurosci,** v. 5, n. 6, p. 566-72, Jun 2002. ISSN 1097-6256. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021765</u> >.

OVERTON, J. M.; WILLIAMS, T. D. Behavioral and physiologic responses to caloric restriction in mice. **Physiol Behav,** v. 81, n. 5, p. 749-54, Jul 2004. ISSN 0031-9384. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15234180</u> >.

PALMER, B. F.; CLEGG, D. J. The sexual dimorphism of obesity. **Mol Cell Endocrinol**, v. 402, p. 113-9, Feb 2015. ISSN 1872-8057. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25578600</u> >.

PANZICA, G.; MELCANGI, R. C. Structural and molecular brain sexual differences: A tool to understand sex differences in health and disease. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 67, p. 2-8, Aug 2016. ISSN 1873-7528. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27113294</u> >.

PARTON, L. E. et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. **Nature,** v. 449, n. 7159, p. 228-32, Sep 2007. ISSN 1476-4687. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17728716</u> >.

PEDROSO, J. A. et al. Changes in Leptin Signaling by SOCS3 Modulate Fasting-InducedHyperphagia and Weight Regain in Mice. Endocrinology, v. 157, n. 10, p. 3901-3914,Oct2016.ISSN1945-7170.Availableat: <</td>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27471877

PELLEYMOUNTER, M. A.; BAKER, M. B.; MCCALEB, M. Does estradiol mediate leptin's effects on adiposity and body weight? **Am J Physiol**, v. 276, n. 5, p. E955-63, 05 1999. ISSN 0002-9513. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329991</u> >.

PERREAULT, M. et al. Resistance to the orexigenic effect of ghrelin in dietary-induced obesity in mice: reversal upon weight loss. **Int J Obes Relat Metab Disord,** v. 28, n. 7, p. 879-85, Jul 2004. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111983</u> >.

PLIQUETT, R. U. et al. The effects of insulin on the central nervous system--focus on appetite regulation. **Horm Metab Res,** v. 38, n. 7, p. 442-6, Jul 2006. ISSN 0018-5043. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16933179</u> >.

QIU, J. et al. Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels. **Cell Metab**, v. 19, n. 4, p. 682-93, Apr 2014. ISSN 1932-7420. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24703699</u> >.

RAMOS-LOBO, A. M.; DONATO, J. The role of leptin in health and disease. **Temperature** (Austin), v. 4, n. 3, p. 258-291, 2017. ISSN 2332-8940. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28944270</u> >.

RAVUSSIN, E.; BOGARDUS, C. Energy balance and weight regulation: genetics versus environment. **Br J Nutr,** v. 83 Suppl 1, p. S17-20, Mar 2000. ISSN 0007-1145. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10889787</u> >.

REZAI-ZADEH, K. et al. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. **Mol Metab**, v. 3, n. 7, p. 681-93, Oct 2014. ISSN 2212-8778. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352997</u> >.

RIANT, E. et al. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. **Endocrinology,** v. 150, n. 5, p. 2109-17, May 2009. ISSN 1945-7170. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164473</u> >.

ROBERTS, D. L.; DIVE, C.; RENEHAN, A. G. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. **Annu Rev Med,** v. 61, p. 301-16, 2010. ISSN 1545-326X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19824817</u> >.

ROSENBAUM, M. et al. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 9, p. 3424-7, Sep 1996. ISSN 0021-972X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8784109</u> >.

ROSENFELD, R. G. Gender differences in height: an evolutionary perspective. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 17 Suppl 4, p. 1267-71, Sep 2004. ISSN 0334-018X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15506072</u> >. SCHULINGKAMP, R. J. et al. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. **Neurosci Biobehav Rev,** v. 24, n. 8, p. 855-72, Dec 2000. ISSN 0149-7634. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118610</u> >.

SCHWARTZ, M. W. et al. Effect of fasting and leptin deficiency on hypothalamic neuropeptide Y gene transcription in vivo revealed by expression of a lacZ reporter gene. **Endocrinology**, v. 139, n. 5, p. 2629-35, May 1998. ISSN 0013-7227. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564880</u> >.

SCHWARTZ, M. W. et al. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. **Endocr Rev,** v. 13, n. 3, p. 387-414, Aug 1992. ISSN 0163-769X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1425482</u> >.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-71, Apr 2000. ISSN 0028-0836. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766253</u> >.

SCHWARTZ, S. M.; WADE, G. N. Effects of estradiol and progesterone on food intake, body weight, and carcass adiposity in weanling rats. **Am J Physiol**, v. 240, n. 5, p. E499-503, May 1981. ISSN 0002-9513. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7235006</u> >.

SCOTT, N. et al. A sexually dimorphic hypothalamic circuit controls maternal care and oxytocin secretion. **Nature,** v. 525, n. 7570, p. 519-22, Sep 2015. ISSN 1476-4687. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26375004</u> >.

SHAH, B. P. et al. MC4R-expressing glutamatergic neurons in the paraventricular hypothalamus regulate feeding and are synaptically connected to the parabrachial nucleus. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 111, n. 36, p. 13193-8, Sep 2014. ISSN 1091-6490. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25157144</u> >.

SHI, H. et al. Sexually dimorphic responses to fat loss after caloric restriction or surgical lipectomy. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 293, n. 1, p. E316-26, Jul 2007. ISSN 0193-1849. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426110</u> >.

SHULMAN, G. I. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. **N Engl J Med,** v. 371, n. 23, p. 2237-8, 12 2014. ISSN 1533-4406. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25470706</u> >.

SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. **Indian J Med Res,** v. 125, n. 3, p. 451-72, Mar 2007. ISSN 0971-5916. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17496368</u> >.

STEYN, F. J. et al. Development of a method for the determination of pulsatile growth hormone secretion in mice. **Endocrinology**, v. 152, n. 8, p. 3165-71, Aug 2011. ISSN 1945-7170. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21586549</u> >.

SWAAB, D. F.; FLIERS, E. A sexually dimorphic nucleus in the human brain. **Science**, v. 228, n. 4703, p. 1112-5, May 1985. ISSN 0036-8075. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3992248</u> >.

TAKAHASHI, K. A.; CONE, R. D. Fasting induces a large, leptin-dependent increase in the intrinsic action potential frequency of orexigenic arcuate nucleus neuropeptide Y/Agouti-related protein neurons. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1043-7, Mar 2005. ISSN 0013-7227. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591135</u> >.

TONG, Q. et al. Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. **Nat Neurosci,** v. 11, n. 9, p. 998-1000, Sep 2008. ISSN 1546-1726. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19160495</u> >.

TOYOSHIMA, Y. et al. Leptin improves insulin resistance and hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes. **Endocrinology,** v. 146, n. 9, p. 4024-35, Sep 2005. ISSN 0013-7227. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15947005</u> >.

TRAYHURN, P. Adipose tissue in obesity--an inflammatory issue. **Endocrinology,** v. 146, n. 3, p. 1003-5, Mar 2005. ISSN 0013-7227. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713941</u> >.

TSCHÖP, M.; SMILEY, D. L.; HEIMAN, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature,** v. 407, n. 6806, p. 908-13, Oct 2000. ISSN 0028-0836. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11057670</u> >.

URBAN, J. H.; BAUER-DANTOIN, A. C.; LEVINE, J. E. Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus: sexual dimorphism and modulation by testosterone. **Endocrinology**, v. 132, n. 1, p. 139-45, Jan 1993. ISSN 0013-7227. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8419120</u> >.

VAISSE, C. et al. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. **Nat Genet,** v. 14, n. 1, p. 95-7, Sep 1996. ISSN 1061-4036. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782827</u> >.

VAN PELT, R. E. et al. Contributions of total and regional fat mass to risk for cardiovascular disease in older women. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 282, n. 5, p. E1023-8, May 2002. ISSN 0193-1849. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11934666</u> >.

WADE, G. N.; GRAY, J. M.; BARTNESS, T. J. Gonadal influences on adiposity. **Int J Obes,** v. 9 Suppl 1, p. 83-92, 1985. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4066126</u> >.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr Rev,** v. 21, n. 6, p. 697-738, Dec 2000. ISSN 0163-769X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133069</u> >.

WANG, Q. et al. Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. **Mol Metab,** v. 3, n. 1, p. 64-72, Feb 2014. ISSN 2212-8778. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24567905</u> >.

WASINSKI, F. et al. Tyrosine Hydroxylase Neurons Regulate Growth Hormone Secretion via Short-Loop Negative Feedback. **J Neurosci**, v. 40, n. 22, p. 4309-4322, May 2020. ISSN 1529-2401. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32317389</u> >.

WELLS, J. C. Sexual dimorphism of body composition. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab,** v. 21, n. 3, p. 415-30, Sep 2007. ISSN 1521-690X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875489</u> >.

WOODS, S. C.; GOTOH, K.; CLEGG, D. J. Gender differences in the control of energy homeostasis. **Exp Biol Med (Maywood),** v. 228, n. 10, p. 1175-80, Nov 2003. ISSN 1535-3702. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14610257</u> >.

WOODS, S. C.; SEELEY, R. J. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. **Nutrition,** v. 16, n. 10, p. 894-902, Oct 2000. ISSN 0899-9007. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11054594</u> >.

WREN, A. M. et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 86, n. 12, p. 5992, Dec 2001. ISSN 0021-972X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739476</u> >.

WU, Q. et al. The temporal pattern of cfos activation in hypothalamic, cortical, and brainstem nuclei in response to fasting and refeeding in male mice. **Endocrinology**, v.

155, n. 3, p. 840-53, Mar 2014. ISSN 1945-7170. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24424063</u> >.

XU, Y. et al. Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. **Cell Metab**, v. 14, n. 4, p. 453-65, Oct 2011. ISSN 1932-7420. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982706</u> >.

YASWEN, L. et al. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. **Nat Med,** v. 5, n. 9, p. 1066-70, Sep 1999. ISSN 1078-8956. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10470087</u> >.

ZHAN, C. et al. Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. **J Neurosci**, v. 33, n. 8, p. 3624-32, Feb 2013. ISSN 1529-2401. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23426689</u> >.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature,** v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1994. ISSN 0028-0836. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236</u> >.

ZIGMAN, J. M. et al. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. **J Comp Neurol**, v. 494, n. 3, p. 528-48, Jan 2006. ISSN 0021-9967. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16320257</u> >.

APÊNDICE: ATA DA DEFESA



Universidade de São Paulo Campus Armando de Salles Oliveira Instituto de Ciências Biomédicas spgicb@usp.br +55 (11) 3091-7439



DECLARAÇÃO

DECLARO que, o(a) Senhor(a) GABRIEL OREFICE DE SOUZA defendeu o título de MESTRE EM CIÊNCIAS, Área de FISIOLOGIA HUMANA tendo sido aprovado(a) em prova pública da Defesa de Dissertação de Mestrado realizada no 02 de dezembro de 2020 e que oportunamente, será homologada pela Comissão de Pós-Graduação. O trabalho apresentado tem como título: "Avaliação de dimorfismo sexual na regulação central do metabolismo energético de camundongos". A Comissão Julgadora foi constituida pelos seguintes docentes: Profs. Drs. Titular: LUCILA LEICO KAGOHARA ELIAS, Titular: ANDRÉ DE SOUZA MECAWI, Titular: JOÃO PAULO GABRIEL CAMPOREZ e Orientador: JOSÉ DONATO JUNIOR.

São Paulo, 02 de dezembro de 2020.

Profa. Dra. MARIA LUIZA MORAIS BARRETO DE CHAVES