

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA

NAIRA DA SILVA MANSANO

**Fatores que alteram a ingestão alimentar modulam a atividade de
neurônios kisspeptinérgicos?**

São Paulo
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA

NAIRA DA SILVA MANSANO

**Fatores que alteram a ingestão alimentar modulam a atividade de
neurônios kisspeptinérgicos?**

Exame de Defesa de Doutorado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação Biologia de
Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas,
Departamento de Anatomia da Universidade de
São Paulo.

Área de Concentração: Biologia
Morfofuncional

Orientador: Profa. Dra. Renata Frazão

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)

Da Silva Mansano, Naira

Fatores que alteram a ingestão alimentar modulam a atividade de neurônios kisspeptinérgicos? / Naira Da Silva Mansano; orientadora Renata Frazão. -- São Paulo, 2022.

74 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Eletrofisiologia. 2. Hipotálamo. 3. Kisspeptina. 4. Gasto Energético. 5. Reprodução. I. Frazão, Renata, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Naira da Silva Mansano

Título da Tese: Fatores que alteram a ingestão alimentar modulam a atividade de neurônios kisspeptinérgicos?

Orientador: Renata Frazão

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 ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Ingestão alimentar e reprodução: fatores que modulam a ingestão alimentar modulam a atividade de neurônios Kiss1?*", registrado sob o protocolo nº **107/2017**, 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 **28/09/2017** 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.) Renata Frazão**

- Departamento: *Anatomia*

- Membros da Equipe: *Daniella G de Paula (Iniciação científica), Larissa campista Lana de Moraes (Pós-graduando), Naira da Silva Mansano (Pós-graduando), Fernanda Machado Chaves (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www2.icb.usp.br/icb/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Food intake and reproduction: factors that modulate food intake modulate the activity of Kiss1 neurons*", protocol nº **107/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **9/28/2017** 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.) Renata Frazão**

- Team members: *Daniella G de Paula (Undergraduate Student), Larissa campista Lana de Moraes (Graduate Student), Naira da Silva Mansano (Graduate Student), Fernanda Machado Chaves (Graduate Student)*

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

Espécie/ Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age- Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>C57BL6(Kiss1/hrGFP/AgRP-Cre/Chrm4)</i>	<i>Macho/male</i>	<i>60-120 dias/days</i>	<i>160</i>
	<i>C57bl6 (Kiss1/hrGFP)</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>60-120 dias/days</i>	<i>160</i>
	<i>C57BL6(Kiss1/hrGFP/AgRP-Cre/Chrm4)</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>60-120 dias/days</i>	<i>160</i>
	<i>C57bl6 (Kiss1/hrGFP)</i>	<i>Macho/male</i>	<i>60-120 dias/days</i>	<i>80</i>

São Paulo, 18 de outubro de 2017.

Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

"É preciso sacudir energicamente o bosque dos neurônios cerebrais adormecidos; é fundamental fazê-los vibrar com a emoção do novo e infundir-lhes nobres e elevadas inquietudes".

*

Ramón y Cajal

*A Deus, meus pais, minha irmã e
meu marido por serem minha
fortaleza e fonte de amor ♥*

Agradecimentos

A concretização deste trabalho só foi possível com o apoio de muitas pessoas. Manifesto a minha **gratidão** a todas elas:

Aos meus pais **Bete** e **Odair** e à minha irmã **Vitória** que são fundamentais para o meu crescimento e são a minha base forte em todos os meus passos. Eterna gratidão por tudo que veio antes desse trabalho e por tudo que virá depois, nossa história de amor é atemporal!

Ao meu marido **Luis Fernando** por me enaltecer, com seu jeito doce me dá forças e sempre pensa no que nos faz feliz. Gratidão por caminhar de mãos dadas comigo (juntos vamos mais longe!), por ser luz e me inspirar a ser uma pessoa melhor sempre.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Renata Frazão**, pela sua sabedoria e dedicação incansável. Rainha/Fada/Mama Kiss, gratidão por ensinar-me a ser uma mulher cientista, por me guiar, por ser minha amiga e a voz da sensatez. Você sempre será uma grande inspiração na minha vida!

Aos nossos colaboradores **Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka** pela disponibilidade e apoio, em especial ao **Prof. Dr. José Donato Jr**, por compartilhar seu conhecimento e sempre me instigar a crescer no âmbito acadêmico. Obrigada pelas oportunidades!

Aos **colegas** e **professores do Departamento de Anatomia**, pelo acolhimento e risadas nos saudosos momentos pré-pandêmicos do “*Anatocoffee*”, em especial à **Profa. Dra. Maria Luiza** e à **Profa. Dra. Claudimara**, por permitirem utilizar os equipamentos indispensáveis para a execução dos experimentos.

À **equipe dos Laboratório de Neuroeletrofisiologia: Henrique, Izabela, Guilherme, Estela, e Josiane**, agradeço a parceira, por compartilharem os surtos e trabalhos de finais de semana, gratidão por fazerem o ambiente de trabalho um local leve, com muitas risadas (mesmo que sejam de nervoso) e guloseimas.

Aos antigos alunos do laboratório, **Fernanda, Thais, Tabata, Larissa, Igor**, gratidão pelos auxílios no desenvolvimento dos protocolos experimentais, em

especial a **Marina** por sempre compartilhar o seu conhecimento de uma forma tão acolhedora mesmo à distância.

Aos meus **amigos** do **Departamento de Anatomia**, por compartilharem as angústias, conquistas, (muitos) cafés e (muitas) cervejinhas no Bar do Naná. Em especial meus queridos agregados do Lab 108 B, **Jean, Bianca, Miss, Marcos e Deni**.

À equipe do **Laboratório de Neuroanatomia Funcional**, especialmente à **Mariana**, obrigada por me ensinar protocolos essenciais, à **Dani** e à **Lígia** agradeço pela colaboração e parceira nos experimentos noturnos e por serem sempre tão carinhosas. À **Ana Maria**, que com seu jeito sorridente e competência salva todo mundo das dificuldades.

Aos **funcionários** e **ex-funcionários** do prédio **Instituto de Ciências Biomédicas III (ICB III)**, especialmente à **Patricia** e ao **Renivaldo** pela disponibilidade e excelente trabalho. À **Ana** e ao **Marcelo** pela simpatia e presteza.

Aos **meus amigos** e **familiares** que não participaram de forma direta, mas estão ao meu lado em todos os momentos, de maneira especial à minha melhor amiga e agora oficialmente “*dino-comadre*” **Ana Laura**, que há mais de 20 anos sabe dizer-me palavras de conforto, amor e incentivo!

Ao **Programa de Pós-Graduação Biologia de Sistemas do ICB III da Universidade de São Paulo**, por me acolher, pelo fornecimento da estrutura, equipamentos e materiais que são imprescindíveis para a pesquisa científica.

À agência de fomento **FAPESP**, (**Processo nº 2017/22189-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**) pela concessão da bolsa durante o período de realização do doutorado, com extensão da vigência devido à pandemia. Sem esta condição, não seria possível a dedicação ao trabalho de forma completa.

RESUMO

Sabe-se que o estado nutricional afeta a reprodução, pois uma quantidade adequada de energia é necessária para o início da puberdade e a fertilidade. A regulação da ingestão alimentar é modulada pela leptina, que age no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH), inibindo a síntese de neurotransmissores orexígenos neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado com Agouti (AgRP) e estimulando os anorexígenos pró-opiomelanocortina (POMC). No ARH, encontram-se também a população de neurônios kisspeptinérgicos, considerados os neuromoduladores mais importantes dos neurônios que sintetizam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Estudos eletrofisiológicos evidenciaram que as kisspeptinas são capazes de excitar diretamente os neurônios POMC e, inibir os neurônios AgRP. No entanto, os mecanismos neurais pelos quais a homeostase energética afeta a reprodução não são completamente elucidados. O objetivo do trabalho foi verificar se o jejum de 24 horas afeta as funções reprodutivas mediante a modulação da atividade de neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos. Utilizamos estratégias neuroanatômicas e eletrofisiológicas para determinar os efeitos do jejum ou da restrição calórica, em inglês *food restriction* (FR), sobre o ciclo estral e fertilidade. Fêmeas adultas foram individualizadas e mantidas em dieta *ad libitum* (controle), submetidas ao jejum por 24 horas, ou submetidas a FR de 60%. Um subgrupo dos animais foi alimentado *ad libitum* após os testes (jejum ou FR). As fêmeas do grupo jejum e FR apresentaram mudanças significativas no peso corporal e ciclo estral, mas sem alterações na reprodução. O jejum induziu aumento da expressão de c-Fos no ARH, mas sem colocalização com neurônios kisspeptinérgicos. No ARH, o jejum induziu a redução de genes como *Kiss1*, *Cartp*, *Th* e *Pomc* e o aumento da expressão dos genes *Agrp* e *Npy*. Além disso, o jejum suprimiu o pico de secreção do hormônio luteinizante (LH) esperado na tarde de proestro e, induziu o aumento significativo do hormônio folículo estimulante (FSH), sem correlação direta com modificações esperadas no ciclo estral. Para determinarmos se as alterações observadas eram acompanhadas por modulação da atividade de neurônios kisspeptinérgicos realizamos experimentos eletrofisiológicos. Não foram observadas alterações significativas na atividade de neurônios kisspeptinérgicos do núcleo anteroventral periventricular e periventricular anterior (AVPV/PeN). No entanto, ao registrarmos as correntes pós-sinápticas inibitórias (sIPSC) em células kisspeptinérgicas do ARH de fêmeas, verificamos que o jejum diminuiu a frequência e amplitude das sIPSC, sugerindo que o jejum é suficiente para modular a transmissão GABAérgica que atua sobre neurônios kisspeptinérgicos do ARH de fêmeas. Demonstramos ainda que a administração

de neuropeptídeo Y (NPY, 100nM) em fêmeas mantidas com ração *ad libitum* induz a hiperpolarização do potencial de membrana apenas de neurônios kisspeptinérgicos do ARH, sendo esse efeito bloqueado por antagonistas de receptores GABAérgicos, glutamatérgicos e tetrodotoxina. Nossos achados sugerem que neurônios kisspeptinérgicos do ARH compõem a via neural através da qual alterações de gasto energético são transmitidas ao eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

Palavras-chave: Eletrofisiologia. Hipotálamo. Kisspeptina. Gasto energético. Reprodução

ABSTRACT

It is well known that nutritional status affects the reproduction, since an adequate amount of energy is necessary for puberty onset and fertility. The regulation of food intake and energy balance are modulated by leptin, which acts primarily on the arcuate nucleus (ARH), inhibiting the synthesis and secretion of orexigen neurotransmitters neuropeptide Y (NPY) and the Agouti-related peptide (AgRP) and stimulating the proopiomelanocortin (POMC). In ARH, there is also the population of kisspeptin neurons, which are considered the most important neuromodulator of gonadotrophin releasing hormone neurons (GnRH). Electrophysiological studies have shown that kisspeptins are able to directly excite POMC neurons and to indirect inhibit AgRP neurons. However, the neural mechanisms which control of food intake and reproduction have not yet been elucidated. In the present study we used neuroanatomic strategies, electrophysiological and genetically modified animals to determine the effects of fasting or food restriction (FR) on the estrous cycle and fertility. Adult females were individualized and maintained on an *ad libitum* diet (control) or fasted for 24 hours, or individualized and maintained on *ad libitum* chow or submitted to 60% FR. A subgroup of animals was fed *ad libitum* after testing (fasting or FR). Females in the fasting and FR groups showed significant changes in body weight and estrous cycle, but without changes in reproduction. Fasting induced an increase in c-Fos expression in ARH, but without colocalization with kisspeptinergic neurons. In ARH, fasting induced the reduction of genes such as *Kiss1*, *Cartp*, *Th* and *Pomc* and increased the expression of *Agrp* and *Npy* genes. In addition, fasting suppressed the peak of luteinizing hormone (LH) secretion expected in the afternoon of proestrus and induced a significant increase in follicle stimulating hormone (FSH), without direct correlation with expected changes in the evaluation of the estrous cycle. To determine whether the observed changes would be sufficient to modulate the activity of kisspeptinergic neurons, we performed electrophysiological experiments. In general, no significant changes were observed in the activity of kisspeptinergic neurons in the anteroventral periventricular and anterior periventricular nucleus (AVPV/PeN). However, when we recorded inhibitory postsynaptic currents (sIPSC) in female ARH kisspeptinergic cells, we found that fasting decreased the frequency and amplitude, suggesting that fasting is sufficient to modulate the GABAergic transmission that acts on ARH kisspeptinergic neurons of females. In addition, we also demonstrated that the administration of neuropeptide Y (NPY, 100nM) induces membrane potential hyperpolarization only of ARH kisspeptinergic neurons, this effect being blocked

by GABAergic, glutamatergic receptor antagonists. Our findings suggest that ARH kisspeptinergic neurons compose the neural pathway through which changes in energy expenditure are transmitted to the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

Keywords: Electrophysiology. Hypothalamus. Kisspeptin. Energy expenditure. Reproduction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ação da leptina no núcleo arqueado	21
Figura 2. O jejum exerce ações sobre o hipotálamo que são transmitidas ao eixo reprodutivo	22
Figura 3. Organograma representando o protocolo para avaliação dos efeitos do jejum sobre o ciclo estral e fertilidade	25
Figura 4. Organograma representando o protocolo para avaliação dos efeitos da restrição calórica sobre o ciclo estral e fertilidade	27
Figura 5. Efeitos do jejum no peso corporal e ciclo estral	35
Figura 6. Avaliação dos efeitos do jejum na fertilidade, peso uterino e adiposidade	36
Figura 7. Avaliação dos efeitos da restrição calórica no consumo alimentar, peso corporal e ciclo estral	37
Figura 8. Avaliação dos efeitos da restrição calórica no ciclo estral	38
Figura 9. Avaliação dos efeitos da restrição calórica na fertilidade e adiposidade corporal	39
Figura 10. Avaliação da expressão da proteína Fos e da expressão da kisspeptina em animais do grupo controle e submetidos ao jejum	41
Figura 11. Efeito do jejum sobre a expressão genes dos núcleos Anteroventral Periventricular (AVPV) e arqueado (ARH)	43
Figura 12. Efeitos do jejum na atividade neuronal dos núcleos kisspeptinérgicos localizados nos núcleos periventricular anteroventral e periventricular rostral (AVPV/PeN)	46
Figura 13. Efeitos do jejum na atividade neuronal dos neurônios kisspeptinérgicos localizados no núcleo arqueado do hipotálamo	47
Figura 14. Efeitos do neuropeptídeo Y sobre os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN	48
Figura 15. Efeitos do neuropeptídeo Y sobre os neurônios kisspeptinérgicos do ARH	50
Figura 16. Efeitos do neuropeptídeo Y sobre os neurônios kisspeptinérgicos de fêmeas em jejum	51
Figura 17. Efeitos do neuropeptídeo Y sobre os neurônios kisspeptinérgicos do ARH de machos	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso uterino, dosagem hormonal conforme a citologia vaginal	44
Tabela 2: Potencial de membrana (RMP) e resistência de membrana (IR) dos neurônios kisspeptinérgicos	45

LISTA DE SIGLAS

ACSF - Fluido cerebrospinal
AgRP - Peptídeo relacionado ao Agouti
ARH - Núcleo Arqueado
AVPV/PeN - Núcleo Anteroventral Periventricular e Periventricular anterior
Cart - Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina
DMN – Núcleo Dorsomedial Hipotalâmico
Dyn – Dinorfina
ELISA - Ensaio Imunoenzimático
ER α - Receptor de Estrógeno Alpha
FR - *Food Restriction*, Restrição Alimentar
FSH - Hormônio Folículo-Estimulante
GFP - Proteína Verde Fluorescente
GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina
HPG - Hipotálamo-hipófise-gonadal
HrGFP- Humanized Renilla Reniformis Green
IR - Resistência de Membrana
Kiss1r –receptor de kisspeptina
KPBS - Tampão Fosfato De Potássio
LepR - Receptor de Leptina
LH - Hormônio Luteinizante
MC3 e MC4 - receptores de melanocortina (MC3 e MC4)
NKB - Neurocinina B
NPY - Neuropeptídeo Y
NSQ - Núcleo supraquiasmático
POMC - Pró-Opiomelanocortina
PVH - Núcleo hipotalâmico paraventricular
RMP - Potencial de membrana de repouso
RNAm - RNA mensageiro
sEPSC - Correntes Pós-Sinápticas Excitatórias
sIPSC - Correntes Pós-Sinápticas Inibitórias
SNC - Sistema Nervoso Central
TH - Tirosina Hidroxilase

VIP- Peptídeo Intestinal Vasoativo

α -MSH - Hormônio estimulador de melanócito alpha

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Animais experimentais	26
3.2. Avaliação dos efeitos do jejum sobre o peso corporal, ciclo estral, fertilidade e depósito de gordura.	26
3.3. Avaliação dos efeitos da restrição calórica sobre o ciclo estral e fertilidade	28
3.4. Determinar se o jejum induz a expressão da proteína Fos em neurônios Kiss129	
3.5. Verificar se o jejum modula a expressão de RNAm de determinadas áreas hipotalâmicas	30
3.5.1 Extração do RNA e preparação do cDNA	31
3.6. Dosagem hormonal	32
3.8. Verificar os efeitos do jejum sobre as correntes pós-sinápticas inibitórias de neurônios kisspeptinérgicos	33
3.9. Avaliar o efeito do NPY sobre propriedades biofísicas de neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos	34
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Avaliação dos efeitos do jejum sobre o ciclo estral	36
5.2 Avaliação dos efeitos do jejum sobre a fertilidade, peso uterino e adiposidade	37
5.3 Avaliação dos efeitos da restrição calórica sobre o ciclo estral e fertilidade	38
5.4 Determinar se o jejum induz a expressão da proteína Fos em neurônios kisspeptinérgicos	41
5.5 Efeito do jejum sobre a expressão de genes relacionados à reprodução e ao metabolismo.	44
5.6 Avaliação dos efeitos do jejum sobre os hormônios circulantes LH e FSH.	45
5.7 Ação do jejum sobre o potencial de membrana de repouso e resistência de membrana de neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos	46
5.8 Efeito do jejum de 24 horas sobre a excitabilidade de neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN.	47
5.9 Efeito do jejum de 24 horas sobre a excitabilidade de neurônios kisspeptinérgicos do ARH.	48
5.10 Ações do NPY sobre o potencial de membrana dos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN.	49
5.11 Ações do NPY sobre o potencial de membrana dos neurônios kisspeptinérgicos do ARH.	51

5.12 Efeitos do NPY em neurônios kisspeptinérgicos no ARH de fêmeas em jejum.	53
.....	
5.13 Efeitos do NPY no núcleo ARH de machos	54
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	75
A) Mansano NDS, et al. Vasoactive intestinal peptide exerts an excitatory effect on hypothalamic kisspeptin neurons during estrogen negative feedback. <i>Mol Cell Endocrinol.</i> 2022 Feb 15;542:111532. doi: 10.1016/j.mce.2021.111532	75
B) Chaves FM et al. Effects of the Isolated and Combined Ablation of Growth Hormone and IGF-1 Receptors in Somatostatin Neurons. <i>Endocrinology.</i> 2022 May 1;163(5):bqac045. doi: 10.1210/endocr/bqac045.	76
C) de Paula DG, et al. Distinct effects of growth hormone deficiency and disruption of hypothalamic kisspeptin system on reproduction of male mice. <i>Life Sci.</i> 2021 Nov 15;285:119970. doi: 10.1016/j.lfs.2021.	77
D) Wasinski F, et al. Growth hormone receptor in dopaminergic neurones regulates stress-induced prolactin release in male mice. <i>J Neuroendocrinol.</i> 2021 Mar;33(3):e12957. doi: 10.1111/jne.12957.	78
E) Chaves FM et al. Tumor Necrosis Factor α and Interleukin-1 β Acutely Inhibit AgRP Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus. <i>Int J Mol Sci.</i> 2020 Nov 25;21(23):8928. doi: 10.3390/ijms21238928.	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância das kisspeptinas no eixo reprodutivo

O eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) é essencial na regulação da reprodução e fertilidade. Os neurônios que sintetizam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) localizados na área pré-óptica medial modulam a regulação central da fertilidade. O GnRH estimula a síntese e liberação de gonadotrofinas hipofisárias: o hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) que por sua vez estimulam a gametogênese e síntese de esteroides pelas gônadas (Haisenleder et al. 2008). É importante destacar que os neurônios GnRH expressam o receptor ao qual as kisspeptinas se ligam, o *Kiss1r* (Messenger et al. 2005). As kisspeptinas, produto do gene *Kiss1*, são consideradas os neuromoduladores mais importantes dos neurônios GnRH, e coexpressam o receptor de estrógeno α ($ER\alpha$) (Han et al. 2005, Smith et al. 2005, Lee et al. 1996, Lehman et al. 2018). Humanos e camundongos com mutações no gene que codifica o receptor ao qual as kisspeptinas se ligam, bem como, no gene *Kiss1*, apresentam hipogonadismo hipogonadotrófico sendo inférteis, demonstrando que a interação entre as kisspeptinas e os neurônios GnRH desempenha um papel essencial na reprodução (de Roux et al. 2003, Seminara et al. 2003, Funes et al. 2003). A primeira identificação do gene *Kiss1* foi como um gene supressor de metástase em células de melanoma maligno em humanos em 1996 (Lee et al. 1996, Ohtaki et al. 2001, Stafford et al. 2002). Posteriormente, em 2001, foi descrito o peptídeo de tradução do gene *Kiss1* com 54 aminoácidos na placenta humana como um ligante endógeno do receptor GPR54, um receptor acoplado a proteína G, atualmente denominado como *Kiss1r* (Han, Gottsch et al. 2005, Lehman et al. 2018). A proteína kisspeptina é uma proteína hidrofílica que sofre uma clivagem proteolítica com uma transferência de um grupo NH₂ (amino) para a sua porção carboxi-terminal. Também foram descritos outros fragmentos menores da proteína, como a kisspeptina-10 e kisspeptina-13 (Kotani et al. 2001, Lee et al. 1996, Stafford et al. 2002, Ohtaki et al. 2001).

Neurônios kisspeptinérgicos estão localizados ou distribuídos nos núcleos periventricular anteroventral e porção rostral do periventricular anterior (AVPV/PeN), além do núcleo arqueado do hipotálamo (ARH), dentre outras áreas encefálicas (Popa SM et al. 2005, Lehman, Hileman and Goodman 2013). No AVPV/PeN, os neurônios kisspeptinérgicos são considerados essenciais na indução do pico de LH fazendo parte dos mecanismos de retroalimentação positiva no eixo reprodutivo e modulando o ciclo estral e a ovulação de roedores (Gu, Varoqueaux e Simerly, 1999, Lehman et al. 2018). Neurônios

kisspeptinérgicos do AVPV/PeN coexpressam o receptor de estrógeno α ($ER\alpha$) e possuem conexões com o núcleo supraquiasmático (NSQ), o centro de regulação dos ritmos circadianos. Estudos apontam que estímulos circadianos também podem modular o ciclo ovulatório (Gu, Varoqueaux e Simerly, 1999, Stephens et al. 2015). O NSQ sintetiza os neurotransmissores clássicos: a vasopressina (Jin et al. 1999) e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (Moore and Speh 1993, Moore et al. 2002). No período diurno ou noturno, a vasopressina aumenta os disparos de ação dos neurônios kisspeptinérgicos no AVPV/PeN, servindo como sinal de integração circadiano para o pico de LH (Piet et al. 2015). O VIP é capaz de modular a secreção de GnRH dependendo dos níveis de estradiol no sangue, envelhecimento ou hora do dia (Christian and Moenter 2008, Piet et al. 2016, Samson et al. 1981). O nosso laboratório demonstrou que o VIP atua diretamente em neurônios kisspeptinérgicos, sendo que cerca de 30% dos neurônios AVPV/PeN e 90% nos neurônios kisspeptinérgicos do ARH despolarizam mediante a administração de VIP ao banho (Mansano et al. 2022).

Adicionalmente, os núcleos AVPV/PeN recebem projeções do núcleo pré-mamilar ventral (PMv) que está localizado dorso-lateralmente ao ARH, os neurônios dessa região também expressam o receptor de $ER\alpha$ e de receptor de leptina (LepR), portanto, sofrem influências de hormônios circulantes (Simerly, 1990, Elias et al. 2000, Elias et al. 2001, Cara et al., 2020). Em ratos, lesões no PMv causaram alterações semelhantes ao efeito da diminuição da concentração de leptina via privação de alimento, o que acarreta em redução dos níveis de estradiol e LH (Gruaz et al. 1998, Terry et al. 2005). Donato e colaboradores (2011) demonstraram que animais que não expressam o LepR, sofrem atraso no início da puberdade e são inférteis. No entanto, a re-expressão específica de LepR no PMv de fêmeas restabelece o início da puberdade e fertilidade desses animais. Demonstrando a importância da sinalização da leptina no PMv para a fertilidade. Os neurônios do PMv realizam sinapses e modulam neurônios kisspeptinérgicos do AVPV e ARH, que por sua vez atuam na liberação de GnRH regulando a reprodução em camundongos fêmeas (Ross et al. 2018).

Os neurônios kisspeptinérgicos localizados no ARH co-expressam de forma robusta mais dois neuropeptídios além das kisspeptinas: a Neurocinina B (NKB) e Dinorfina (Dyn) A, por isso são denominados como neurônios KNDy (Goodman et al. 2007, Navarro et al. 2009, Lehman et al. 2010, Wakabayashi et al. 2010). Vale frisar que em humanos, não foi demonstrada a co-expressão da Dyn em neurônios kisspeptinérgicos (Hrabovszky et al. 2012, Skrapits et al. 2015, Göcz et al. 2022). Sabe-se que fibras dos neurônios

kisspeptinérgicos se projetam para a área pré-óptica e eminência mediana, estando em aposição direta com os corpos celulares e principalmente com os terminais dos neurônios GnRH, respectivamente (Canteras et al. 1994, Simonian, Spratt e Herbison 1999, Yip et al. 2015). Nos terminais dos neurônios GnRH a kisspeptina é capaz de estimular a atividade desses neurônios (d'Anglemont et al. 2008; Glanowska e Moenter 2015). Estudos eletrofisiológicos apontam que essencialmente todos os neurônios os KNDy em camundongos são excitados ou inibidos por NKB e Dyn A, respectivamente (de Croft et al. 2013, Ruka et al. 2013) e experimentos optogênicos mostram que os neurônios KNDy comunicam-se entre si para modular o GnRH (Qiu et al. 2016). As evidências apontam que os neurônios kisspeptinérgicos tanto do AVPV/PeN quanto do ARH podem influenciar diretamente as atividades dos neurônios GnRH. Estudos apontam a importância dos neurônios KNDy no controle da secreção pulsátil de LH em diversas espécies de mamíferos (Navarro et al. 2009, Jayasena et al. 2014, Han et al. 2015, Goodman et al. 2022), bem como na regulação de neurotransmissores não diretamente relacionados aos neurônios GnRH, tais como a dopamina e neuropeptídeos do núcleo ARH (Backholer et al. 2010; Fu and van den Pol 2010; Szawka et al., 2010). Contudo, vale frisar que as funções fisiológicas dos neurônios KNDy não estão completamente elucidadas.

1.2. Eixo reprodutivo e balanço energético

O estado nutricional afeta diretamente a reprodução, pois uma quantidade adequada de reserva energética é necessária para maturação sexual adequada, manutenção da ciclicidade estral e fertilidade (Roa and Tena-Sempere 2014b, Sanchez-Garrido and Tena-Sempere 2013). Entretanto, como as vias neurais que regulam o balanço energético informam o eixo HPG sobre o estado nutricional ainda não está completamente esclarecido.

A regulação da ingestão de alimentos e o balanço energético são modulados devido à ação do hormônio denominado leptina em populações hipotalâmicas específicas (Bohlen et al. 2016, Ahima et al. 1996, Cheung et al. 1997, Tena-Sempere 2007). Em situações normais o aumento dos níveis circulantes de leptina, leva a um sinal de feedback negativo no sistema nervoso central (SNC), resultando em diminuição da ingestão de alimentos e peso corporal e, aumento do gasto energético (Campfield et al. 1995, Pelleymounter et al. 1995). A leptina circulante também parece exercer uma função elementar no eixo neuroendócrino (Ahima et al. 1996, Barash et al. 1996, Chehab, Lim and Lu 1996). Em um estudo em que camundongos fêmeas pré-púberes foram tratadas com leptina recombinante, observou-se

que o início da puberdade aconteceu precocemente (Ahima et al. 1997). Por outro lado, camundongos que não secretam a leptina são obesos e além de outros problemas metabólicos, inférteis (Wu et al. 2014b). Entretanto, após a reposição da leptina, nota-se que estes animais apresentam redução da ingestão alimentar e do peso corporal, e ainda, podem recuperar a fertilidade (Chehab et al. 1996, Barash et al. 1996).

O ARH é considerado o local mais relevante onde a leptina age inibindo a síntese e/ou secreção de neurotransmissores orexígenos: neuropéptido Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao Agouti (AgRP) (Friedman 2000) e, estimulando neurônios que sintetizam a pró-opiomelanocortina (POMC). A POMC é um composto que é precursor do hormônio estimulador de melanócito (α -MSH ou *α -melanocyte-stimulating hormone*), do transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART ou *cocaine- andamphetamine- regulated transcript*), que possuem propriedade anorexígena e, além disto, atua inibindo os neurônios AgRP/NPY (Matterri et al. 2001) (**Figura 1**). Os neurônios POMC também sintetizam peptídeos bioativos, incluindo a corticotrofina que atua na manutenção do córtex adrenal (Hill et al. 2010) e a β -endorfina que influencia em diversas áreas, como no sistema metabólico, imune, cardiovascular e reprodutivo (Mc Arthur et al. 1985). Os neurônios POMC, uma vez ativados, liberam o α -MSH, que interage com os receptores de melanocortina (MC3 e MC4) levando à supressão da ingestão de alimentos e promoção do gasto energético (Cowley et al. 1999). Os neurônios POMC e AgRP/NPY têm funções contra-regulatórias sobre o controle da ingestão de alimentos, a leptina exerce respostas distintas nos neurônios que sintetizam estes peptídeos, inibindo a atividade dos neurônios AgRP/NPY e estimulando a atividade dos neurônios POMC. Dessa maneira, em situações fisiológicas, quando há maior concentração plasmática de leptina os neurônios AgRP/NPY são inibidos e os anorexígenos ficam mais ativos, diminuindo a ingestão alimentar. Porém, quando a concentração de leptina é menor, os neurônios anorexígenos não são estimulados por esse hormônio e os neurônios orexígenos deixam de ser inibidos, induzindo o aumento da ingestão alimentar (Bouret and Simerly 2004, Mizuno and Mobbs 1999, Bouret, Draper and Simerly 2004). Além disto, os peptídeos AgRP/NPY atuam como antagonista endógeno dos receptores de melanocortina, confirmando o papel conjunto de ambas populações neuronais na regulação do comportamento alimentar (Aponte, Atasoy and Sternson 2011, Cone et al. 1996, Ollmann et al. 1997).

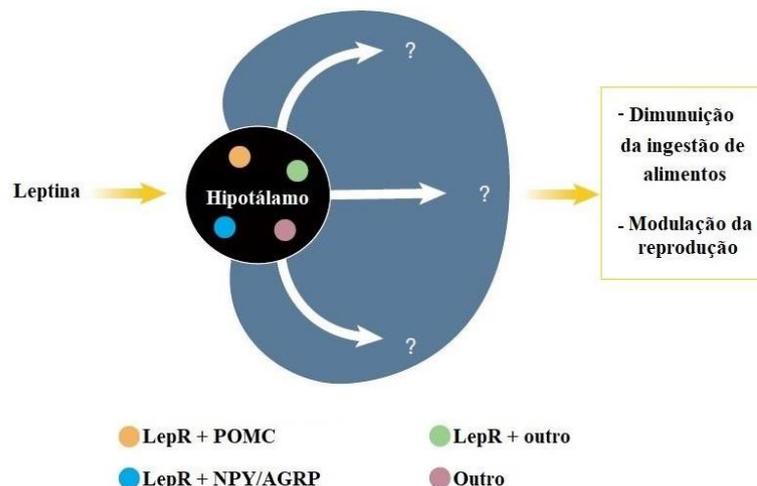


Figura 1. Ação da leptina no núcleo arqueado. A leptina atua em diferentes grupamentos neuronais no núcleo arqueado (ARH). A leptina suprime a atividade dos neurônios AgRP/NPY (orexígenos) e estimula a atividade dos neurônios POMC (anorexígenos). Assim, em situações fisiológicas, na ausência de leptina os neurônios AGRP/NPY/ são mais ativos e a ingestão de alimentos é estimulada. Quando a leptina circulante aumenta, os neurônios POMC são mais ativos e a ingestão de alimentos é reduzida. Os mecanismos neurais pelos quais esses neurônios, em última instância, alteram a ingestão de alimentos ou interferem na reprodução não são conhecidos, como representado pelos pontos de interrogação (*Modificado de Friedman, 2000*).

Diversas evidências sugerem a interação entre os neurônios kisspeptinérgicos e os neurônios que regulam a ingestão alimentar (Matsuzaki et al. 2011). Estudos eletrofisiológicos evidenciaram que as kisspeptinas são capazes de excitar diretamente os neurônios POMC e inibir os neurônios AgRP de forma indireta (Fu and van den Pol 2010). Além disso, camundongos tratados com kisspeptina-10 via intraperitoneal, reduzem o consumo alimentar, sugerindo um efeito anorexígeno deste peptídeo na ingestão alimentar (Stengel et al. 2011). Os neurônios POMC e suas fibras estão em aposição direta com neurônios kisspeptinérgicos no ARH, sendo que, o bloqueio da sinalização do α -MSH suprime a expressão do gene *Kiss1* nesta área hipotalâmica. A inibição crônica dos receptores de melanocortina (MC3 e MC4), induz um atraso da maturação sexual, e previne o efeito permissivo da leptina na puberdade (Manfredi-Lozano et al. 2016). Entretanto, o silenciamento de neurônios kisspeptinérgicos atenua de forma considerável os efeitos induzidos pela inibição dos receptores MC3 e MC4 na maturação sexual, sugerindo, portanto, que a POMC atua diretamente em neurônios kisspeptinérgicos para modular aspectos do sistema reprodutivo (Manfredi-Lozano et al. 2016). Em relação aos neurônios orexígenos, foi demonstrado que diante o silenciamento de neurônios AgRP, os neurônios kisspeptinérgicos no ARH induz a redução da frequência de correntes inibitórias registradas no ARH em fêmeas ovariectomizadas (Padilla et al. 2017). Por outro lado, a ativação crônica

de neurônios AgRP, prejudica a ciclicidade estral e diminui o índice de fertilidade dos camundongos, embora não seja suficiente para bloquear completamente a reprodução (Padilla et al. 2017). Portanto, as evidências apresentadas sugerem que a interação entre os neurônios POMC, AgRP/NPY e neurônios kisspeptinérgicos, pelo menos no ARH, representam a ligação entre o estado nutricional e o eixo reprodutivo (Fu and van den Pol 2010, Hudson et al. 2022). Além disso, neurônios kisspeptinérgicos localizados no ARH coexpressam o receptor de leptina (LepR), sendo que a ovariectomia induz um aumento significativo na coexpressão com esse receptor (Cravo et al. 2011, Cravo et al. 2013) enquanto que, em machos castrados cerca de 40% dos neurônios kisspeptinérgicos do ARH coexpressam o LepR (Smith et al. 2006). Os neurônios kisspeptinérgicos localizados no AVPV/PeN, não são diretamente responsivos à leptina, pois não coexpressam o seu receptor (Cravo et al. 2011, Cravo et al. 2013). Diante do exposto, formulamos a hipótese de que fatores que alteram a ingestão alimentar informam o eixo reprodutivo sobre o estado nutricional por meio dos neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos e essa modulação acarreta em alterações na reprodução (**Figura 2**).

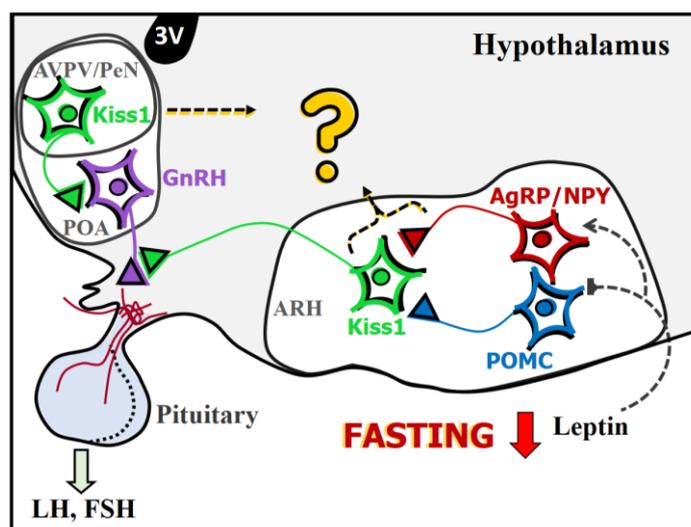


Figura 2. O jejum exerce ações sobre o hipotálamo que são transmitidas ao eixo reprodutivo. No estado de jejum, quando a leptina circulante diminui (representado pela seta vermelha), os neurônios que sintetizam o pró-opiomelanocortina (POMC) não são estimulados (linha pontilhada) e os neurônios que liberam os neurotransmissores peptídeo relacionado com Agouti (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY) deixam de ser inibidos (linha pontilhada com seta). De alguma forma, essas informações chegam ao eixo reprodutivo. Esses mecanismos neurais envolvem os neurônios kisspeptinérgicos do núcleo arqueado (ARH) e do núcleo anteroventral periventricular e periventricular anterior (AVPV/PeN) representado pelo ponto de interrogação amarelo, o que possivelmente gera alterações no ciclo reprodutivo. 3V: terceiro ventrículo; POA: área pré-óptica medial; GnRH: neurônio que sintetiza o hormônio liberador de gonadotrofinas; LH: hormônio luteinizante e FSH: hormônio foliculo-estimulante (*Modificada de Henrique R. Vieira*)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar se a atividade dos neurônios kisspeptinérgicos, e conseqüentemente do sistema reprodutivo, pode ser modulada por fatores que alteram a ingestão alimentar.

2.2. Objetivos Específicos

- 1- Avaliar os efeitos do jejum e da restrição calórica sobre o ciclo estral e fertilidade;
- 2- Determinar se o jejum induz a expressão da proteína Fos em neurônios kisspeptinérgicos;
- 3- Verificar se a expressão de genes relacionados ao metabolismo e reprodução são modificados perante ao jejum;
- 4- Analisar os efeitos do jejum nas dosagens dos hormônios LH e FSH;
- 5- Avaliar o efeito do jejum sob a excitabilidade da membrana de neurônios kisspeptinérgicos do ARH e ou AVPV/PeN;
- 6- Investigar os efeitos do NPY sobre o potencial de repouso de membrana dos neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Os seguintes animais experimentais foram utilizados:

- ✓ Camundongos selvagens da linhagem C57BL/6 provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;
- ✓ Camundongos transgênicos que expressam a proteína verde fluorescente (*Humanized Renilla Reniformis Green -hrGFP*) sob o controle transcricional do gene *Kiss1* (*Kiss1/hrGFP*) (Cravo et al. 2013, Cravo et al. 2011);

De forma geral, ao completarem três semanas, os filhotes gerados a partir de animais geneticamente modificados foram desmamados e a ponta da cauda foi cortada para a realização da genotipagem pela técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa (RTQ-PCR). Ao completarem oito semanas de idade, os animais com genótipo de interesse foram incluídos no protocolo experimental. Os animais foram alojados no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com temperatura (21-23°C) e período claro-escuro (luz 12h/escuro 12h) controlados. Todos os experimentos e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA: 107/2017).

3.2. Avaliação dos efeitos do jejum sobre o peso corporal, ciclo estral, fertilidade e depósito de gordura.

Para compreender se o jejum seria capaz de afetar o ciclo estral, fertilidade e a reprodução de camundongos, fêmeas *Kiss1/hrGFP* ou fêmeas selvagens adultas (8-12 semanas de idade) foram utilizadas nos experimentos. As fêmeas tiveram o ciclo estral avaliado diariamente no período da manhã (9:00 -10:00) através da observação do lavado vaginal. O lavado foi realizado de forma delicada por meio da inserção de uma ponteira contendo solução salina na vagina. A coleta do lavado vaginal foi depositada em lâmina histológica para análise ao microscópio de luz, e a avaliação foi feita pela identificação das fases do ciclo estral através da observação da morfologia das células do epitélio vaginal, conforme descrito (Caligioni 2009). Nos dias em que se observou a predominância de leucócitos no lavado vaginal, denominamos como fases diestro/metaestro (D/M) e quando a predominância era de células cornificadas, classificamos como estro/proestro (E/P). Apenas as fêmeas que apresentaram ciclo estral regular foram incluídas nos experimentos, sendo o

início do ciclo considerado a partir do primeiro diestro. Com o passar dos dias e com a análise do lavado vaginal observamos a mudança para fase de metaestro, proestro/estro e retornava para diestro, completando um o ciclo completo. Foram observados pelo menos três ciclos consecutivos antes do teste.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, o grupo controle e grupo jejum, sendo alojados de forma aleatória em gaiolas contendo 4-5 animais. As fêmeas do grupo jejum foram individualizadas e colocadas em jejum por 24 horas quando o segundo dia de diestro foi detectado. No momento da individualização o peso foi aferido, assim como, quando os animais retornaram para sua gaiola de origem. As fêmeas do grupo controle foram apenas individualizadas no segundo dia de diestro, sendo mantidas com comida *ad libitum*. Após o teste os animais foram agrupados em suas gaiolas de origem. Os animais foram pesados semanalmente. A análise do ciclo estral continuou por cerca de 20 dias após o teste. Em seguida, as fêmeas de ambos os grupos experimentais, foram colocadas para acasalar e permaneceram com machos experientes por um período máximo de 30 dias, ou até o momento que foi identificada a prenhez. Após o nascimento e desmame dos filhotes (21 dias após o nascimento), as fêmeas foram anestesiadas e eutanasiadas. Após eutanásia, foi realizada a coleta dos seguintes tecidos: hipotálamo, útero e depósitos de gorduras corporais para avaliação do peso.

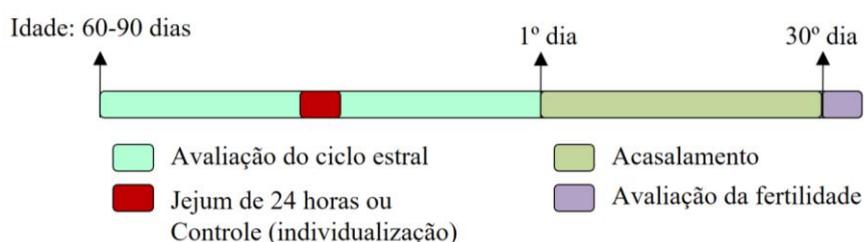


Figura 3. Organograma representando o protocolo para avaliação dos efeitos do jejum sobre o ciclo estral e fertilidade. As fêmeas foram submetidas à avaliação do ciclo estral (verde claro). Após a confirmação da ciclicidade estral as fêmeas foram isoladas por 24 horas (no segundo dia de diestro) e submetidas ao jejum ou mantidas com ração *ad libitum* (vermelho). O ciclo estral continuou sendo avaliado por cerca de 20 dias após o teste. Na sequência as fêmeas de ambos os grupos foram colocadas para acasalar com machos experientes (verde), para a avaliação dos possíveis efeitos do jejum na fertilidade (roxo). Após o desmame dos filhotes, as fêmeas foram anestesiadas e eutanasiadas.

Um subgrupo de fêmeas foi submetido ao mesmo procedimento (jejum ou controle), porém foi realizada a análise da composição corporal, antes e após o teste de 24 horas. A composição corporal foi avaliada com o uso de equipamento que realiza medidas

por ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (TD-NMR, Bruker, Alemanha). Após o teste de 24 horas os animais foram anestesiados e eutanasiados. Na sequência foi realizada a coleta dos tecidos como mencionado.

3.3. Avaliação dos efeitos da restrição calórica sobre o ciclo estral e fertilidade

Para verificar se a restrição calórica seria capaz de afetar o ciclo estral, fertilidade e a reprodução de camundongos, fêmeas Kiss1/hrGFP ou fêmeas selvagens adultas (8-12 semanas de idade) foram utilizadas nos experimentos. As fêmeas tiveram o ciclo estral avaliado diariamente, conforme descrito no tópico **3.2**, durante todo o protocolo experimental. Após a confirmação da ciclicidade estral as fêmeas foram individualizadas e tiveram seu consumo alimentar aferido por 3 dias. Com base na avaliação do peso diário da ração consumida foi feito o cálculo da média de ração consumida por cada animal. Conforme descrito anteriormente por (Furigo et al. 2019), os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: controle e restrição calórica ou do inglês *food restriction* (FR). O primeiro dia de teste foi considerado como dia zero e nos 5 dias subsequentes o peso corporal e o ciclo estral foram aferidos. As fêmeas do grupo controle receberam 100% da ração durante o teste, enquanto que as fêmeas do grupo FR receberam somente 40% do volume aferido anteriormente. A ração foi disponibilizada para os animais dos grupos controle e FR cerca de 2 horas antes do início do ciclo escuro (16:00h).

Após o período de avaliação dos efeitos da FR. As fêmeas foram colocadas para acasalar e permaneceram com machos experientes por no máximo 30 dias ou até o momento que foi detectado a prenhez. Após o nascimento e desmame dos filhotes (21 dias após o nascimento), as fêmeas foram anestesiadas e eutanasiadas. Foi realizada a coleta dos seguintes tecidos: hipotálamo, útero e depósitos de gorduras corporais para avaliação do peso.

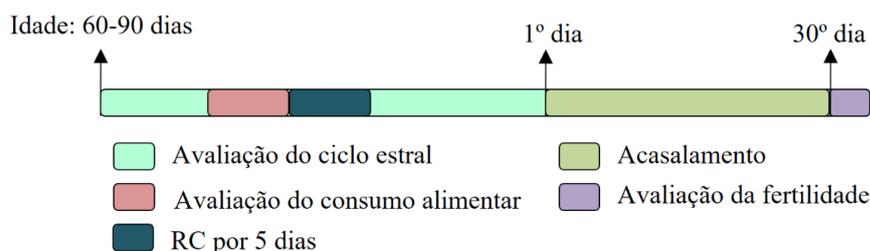


Figura 4. Organograma representando o protocolo para avaliação dos efeitos da restrição calórica sobre o ciclo estral e fertilidade. As fêmeas foram submetidas à avaliação do ciclo estral (azul claro). Após a confirmação da ciclicidade estral as fêmeas foram isoladas e o consumo alimentar foi avaliado (rosa). Na sequência os animais foram submetidos a restrição calórica (RC) ou não (grupo controle) por 5 dias (azul escuro). O ciclo estral continuou a ser avaliado por pelo menos três ciclos estrais consecutivos após o teste. Na sequência as fêmeas de ambos os grupos foram colocadas para acasalar com machos experientes (verde), para a avaliação dos possíveis efeitos da RC na fertilidade (roxo). Após o desmame dos filhotes, as fêmeas foram anestesiadas e eutanasiadas.

3.4. Determinar se o jejum induz a expressão da proteína Fos em neurônios Kiss1

Visto que a proteína Fos é considerada um marcador de atividade neuronal (Hoffman and Lyo 2002), o próximo passo foi verificar se o jejum induz a expressão da proteína Fos em neurônios kisspeptinérgicos. Fêmeas Kiss1/hrGFP adultas foram divididas em dois grupos experimentais, controle e jejum, conforme descrito no item 3.2. Após o término do teste (jejum e respectivo controle) as fêmeas foram submetidas ao procedimento de perfusão transcardíaca. Os animais foram anestesiados com isoflurano e eutanasiados no período entre 10 horas da manhã e 12 horas da tarde. Para a realização de perfusão transcardíaca foi realizada a abertura da caixa torácica fazendo o rebatimento da porção ventral do gradil costal, expondo o coração. Foi feito um pequeno corte no átrio direito para o fluxo das soluções, sendo na sequência uma agulha inserida no ventrículo esquerdo. Através de um sistema de bomba de perfusão, a solução salina a 0,9% foi perfundida por cerca de 1 a 2 minutos. Na sequência a solução salina foi substituída por uma solução de formalina 10% tamponada que foi infundida por cerca de 8 minutos. Após a perfusão, os encéfalos foram coletados e permaneceram em solução de formalina 10% por 1h (pós fixação). Na sequência foram transferidos para uma solução de crioproteção composta por tampão fosfato de potássio (KPBS) 0,02M mais 20% de sacarose, ficando em geladeira por 24-48 horas. Os encéfalos foram submetidos à microtomia, sendo seccionados em cortes coronais de 30 μ m em micrótomo (SM2010R, Leica) e organizados em quatro séries representativas. Os cortes foram colocados em solução crioprotetora composta por PBS

RNase-free, Etilenoglicol e Glicerol e armazenados em freezer a -20 °C até a realização da técnica de imunistoquímica.

Para a identificação da proteína Fos os cortes encefálicos foram lavados em solução de KPBS 0,02 por 5 minutos, repetindo a lavagem por 6 vezes. Após as lavagens os cortes foram incubados por 1 hora em solução composta por KPBS 0,02-T (Triton X-100) e 3% soro normal de burro. Em seguida os cortes foram transferidos para solução de KPBS 0,02-T com azida, 3% soro normal de burro e anticorpo primário que reconhece a proteína Fos (concentração 1:5000) por 24 horas. Após 24 horas de incubação, os cortes foram submetidos a lavagens de 5 minutos por seis vezes em solução de KPBS 0,02M. Após as lavagens os cortes foram incubados por 90 minutos em solução de KPBS 0,02-T contendo anticorpo secundário fluorescente Alexa fluor 594 (concentração 1:500). Após a incubação os cortes foram lavados 3 vezes, por 10 minutos cada, em solução de KPBS 0,02M. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e cobertos com meio de montagem Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences). Os neurônios kisspeptinérgicos foram reconhecidos por sua proteína fluorescente endógena hrGFP, conforme descrito por Cravo et al., 2013.

Para análise dos cortes foram determinados critérios de acordo com o Atlas “*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*” (PAXINOS; FRANKLIN, 2019). Neurônios que expressam hrGFP (marcador endógeno de células que expressam o gene *Kiss1*) e/ou a proteína Fos (identificados pela coloração do anticorpo Alexa fluor 594) foram quantificados nos cortes com referência nos seguintes bregmas:

- ✓ 0,50 ao 0,38 mm para a análise do AVPV;
- ✓ 0,14 ao 0,02 mm para análise do PeN;
- ✓ -1,46 ao -1,58 mm para análise do ARH nível rostral;
- ✓ -2,18 ao -2,30 mm para análise do ARH nível caudal.

Em seguida, o percentual de neurônios hrGFP que coexpressavam a proteína Fos foi calculado.

3.5. Verificar se o jejum modula a expressão de RNAm de determinadas áreas hipotalâmicas

Após a avaliação do ciclo estral das fêmeas, de acordo com item 3.2., os animais foram individualizados e submetidos ao jejum ou mantidos com ração *ad libitum*, conforme descrito. Após 24 horas, as fêmeas foram pesadas, anestesiadas e submetidas à eutanásia. Após anestesia os animais foram decapitados e o sangue foi coletado imediatamente em tubo

do tipo eppendorf *RNAse free*. Na sequência os encéfalos foram removidos e seccionados em cortes coronais utilizando um vibrátomo (Leica). Durante todo o procedimento o encéfalo ficou imerso em solução de corte composta por: Sucrose 238 mM, KCL 2.5 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ 1.0 mM, D-glucose 10 mM, CaCl₂ 1.0 mM e MgCL₂ 5.0 mM. Os cortes coronais foram definidos de acordo com as coordenadas do atlas “*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*”, conforme descrito anteriormente (Silveira et al., 2017):

- ✓ 0,62 a 0,38 mm para a análise da área pré-óptica medial (POA) com a espessura de 250µM;
- ✓ -1,70 mm a -2,40 mm para análise da área hipotalâmica médio basal com a espessura de 1000µM;

Após a obtenção dos cortes, as áreas de interesse foram submetidas a microdissecção com o auxílio de uma agulha de 18G x 1’’ em uma superfície estéril, as regiões específicas foram removidas bilateralmente, armazenadas em tubo do tipo eppendorf *RNAse free* e congeladas no freezer a -80°C para posterior extração do RNA.

3.5.1 Extração do RNA e preparação do cDNA

O RNA total das amostras dos núcleos hipotalâmicos foi extraído com a utilização do kit de isolamento PicoPure RNA, de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher *Scientific, Waltham, MA, USA*). A integridade do RNA extraído foi quantificada por espectrometria (*NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific*). Em seguida, foi utilizado 0,25 µg de RNA para a preparação do cDNA. Para isso, foi utilizado o kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher *Scientific*), no qual foram adicionados às amostras 20 µl de 5x Buffer, 10 µl de DTT, 20 µl de dNTP (10mM), 10 µl de Random primer (pdN6) (*Roche Applied Science*), 20 µl de H₂O Depc e 1 µl de SuperScript II Reverse Transcriptase. As amostras foram incubadas no termociclador por 10 minutos à 25°C, 50 minutos à 42 °C, 10 minutos à 72°C e mantidas à 4°C. Ao final, as amostras de cDNA foram armazenadas em freezer -20 °C.

A partir do *cDNA*, as amostras foram preparadas em duplicatas e o protocolo variou de acordo com a enzima de interesse:

- ✓ Enzima SYBR® Green (*Applied biosystems Thermo Fisher Scientific*) o protocolo utilizado por amostra foi de: 6,25 ulSYBR green; 3,25 ul H₂O DEPC; 1,5ul mix de primers (sense and antisense 1:1) e 1,5ul de amostra de cDNA.

- ✓ Enzima TaqMan® (*Applied biosystems*) por amostra foi utilizado: 6,25ul Taqman Buffer; 4,35ul H₂O DEPC; 0,4ul primers Taqman e 1,5 ul de amostra de cDNA.

A partir do cDNA gerado, foi determinada a expressão do RNAm que codifica genes específicos com a utilização da enzima SYBR® Green ou TaqMan PCR Master Mixes (*Applied Biosystems*). Os seguintes genes foram avaliados: *Actb* (forward: gctccggcatgtgcaaag; reverse: catcacaccctggtgccta), *Agrp* (forward: ctttggcggaggtgctagat; reverse: aggactcgtgcagccttacac), *Cartpt* (forward: cagtcacacagcttcccgat; reverse: cagatcgaagcgttgcaaga), *Gnrh1* (forward: gggttctgccatttgatccac; reverse: cccttgacttccacatcc), *Kiss1* (forward: gattcctttcccaggcatt; reverse: ggcaaaagtgaagcctggat), *Npy* (forward: cagatactactccgctctgcg; reverse: gggctggatctctgccata), *Pomc* (forward: tagatgtgtggagctggtgc; reverse: ccagcgagaggtcgagtttg), *Ppia* (forward: cttcttgctggtcttgccattc; reverse: tatctgcactgccaagactgagt), *Th* (*TaqMan assay; Mm00447557_m1; Thermo Fisher Scientific*).

As placas contendo as amostras e genes de interesse foram analisadas na máquina 7500 Real Time PCR System (*Applied biosystems*) e a quantidade relativa de RNAm foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.6. Dosagem hormonal

Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 4000 rpm em temperatura a 22°C por 10 minutos. Foi coletado o sobrenadante, o soro sanguíneo, e armazenado em eppendorf *RNAse free* a -80°C. Para determinação das concentrações de LH e FSH foram utilizados kits de ensaio imunoenzimático (ELISA), em colaboração com o laboratório do Professor Dr. José Donato Júnior. Os ensaios de ELISA foram adaptados de protocolos publicados (Brown et al. 2019, Ongaro et al. 2021). As dosagens de LH e FSH apresentam limite inferior de detecção de 0,009 ng/mL e 0,34 ng/mL, respectivamente, considerando os fatores de diluição utilizados (5x para LH e 10x para FSH) (de Paula et al. 2021, Gusmao et al. *Dados não publicados*)

3.7. Avaliar o efeito do jejum sobre a excitabilidade da membrana de neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos

Fêmeas *Kiss1/hrGFP* (8-12 semanas de idade) foram mantidas com ração *ad libitum* (controle) ou submetidas ao jejum por 24 horas (conforme descrito no item 3.2.), foram

anestesiadas e eutanasiadas no período entre 10:00-11:00h. Os encéfalos foram removidos e seccionados em cortes coronais (250 μ M) imersos em solução de corte contendo: Sacarose 238 mM, KCL 2.5 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ 1.0 mM, D-glucose 10 mM, CaCl₂ 1.0 mM e MgCL₂ 5.0 mM, com o auxílio de um vibrátomo (Leica). Na sequência os cortes foram incubados em fluido cérebro-espinhal oxigenado (ACSF) contendo: NaCl 124 mM, KCl 2.8 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, MgSO₄ 1.2 mM, D-glucose 5mM e CaCl₂ 2.5 mM por pelo menos 1 hora antes do início dos experimentos eletrofisiológicos. Os cortes encefálicos foram transferidos (um por vez) para uma câmara de registro acoplada ao microscópio na qual o corte foi adaptado por cerca de 10 minutos antes do início do registro. Na câmara de registro os cortes foram continuamente banhados com solução ACSF oxigenada (30°C) em um fluxo de aproximadamente 2 ml por minuto. Os neurônios foram identificados por sua proteína fluorescente endógena hrGFP com o uso da microscopia de fluorescência. Após a identificação dos neurônios, utilizamos fonte de luz infravermelha com contraste de interferência diferencial (Leica MD 6000 FS, microscópio equipado com plataforma fixa e câmera digital de fluorescência monocromática de alta velocidade Leica DFC360) para obtermos o selamento e rompimento da membrana celular. A pipeta contendo o eletrodo de registro foi preenchida com uma solução interna composta por: K-gluconato 120mM, NaCl 1mM, EGTA 5mM, Hepes 10mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 1mM, KOH 3mM e KCL 10 mM). A pipeta foi acoplada a um pré-amplificador e apresentou a resistência de acesso entre 5-7 M Ω . A frequência e amplitude das correntes pós-sinápticas excitatórias (sEPSC) que atuam sobre os neurônios kisspeptinérgicos foram realizadas mantendo a voltagem a -65mV e analisadas com o programa Mini Analysis (Synaptosoft Inc.).

3.8. Verificar os efeitos do jejum sobre as correntes pós-sinápticas inibitórias de neurônios kisspeptinérgicos

Após a obtenção dos cortes coronais do grupo controle ou jejum, conforme descrito no item **3.7.** os registros das correntes pós-sinápticas inibitórias (sIPSC) foram realizados mantendo a voltagem a -60mV. Para aumentar a força motriz para os íons de cloreto, foi utilizada uma solução interna de cloreto isotônico composta por: KCl 140 mM, HEPES 10 mM, EGTA 5 mM, CaCl₂ 0.1 mM, NaOH 8.5 mM, (Mg) -ATP 4 mM, (Na) -GTP 0.4 mM, pH 7.3 (Zampieri et al. 2020). Foi adicionado ao ACSF de registro as seguintes drogas: 6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, 10 μ M) e D-2-amino-5-fosfonopentanoato (AP5, 50 μ M), antagonistas dos receptores de glutamato AMPA e NMDA, respectivamente.

Com a adição dessas drogas ao ACSF sugere-se que os receptores ionotrópicos de GABA são responsáveis pelas sIPSC registradas. Os registros eletrofisiológicos foram gravados utilizando amplificador multiclamp 700B (Molecular Devices), com filtros entre 2-4 kHz. Os experimentos foram realizados no *whole-cell patch-clamp*, no modo *voltage-clamp*. A frequência e amplitude das sIPSC e sEPSC que atuam sobre os neurônios kisspeptinérgicos foram analisadas com o programa *Mini Analysis* (Synaptosoft Inc.).

3.9. Avaliar o efeito do NPY sobre propriedades biofísicas de neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos

Para determinarmos os efeitos do NPY no RMP e IR de neurônios kisspeptinérgicos utilizando a técnica de *whole-cell patch-clamp* no modo *current-clamp*, com corrente igual a zero ($I=0$). A concentração do NPY (100nM) administrado foi baseada em estudo anterior (Hessler et al. 2020). Fêmeas e machos Kiss1/hrGFP adultos (8-12 semanas de idade) mantidos com ração *ad libitum* foram selecionados para os experimentos. O efeito do NPY sobre o RMP e IR também foi avaliado em fêmeas submetidas ao jejum de 24 horas. Foram realizados os registros basais da RMP e IR por pelo menos 10 minutos seguido pela administração do NPY (100 mM 2ml/min por cerca de 5 minutos), sendo o experimento encerrado após um período de *washout*, cerca de 10 minutos. A análise dos dados foi realizada com uso do software Clampfit (Molecular Devices), conforme descrito anteriormente (Silveira, et al. 2017). A IR foi avaliada medindo-se a deflexão de tensão no final da resposta a um pulso de corrente retangular hiperpolarizante (500 ms de -10 a -30 pA). Os valores de potencial de membrana foram compensados para levar em conta o potencial de junção (-8 mV). A frequência de PA (*fAps*) foi determinada comparando-se as taxas médias de disparo 2 minutos antes e 2 minutos depois da droga. As *fAps* foram analisadas com programa o Mini Analysis Program (Synaptosoft, Decatur, GA, EUA).

Para verificarmos se os efeitos NPY dependem de potenciais de ação (APs) mediados por transmissão sináptica, foram realizados registros eletrofisiológicos, sendo os cortes mantidos em ACSF contendo o coquetel: tetrodotxina (TTX, 1 μ M); antagonista dos receptores de glutamato AMPA: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, 10 μ M, 2-amino-5-fosfonovalerato (AP-5, 50 μ M); antagonista dos receptores de glutamato NMDA: D-2-amino-5-fosfonopentanoato (AP5, 50 μ M) e antagonista de GABA: picrotoxina (50 μ M). As concentrações de TTX e de antagonistas de receptores de glutamato e de GABA foram baseadas em estudos anteriores que demonstraram a capacidade de bloquear a

condutância de Na⁺ (Berg, et al. 2018; Frazao, et al. 2013; Piet et al. 2016). O TTX foi obtido de Alomone Labs; CNQX, AP-5, picrotoxina e NPY foram adquiridos da Tocris Bioscience.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos pela média \pm erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste *t student* não-paramétrico nas comparações de dois grupos (controle e jejum ou controle e FR). Para avaliação temporal do peso corporal, consumo de ração, a RMP e IR das células foi utilizado teste não-paramétrico e a análise de variância (ANOVA) de um fator. As diferenças nos valores de $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism®, *version 7*, USA.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação dos efeitos do jejum sobre o ciclo estral

Na análise dos resultados, verificamos que a individualização dos animais do grupo controle, não influenciou o peso corporal, massa magra e gordura corporal dos animais (**Figura 5A-C**). Contudo, as fêmeas submetidas ao jejum apresentaram diminuição significativa do peso corporal, da massa magra e gordura corporal em relação ao momento anterior ao teste de jejum por 24 horas (**Figura 5A-C**). Na análise do ciclo estral observamos que a duração média do ciclo estral foi maior no grupo submetido ao jejum em comparação ao grupo controle, evidenciando que o jejum agudo de 24 horas foi suficiente para alterar o ciclo estral (**Figura 5E**). Fêmeas submetidas ao jejum permaneceram mais dias na fase de diestro em comparação ao grupo controle (**Figura 5D e C**).

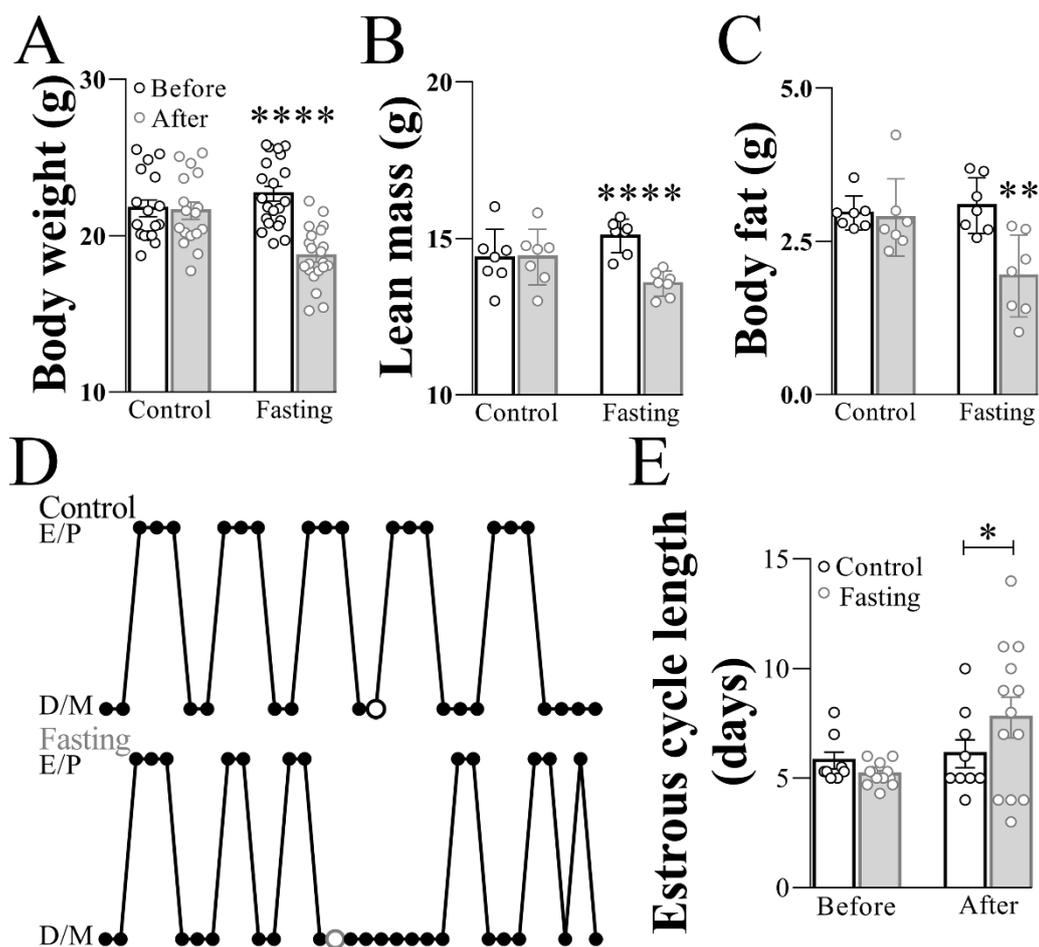


Figura 5. Efeitos do jejum no peso corporal e ciclo estral. (A) Gráficos de barras comparando peso corporal, (B) massa magra, e (C) gordura corporal de camundongos do grupo controle e em jejum (n=17/21). (D) Representação da avaliação diária do ciclo estral (uma fêmea por grupo), em que o círculo aberto representa o dia em que os animais foram isolados e submetidos a jejum de 24h ou mantidos com ração *ad libitum*. (E) A duração do ciclo estral foi determinada avaliando o número de dias em que a predominância de células cornificadas (E/P) ou leucócitos (D/M) foi detectada no esfregaço vaginal (n = 12/13 animais por grupo). Média ± SE, * P <0,05; ** P <0,03; **** P <0,0001.

5.2 Avaliação dos efeitos do jejum sobre a fertilidade, peso uterino e adiposidade

Em um novo subgrupo de controle e jejum, três semanas após o teste, as fêmeas foram colocadas para acasalar e permaneceram com machos experientes por cerca de 30 dias, ou até o momento que foi detectada a prenhez. O primeiro parâmetro avaliado foi o percentual de prenhez. Notamos que, cerca de 86% das fêmeas do grupo controle (12 de 14 animais) e cerca de 85% das fêmeas do grupo jejum (11 de 13 animais) ficaram prenhas. Evidenciando que o jejum foi insuficiente para alterar a fertilidade das fêmeas (**Figura 6A**). O período entre o início do acasalamento até o nascimento das ninhadas e o número de filhotes gerados foram semelhantes entre os grupos (n= 12/11 fêmeas por grupo experimental; **Figura 6B, C**). Após o desmame dos filhotes as fêmeas foram submetidas à

eutanásia, o útero foi coletado e pesado à fresco, sendo que, não observamos diferenças do peso uterino entre grupos (**Figura 6D**). Ao final do protocolo experimental, cerca de 30 dias após o teste, observamos que os depósitos de gordura corporal das fêmeas do grupo jejum eram similares ao grupo controle (**Figura 6E**).

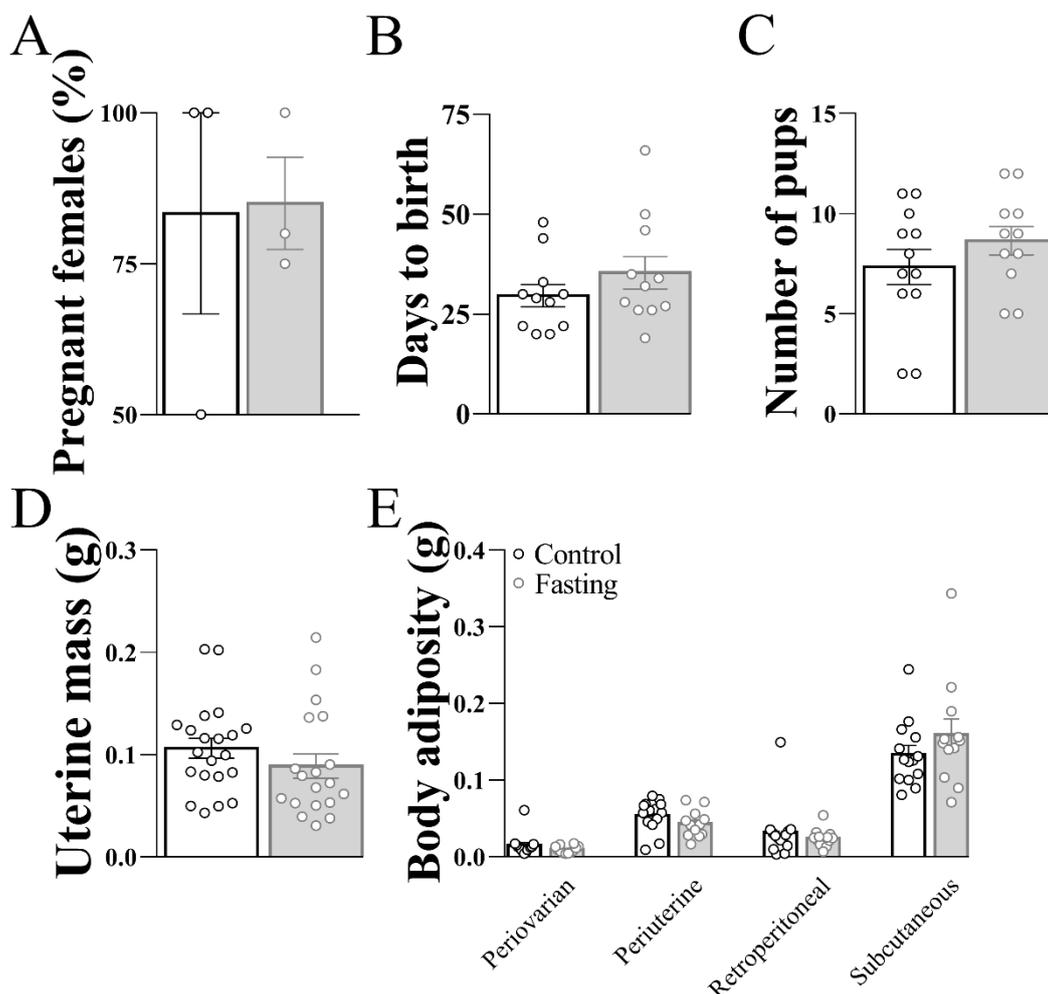


Figura 6. Avaliação dos efeitos do jejum na fertilidade, peso uterino e adiposidade. (A) Gráfico de barras evidenciando o percentual de prenhes entre animais do grupo controle ou submetidos ao jejum (n=14/13 por grupo) **(B)** Gráfico de barras demonstrando o tempo (em dias) até o nascimento dos filhotes (n= 12/12 por grupo) e o **(C)** número de filhotes gerados por ninhadas (n= 11/11 por grupo). **(D)** Gráfico de barras representando o peso uterino de fêmeas controle ou submetidas anteriormente ao jejum de 24h (n= 21/19 por grupo). Média \pm erro padrão.

5.3 Avaliação dos efeitos da restrição calórica sobre o ciclo estral e fertilidade

Para facilitar a análise dos possíveis efeitos da individualização ou FR sobre o peso corporal, ciclo estral, e fertilidade, dividimos a descrição do protocolo experimental em três

momentos: pré-teste, teste e pós-teste. No período do pré-teste, observamos que peso corporal ou consumo diário de ração não diferiu entre as fêmeas do grupo controle ou FR (n= 6/6 por grupo; **Figura 7A, B**). As fêmeas do grupo controle não apresentaram diferença no peso corporal durante todo o período de avaliação. Contudo, durante o período do teste, as fêmeas submetidas a FR de 60% apresentaram diminuição gradativa do peso corporal, sendo a perda de peso significativa a partir do dia 3 do início da FR (P= 0,0411; **Figura 7A, B**). Após a reintrodução alimentar com 100% da ração, período pós-teste, as fêmeas submetidas a FR recuperaram rapidamente o peso corporal no período de pós-teste (P= 0,6991; n= 6/6 por grupo). Além disso, as fêmeas submetidas à FR aumentaram o consumo alimentar de maneira significativa em relação aos animais do grupo controle (P= 0,0022; n= 6/6 por grupo, **Figura 7A, B**).

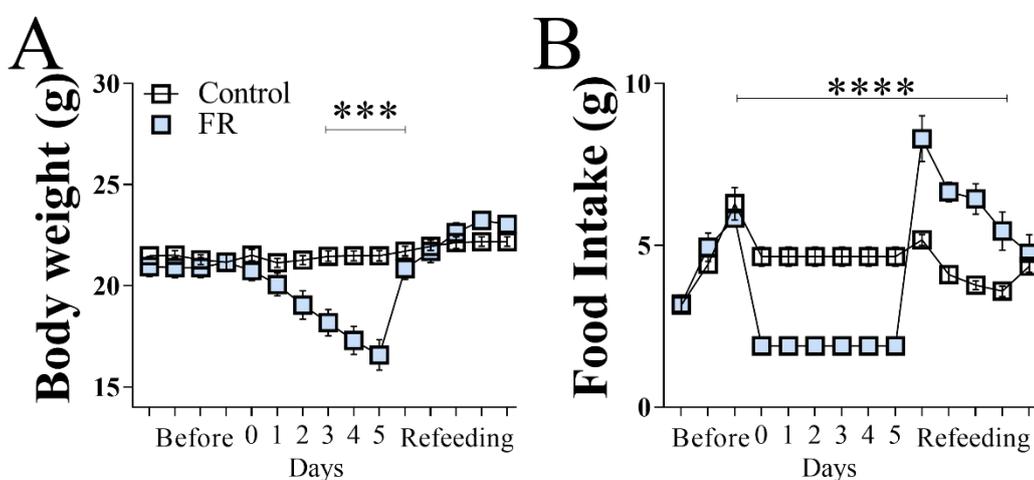


Figura 7. Avaliação dos efeitos da restrição calórica no consumo alimentar, peso corporal e ciclo estral. (A) Avaliação temporal do peso corporal antes, durante e 5 dias após o teste. **(B)** Avaliação temporal do consumo da ração dos animais mantidos com ração *ad libitum* (Controle) ou submetidos à restrição calórica de 60% (FR). (n= 10/9 por grupo). Média \pm erro padrão, *** P<0,0006, **** P<0,0001.

Na análise do ciclo estral no período pré-teste, observamos que o percentual de dias em que as fases de E/P ou D/M foram detectadas foram semelhantes entre os grupos experimentais. Demonstrando desta forma, que as fêmeas de ambos os grupos experimentais apresentavam um padrão similar de ciclicidade estral antes do teste experimental. Durante o período do teste, o padrão de ciclicidade estral permaneceu semelhante entre os grupos experimentais (**Figura 8A**). Por outro lado, na análise do lavado vaginal no período do pós-teste, as fêmeas submetidas à FR apresentaram aumento significativo dos dias em que

leucócitos foram identificados no lavado vaginal (**Figura 8A, B**). Sugerindo uma interrupção temporária do ciclo estral durante a FR e o espaçamento maior entre as fases do ciclo estral devido a FR de 60% (**Figura 8B**).

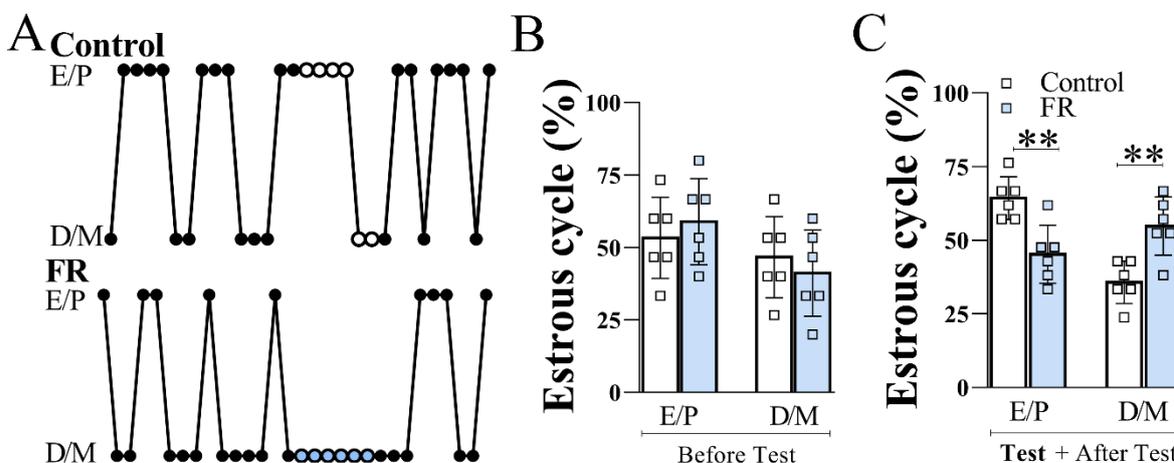


Figura 8. Avaliação dos efeitos da restrição calórica no ciclo estral. (A) Demonstração gráfica da avaliação diária do ciclo estral de um animal de cada grupo, sendo que, os dias de individualização do grupo controle são representados pelos círculos vazios e o período de restrição calórica pelos círculos azuis (n=10/9 por grupo). (B-C) Gráficos de barras demonstrando o percentual de dias em que as fases estro e proestro (E/P) ou diestro e metaestro (D/M) foram identificadas devido a análise do lavado vaginal durante o período de pré-teste (15 dias, A) e, durante o período de teste (6 dias) e pós-teste (15 dias, B). Média \pm erro padrão, ** P= 0,002.

Ao término da FR, as fêmeas foram colocadas para acasalar e permaneceram com machos experientes por no máximo 30 dias. No grupo controle, cerca de 70% das fêmeas ficaram prenhas (n= 4 de 6 fêmeas) e no grupo de FR foram 50% (n= 6 de 12 fêmeas), demonstrando que o teste de FR não afetou a fertilidade dos animais. Das fêmeas prenhas, a avaliação do período de tempo (dias) do início do acasalamento até o nascimento dos filhotes, não foi significativa entre os grupos experimentais (**Figura 9A**). Em média, o número de filhotes gerados por ninhada foi semelhante entre os grupos experimentais (P= 0,1271; n= 4/6 fêmeas por grupo; **Figura 9B**). Ao término do protocolo experimental, as fêmeas foram submetidas a eutanásia e foi realizada a coleta e pesagem dos depósitos de gorduras e do útero. Observamos que o peso uterino e os depósitos de gorduras corporais foram semelhantes entre os animais dos grupos controle e FR (**Figura 9C, D**).

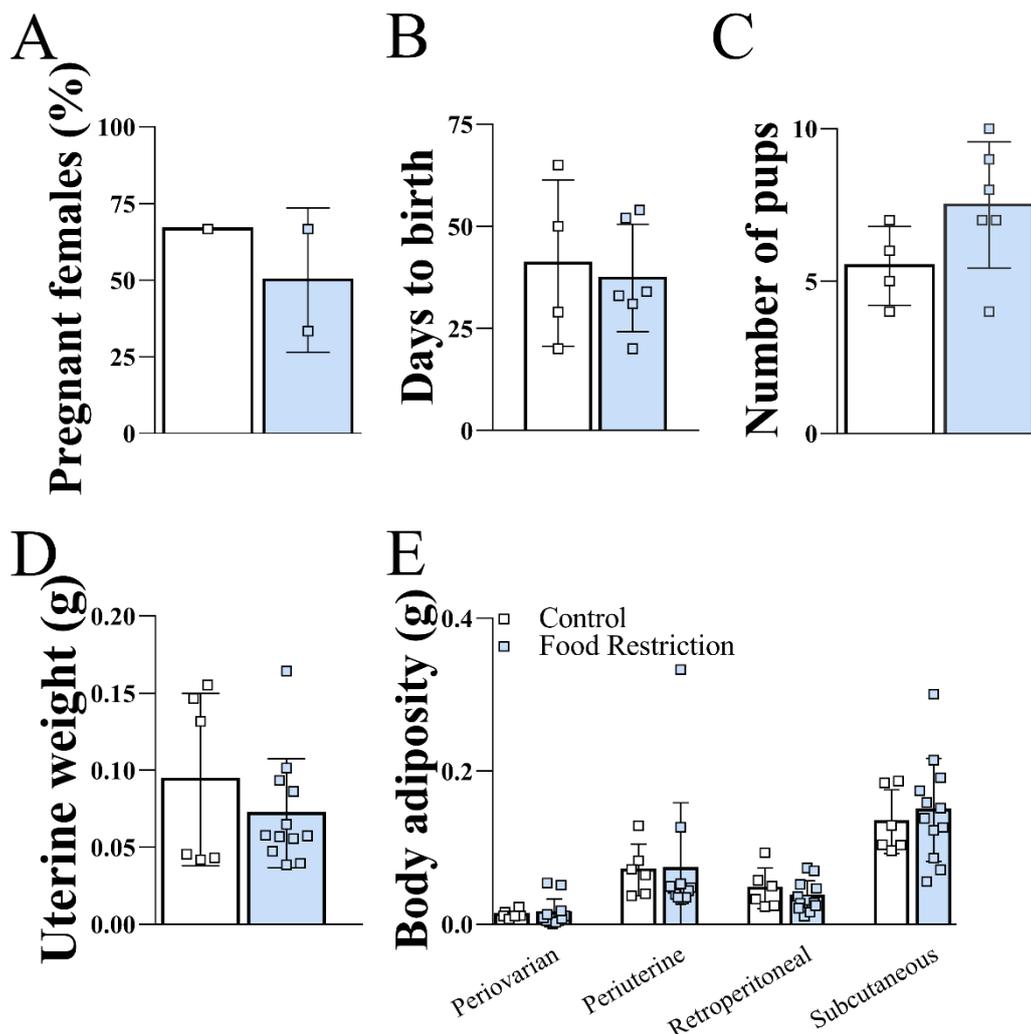


Figura 9. Avaliação dos efeitos da restrição calórica na fertilidade e adiposidade corporal. (A) Gráfico de barras evidenciando o percentual de prenhes entre animais do grupo controle ou submetidos à restrição calórica (FR) ($n= 4/6$ por grupo). (B-C) Gráfico de barras demonstrando a média de dias até o nascimento dos filhotes e o número de filhotes gerados por ninhadas ($n= 4/6$ por grupo). (C-D) Gráfico de barras demonstrando o peso uterino das fêmeas do grupo controle ou submetidas a FR e, o peso médio dos depósitos de gorduras corporal dos animais dos grupos controle e FR ($n= 6/12$ por grupo). Média \pm erro padrão.

5.4 Determinar se o jejum induz a expressão da proteína Fos em neurônios kisspeptinérgicos

Para determinarmos se o jejum 24 horas poderia induzir a expressão da proteína Fos em neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos foi realizada a técnica de imunistoquímica. No AVPV/PeN o número de neurônios imunorreativos ao anticorpo que reconhece a proteína Fos (Fos-ir) foi semelhante em ambos os grupos experimentais ($P= 0,28$; $n= 3/6$ por grupo, **Figuras 10A- B, D-F**). Contudo, no ARH, a expressão da proteína Fos aumentou de

forma significativa no grupo jejum em comparação ao grupo controle ($P < 0.001$; $n = 4/6$ por grupo, **Figura 10G-H, J-L**). O número de neurônios kisspeptinérgicos identificado pela proteína hrGFP nos núcleos AVPV/PeN ($P = 0,24$) ou ARH (rostral: $P = 0,13$; caudal: $0,7143$) foram semelhantes entre os grupos experimentais (**Figura 10C, I**). Muito embora o jejum tenha induzido o aumento significativo do número de neurônios que expressavam a proteína Fos, particularmente em um grupamento de neurônios localizados próximos ao terceiro ventrículo, observamos que os neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos não coexpressaram Fos devido ao jejum de 24 horas.

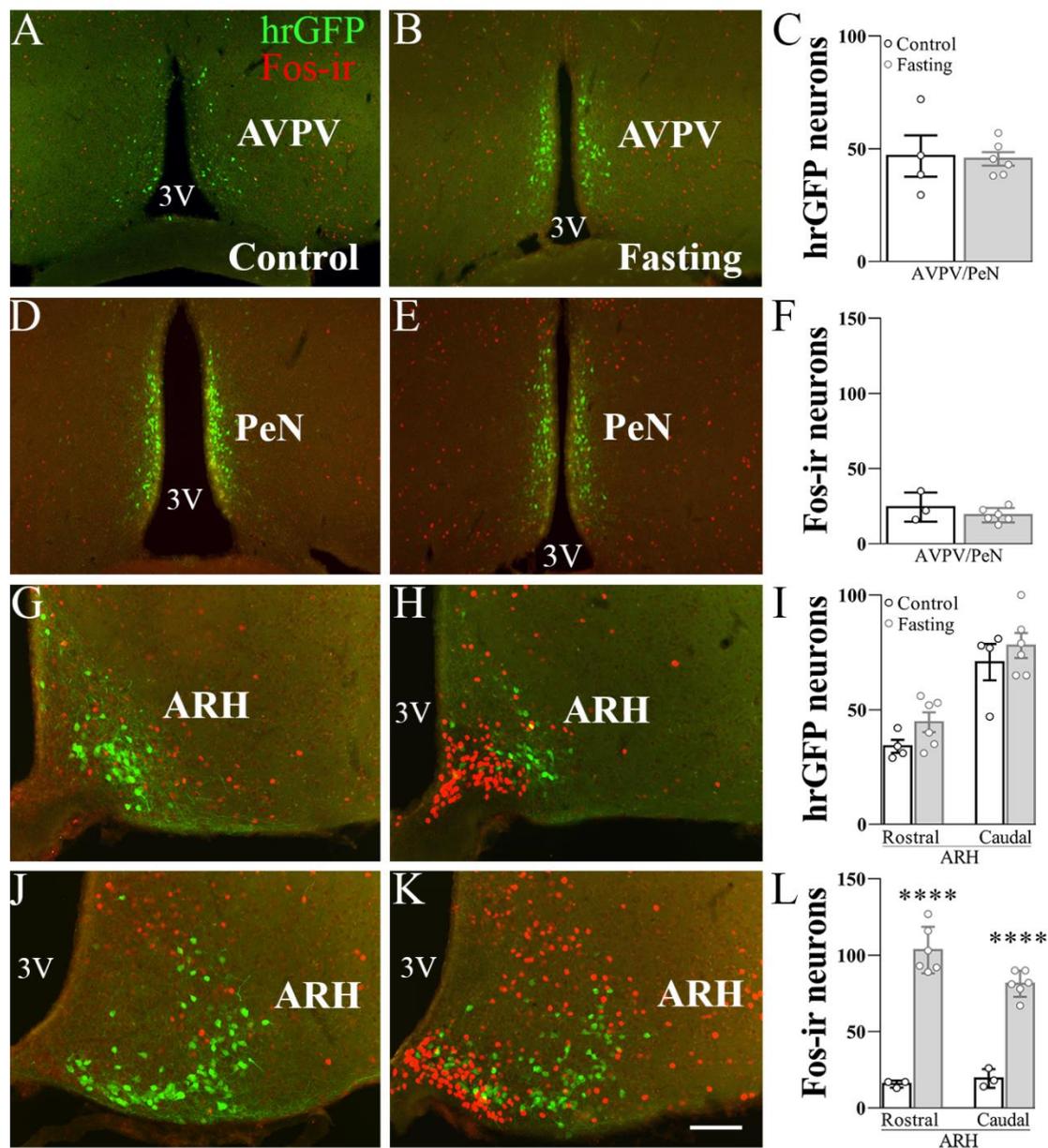


Figura 10. Avaliação da expressão da proteína Fos e da expressão da kisspeptina em animais do grupo controle e submetidos ao jejum. (A-D) Fotomicrografias de epifluorescência mostrando a distribuição de hrGFP (kisspeptina, verde) e células que expressam Fos (vermelho) nos núcleos anteroventral periventricular e periventricular anterior (AVPV/PeN) e no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH). (A, D, G, J) Fotomicrografias do grupo controle e (B, E, H, K) do grupo jejum. (C, F) Gráficos de barras comparando o número de células que expressam hrGFP e Fos no AVPV/PeN e (I, L) ARH em animais do grupo controle e jejum. 3V: terceiro ventrículo. Barra de escala: 100 μ m. (n= 4/6 por grupo); **** $P < 0.001$.

5.5 Efeito do jejum sobre a expressão de genes relacionados à reprodução e ao metabolismo.

Com o propósito de avaliar as consequências do jejum em regiões específicas do hipotálamo, em relação a genes relacionados com a reprodução (*Kiss1* e *Gnrh1*) e ao metabolismo (*Th* - tirosina hidroxilase, *Cartp*, *Agrp*, *Npy* e *Pomc*), realizamos a análise de expressão gênica por PCR-RT. A partir das microdissecções obtidas da POA, que potencialmente contém os núcleos AVPV/PeN, observamos que o jejum não foi suficiente para induzir alterações significativas na expressão dos genes *Kiss1*, *Gnrh1* e *Th* nessa região hipotalâmica (**Figura 11A-C**). Por outro lado, nas microdissecções adquiridas na área médio-basal-hipotalâmica, que potencialmente contém o ARH, observamos que no grupo submetido ao jejum a expressão dos genes *Kiss1*, *Cartp*, *Th* e *Pomc* foram reduzidos de forma significativa (**Figura 11D-F, I**). De acordo com a literatura (Ramos - Lobo et al. 2017 e Pedroso et al. 2020), a expressão dos genes *Agrp* e *Npy* aumentaram no grupo submetido ao jejum em comparação ao grupo controle (**Figura 11G-H**).

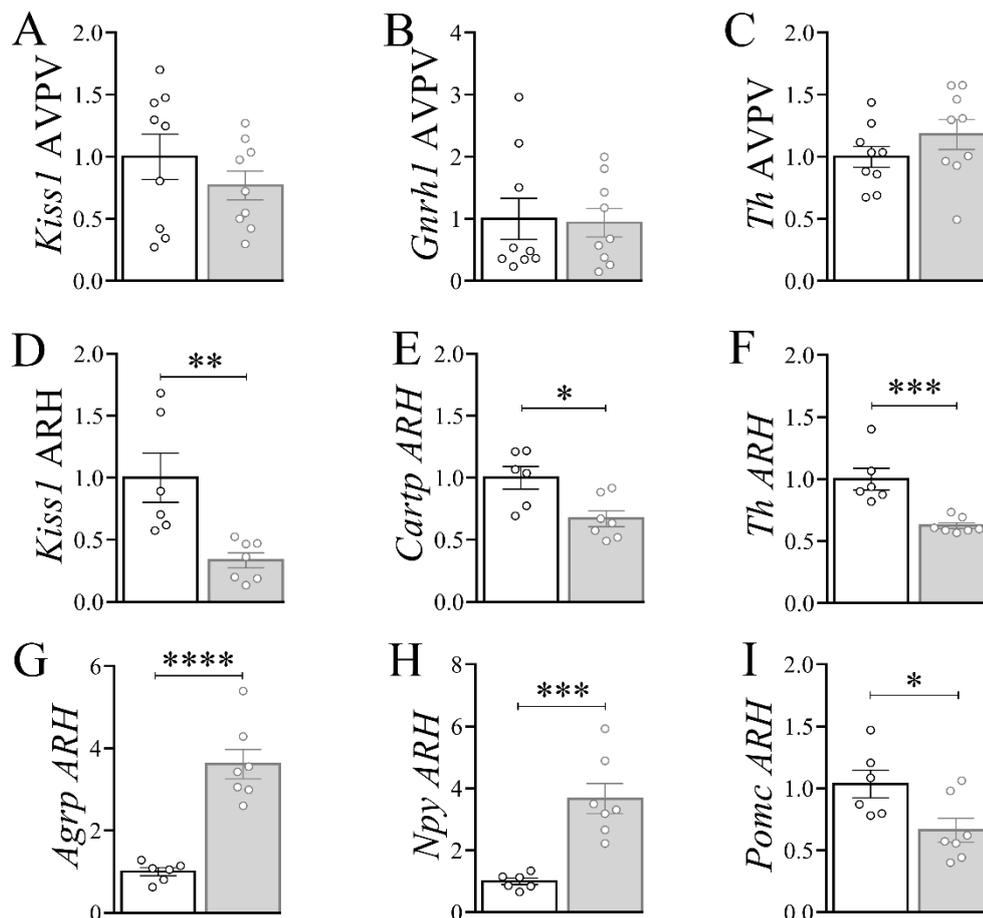


Figura 11. Efeito do jejum sobre a expressão genes dos núcleos Anteroventral Periventricular (AVPV) e arqueado (ARH). (A-C) Expressão de RNAm de *Kiss1*, *Gnrh1* e *Th* no AVPV de fêmeas do grupo controle e submetidas ao jejum de 24 horas (n=9/9 por grupo). (D-I) Expressão de RNAm dos genes *Kiss1*, *Cartpt*, *Th*, *Agrp*, *Npy* e *Pomc* do ARH de fêmeas do grupo controle e jejum (n=7 por grupo). Média \pm SEM, * P < 0,05, ** P < 0,005, *** P < 0,001, **** P < 0,0001.

5.6 Avaliação dos efeitos do jejum sobre os hormônios circulantes LH e FSH

Para determinar se o jejum exerce efeitos sobre a secreção dos hormônios gonadotróficos LH e FSH, realizamos a coleta do soro das fêmeas para dosagem hormonal. Como mencionado anteriormente os animais foram isolados e submetidos ao jejum, ou mantidas com ração *ad libitum*, quando o segundo dia de diestro foi identificado durante a avaliação do ciclo estral. Sendo a coleta do soro, portanto, realizada 24 horas após o isolamento. Nesse período observamos que a fase do ciclo estral no dia da eutanásia poderia ser diferente. Considerando a fase do ciclo estral no dia da eutanásia e a dosagem hormonal, observamos que 11 dos 17 animais do grupo controle exibiram a predominância de células cornificadas no lavado vaginal. Além disso, as fêmeas apresentaram aumento do peso uterino e dos níveis de LH, sugerindo que os camundongos estavam na fase de proestro. A

maior parte das fêmeas do grupo jejum, 11 de 15 animais, também exibiram células cornificadas no lavado vaginal, no entanto, sem alterações no peso uterino e nos níveis de LH. Curiosamente, os níveis de FSH de fêmeas submetidas ao jejum aumentaram em relação ao grupo controle, sem qualquer correlação com a citologia vaginal ou com os níveis circulantes de LH (**Tabela 1**).

Tabela 1. Peso uterino, dosagem hormonal conforme a citologia vaginal

Fêmeas	Controle	Jejum	Valor de P
<i>Citologia vaginal</i>	Cornificada (n= 11)	Cornificada (n=11)	
<i>Peso Uterino (mg)</i>	99.4 ± 8.4	60.6 ± 8.9*	0.01
<i>LH (ng/mL)</i>	2.5 ± 0.8	0.4 ± 0.1*	0.02
<i>FSH (ng/mL)</i>	0.9 ± 0.3	3.7 ± 0.2*****	< 0.0001
<i>Citologia vaginal</i>	Leucócito (n= 6)	Leucócito (n=4)	
<i>Peso Uterino (mg)</i>	47.57 ± 2.2	40.1 ± 26.9	0.3
<i>LH (ng/mL)</i>	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.8
<i>FSH (ng/mL)</i>	0.9 ± 0.3	3.3 ± 0.1*	0.02

5.7 Ação do jejum sobre o potencial de membrana de repouso e resistência de membrana de neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos

Para verificarmos se o jejum seria suficiente para modular a atividade de neurônios kisspeptinérgicos realizamos experimentos eletrofisiológicos nos quais averiguamos o RMP e IR. No grupo controle, os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN apresentaram em média a RMP de $-56,1 \pm 2,2$ mV (variação: -51 a 88 mV) e a média da IR foi de $1,6 \pm 0,09$ G Ω (0,89 a 2,1 G Ω). As células localizadas no ARH exibiram a média de RMP de $-55,03 \pm 1,2$ mV (variação de -40 a -70 mV) e IR $1,4 \pm 0,1$ G Ω (variação: 0,3 a 3,5 G Ω). Esses resultados vão de encontro com dados anteriores (Frazao et al. 2013).

Notamos que o teste de jejum de 24 horas foi seguido por hiperpolarização do RMP dos neurônios kisspeptinérgicos registrados nos núcleos AVPV/PeN, provavelmente devido ao número reduzido de neurônios registrado (Tabela 2). No entanto, no ARH, o jejum não foi suficiente para influenciar o RMP e IR dos neurônios kisspeptinérgicos (Tabela 2).

Tabela 2: Potencial de membrana (RMP) e resistência de membrana (IR) dos neurônios kisspeptinérgicos

Parâmetros	Controle	Jejum	Valor de P
AVPV/PeN	(n=10)	(n=5)	
<i>RMP (mV)</i>	-56,1 ± 2,2	-65,2 ± 3,8	P= 0,04*
<i>Input Resistance (GΩ)</i>	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2	P= 0,6
<i>WCC (pf)</i>	15,5 ± 1,7	21,9 ± 9,5	P=0,3
ARH	(n=32)	(n=26)	
<i>RMP (mV)</i>	-55 ± 1,2	-53,5 ± 1,5	P=0,44
<i>Input Resistance (GΩ)</i>	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,5	P=0,6
<i>WCC (pf)</i>	9,7 ± 0,4	9,6 ± 0,4	P=0,9

5.8 Efeito do jejum de 24 horas sobre a excitabilidade de neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN

Dando sequência aos experimentos para investigar os possíveis efeitos do jejum sobre a atividade de neurônios kisspeptinérgicos, foram realizados os registros e as análises das sEPSC e sIPSC de neurônios localizados no AVPV/PeN de camundongos fêmeas. No grupo controle, observamos que a frequência média das sEPSC foi de $0,8 \pm 0,2$ Hz e amplitude $30,3 \pm 2,1$ pA (n=13 células de 6 animais). As correntes sIPSC registradas em neurônios kisspeptinérgicos do núcleo AVPV/PeN apresentaram a frequência média de $1,8 \pm 0,5$ Hz e a amplitude de $64,8 \pm 6,0$ pA (n=11 células). Em comparação com os registros obtidos de animais do grupo controle, observamos que o jejum não foi suficiente em induzir alterações significativas tanto na frequência quanto na amplitude das sEPSC (n=16 células, **Figura 12A-C**) e sIPSC (n=15 células, **Figura 12D-F**) que atuam sobre os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN.

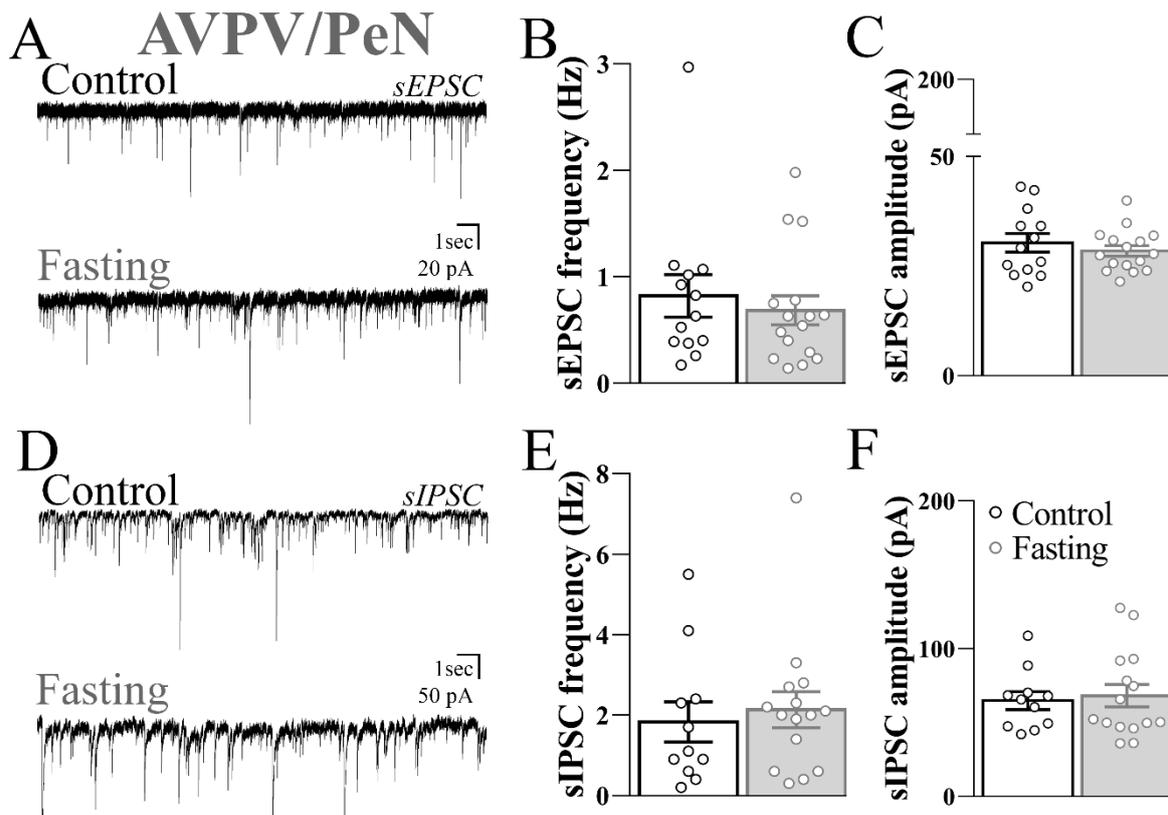


Figura 12. Efeitos do jejum na atividade neuronal dos núcleos kisspeptinérgicos localizados nos núcleos periventricular anteroventral e periventricular rostral (AVPV/PeN). (A) Representação dos traçados *voltage-clamp* demonstrando correntes pós-sinápticas excitatórias (sEPSC) e (D) as inibitórias (sIPSC) dos neurônios kisspeptinérgicos localizados nos núcleos AVPV/PeN dos grupos controle e jejum. (B, E) Gráfico de barras demonstrando a variação da frequência e (C, F) da amplitude das sEPSC (B, C; n=13/16 células, 7 animais por grupo) ou de sIPSC (E, F; n=11/15 células, 5 animais por grupo) dos grupos controle e jejum. Mean \pm SEM.

5.9 Efeito do jejum de 24 horas sobre a excitabilidade de neurônios kisspeptinérgicos do ARH.

Ao registrarmos os neurônios kisspeptinérgicos do ARH, observamos que em fêmeas do grupo controle as células apresentaram a frequência média das sEPSC de $0,8 \pm 0,2$ Hz e amplitude de $29,3 \pm 2,2$ pA (n=13 células de 6 animais). No grupo submetido ao jejum as sEPSC registradas exibiram a frequência média de $0,7 \pm 0,1$ Hz e a amplitude de $27,6 \pm 1,4$ pA (n=18 células de 7 animais, **Figura 13A-C**). Portanto, observamos que o jejum não foi suficiente para alterar significativamente a frequência ou amplitude das sEPSC que atuam sobre os neurônios kisspeptinérgicos localizados no ARH.

Na análise das sIPSC no grupo controle observamos a frequência média de $1,3 \pm 0,2$ Hz e amplitude $61,5 \pm 4,3$ pA (n=17 células de 5 animais). Surpreendentemente, nos

registros obtidos a partir de animais submetidos ao jejum, as sIPSC exibiram a frequência média de $0,7 \pm 0,09$ Hz e amplitude de $46,9 \pm 3,4$ pA ($n=22$ células de 8 animais, **Figura 13D-F**). Dessa forma, observamos que o jejum induziu redução significativa tanto na frequência como na amplitude média das sIPSCs em relação ao grupo controle. Sugerindo, portanto, que o déficit de energia em fêmeas leva a modulação nas vias GABAérgicas que atuam em neurônios kisspeptinérgicos do ARH.

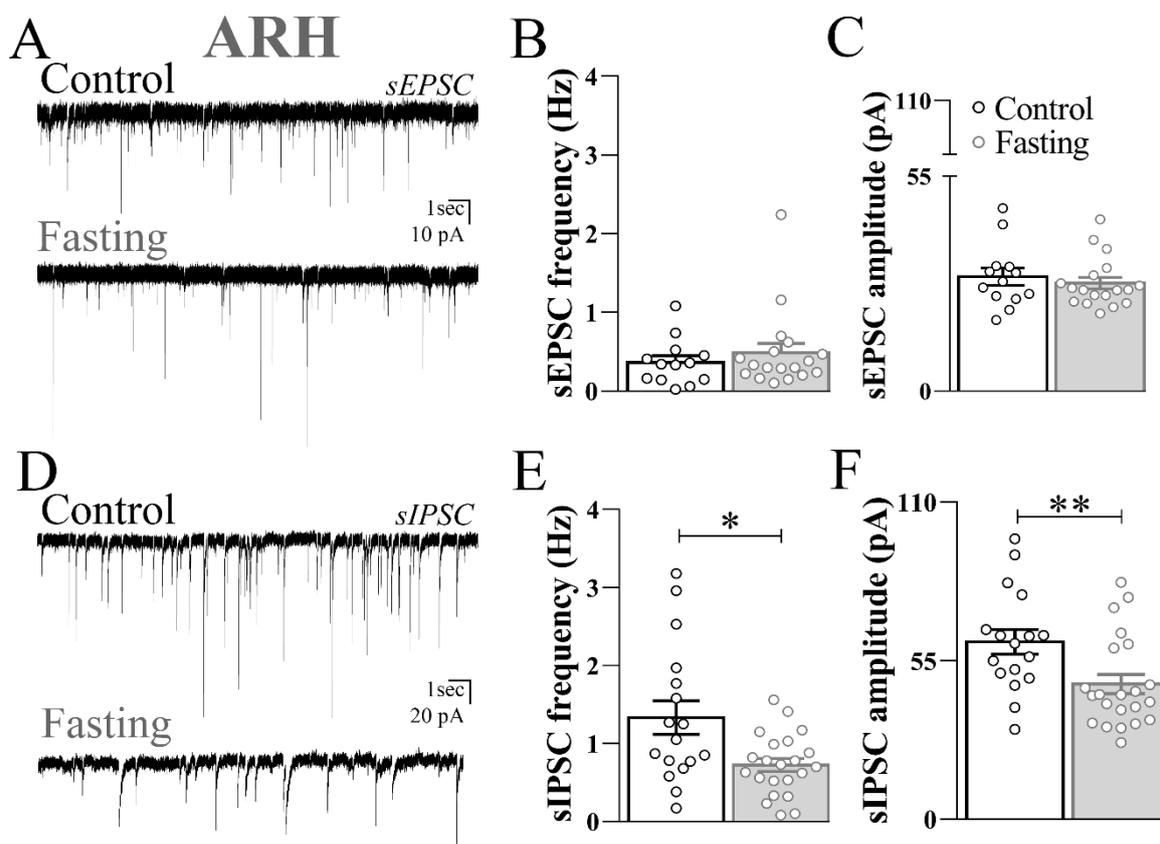


Figura 13. Efeitos do jejum na atividade neuronal dos neurônios kisspeptinérgicos localizados no núcleo arqueado do hipotálamo. (A) Representação dos traçados *voltage-clamp* demonstrando correntes pós-sinápticas excitatórias (sEPSC) e (D) as inibitórias (sIPSC) dos neurônios kisspeptinérgicos localizados no núcleo arqueado dos grupos controle e jejum. (B, E) Gráfico de barras demonstrando a variação da frequência e (C, F) da amplitude das sEPSC (B, C; $n=13/18$ células, 6/8 animais por grupo) ou de sIPSC (E, F; $n=17/22$ células de 5 animais por grupo) do controle ou jejum. Mean \pm SEM. * $P < 0.01$, ** $P < 0.006$.

5.10 Ações do NPY sobre o potencial de membrana dos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN.

Em busca de elucidar se os neurônios kisspeptinérgicos são modulados perante o neurotransmissor orexígeno, analisamos se NPY (100nM) adicionado ao banho exerce

efeitos sobre o RMP e a IR de neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos. Registros eletrofisiológicos realizados em fêmeas do grupo controle, demonstraram que os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN exibiram RMP médio de $-69,6 \pm 1,9$ mV (variação: -51 a -88 mV) e IR média de $0,8 \pm 0,09$ G Ω (variação: 0,3 a 1,7 G Ω). Dentre as células registradas observamos que cerca de 83% das células (15 de 18 células obtidas de 9 animais) eram quiescentes, enquanto que, apenas 17% (3 de 18 células registradas eram ativas, de acordo com a literatura (Frazão et al., 2013). A administração de NPY ao ACSF, não induziu efeito significativo no RMP ou IR de neurônios kisspeptinérgicos localizados no AVPV/PeN (Figura 14A-C).

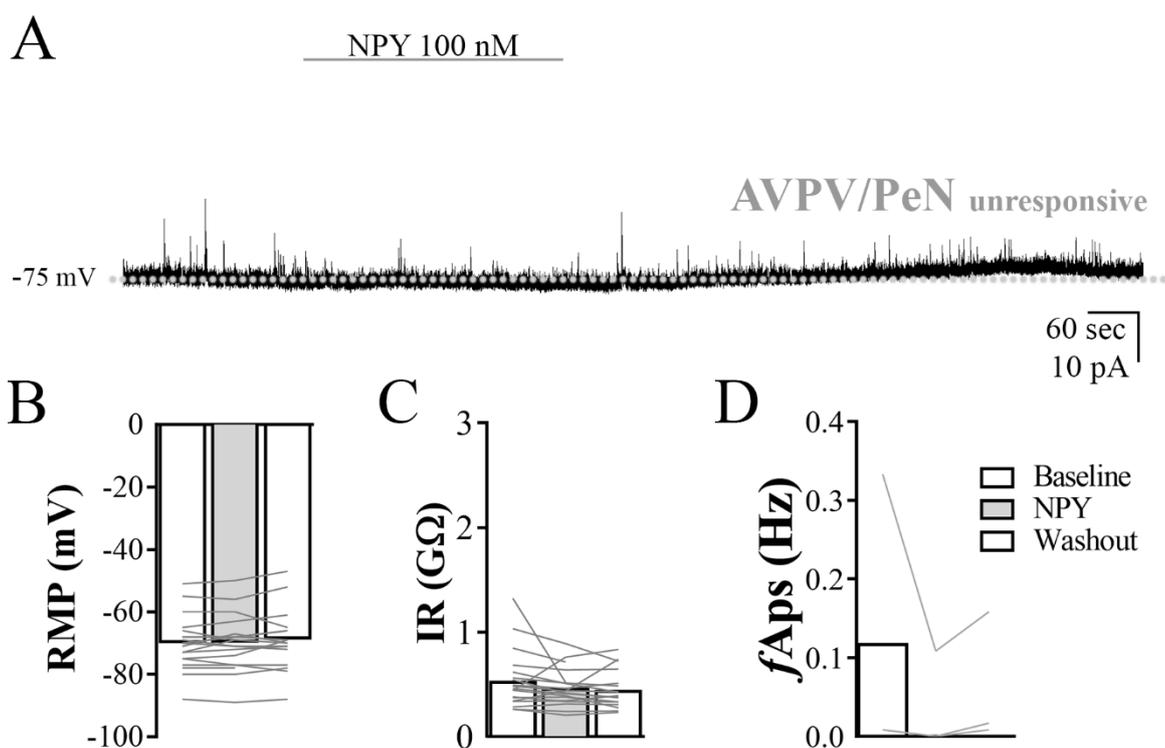


Figura 14. Efeitos do neuropeptídeo Y sobre os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN. (A) Representação gráfica de um registro obtido no *current-clamp* demonstrando que o neuropeptídeo Y (NPY) não modula o potencial de membrana de repouso (RMP) de neurônios kisspeptinérgicos localizados nos núcleos anteroventral periventricular e periventricular anterior (AVPV/PeN). (B) Gráfico de barras demonstrando o RMP, dos kisspeptinérgicos do AVPV/PeN, (C) a resistência de membrana das células (IR) (n= 18 células de 9 animais) e (D) a frequência de potenciais de ações (*fAps*) dos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN (n= 3 células). Média \pm SEM.

5.11 Ações do NPY sobre o potencial de membrana dos neurônios kisspeptinérgicos do ARH.

No ARH, os neurônios kisspeptinérgicos exibiram o RMP médio de $-52,5 \pm 2,5$ mV (variação: -40 a -62 mV) e a IR $1,3 \pm 0,2$ G Ω . Cerca de 55% dos neurônios foram considerados quiescentes (11 de 20 células ao total) e a f APS foi de $1,9 \pm 0,6$ Hz o que corroborou com dados da literatura (Frazao et al. 2013). A administração do NPY ao banho induziu a hiperpolarização de 45% dos neurônios kisspeptinérgicos registrados no ARH (n= 9 de 20 células obtidas de 9 animais; **Figura 15A, B**). A hiperpolarização do RMP foi seguida por diminuição significativa da IR e da f APS (**Figura 15C- D**). Os demais neurônios, não responsivos, não exibiram variação do RMP, IR ou f APS (**Figura 15E-H**).

Para elucidar se a hiperpolarização de neurônios kisspeptinérgicos mediante ao NPY depende de APs, novos registros em ACSF contendo bloqueadores sinápticos foram realizados. As ações do coquetel (TTX + bloqueadores) agiram como o esperado, visto que, quando adicionado ao ACSF, os neurônios não disparavam APs (**Figura 15I**). Na presença de TTX e bloqueadores sinápticos os neurônios kisspeptinérgicos do ARH exibiram o RMP médio de $-56,2 \pm 1,7$ mV (variação: -45 a -65 mV) e IR de $1,4 \pm 0,2$ G Ω (variação: 0,4 a 2,4 G Ω , n= 13 células de 9 animais. A administração de NPY na presença de TTX e bloqueadores sinápticos não induziu alterações significativas no RMP e IR (**Figura 15I-K**). Portanto, nossos resultados sugerem que a hiperpolarização induzida pelo NPY em neurônios kisspeptinérgicos do ARH é um efeito indireto dependente de PA.

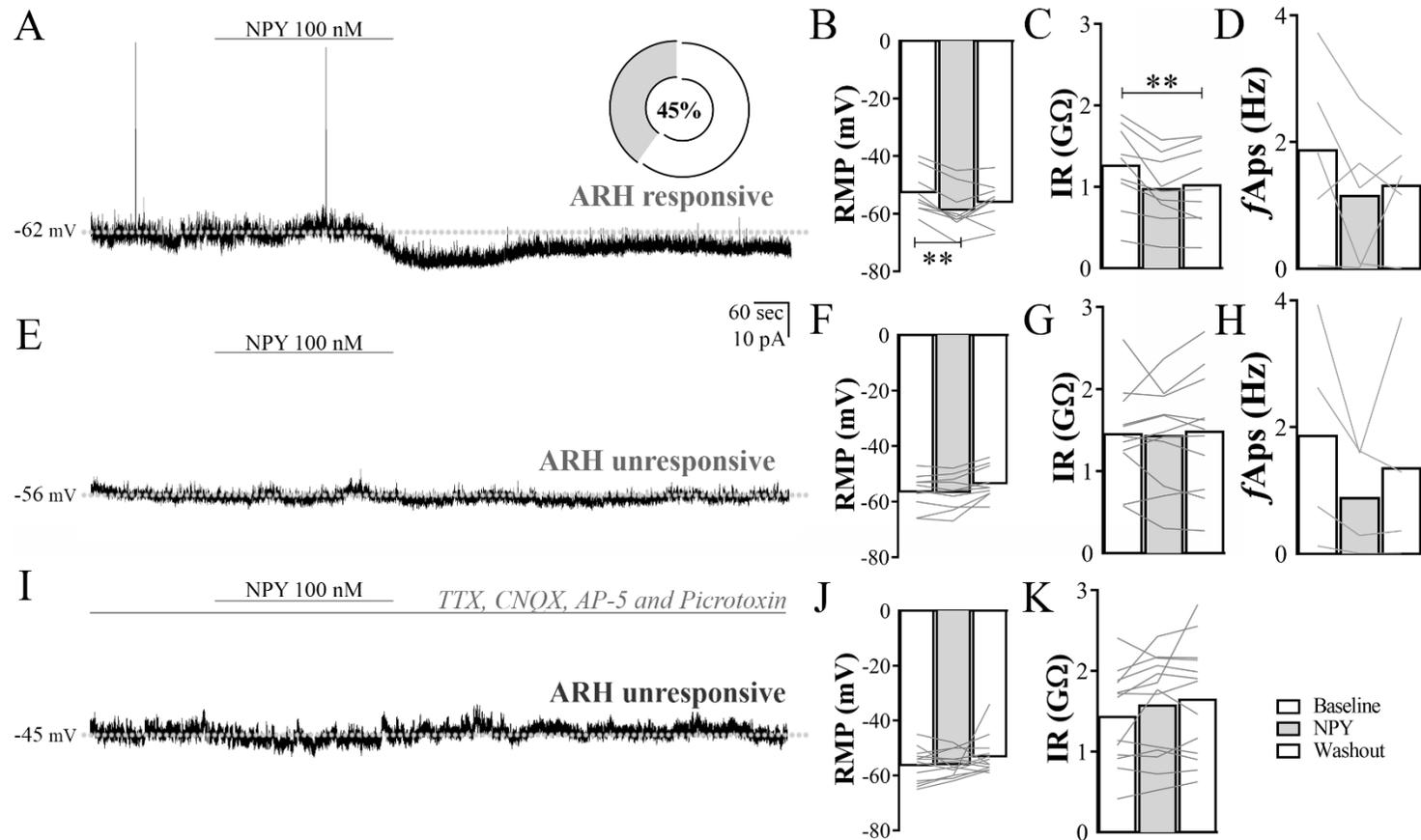


Figura 15. Efeitos do neuropeptídeo Y sobre os neurônios kisspeptinérgicos do ARH. (A, E) Representação dos traçados *current-clamp* demonstrando os efeitos do NPY em neurônios kisspeptinérgicos localizados no ARH. (I) Representação do traçado *current-clamp* demonstrando os efeitos do NPY em ACSF contendo tetrodotxina (TTX, 5mM), antagonistas do receptor de aminoácidos: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, 1 mM, 2-amino-5-fosfonovalerato (AP- 5, 10 mM) e picrotoxina (5 mM) em neurônios kisspeptinérgicos do ARH. A linha pontilhada indica o potencial de repouso da membrana. (B, F, J) Gráfico de barras demonstrando o potencial de membrana de repouso (RMP), (C, G, K) a resistência de entrada das células (IR) responsivas (n=9 células) e irresponsivas (n= 11 células. Total: 20 células de 10 animais, ACSF contendo bloqueadores n= 13 células de 9 animais). (D, H) Frequência de potenciais de ações (*fAps*) dos neurônios kisspeptinérgicos responsivos e irresponsivos do ARH. Média \pm SEM, ** P < 0,004.

5.12 Efeitos do NPY em neurônios kisspeptinérgicos no ARH de fêmeas em jejum.

Considerando que o jejum é suficiente para modular a atividade elétrica de neurônios AgRP/NPY (Blevins e Baskin, 2009, Pedroso et al. 2016), na sequência verificamos se essa mudança seria suficiente para alterar o efeito do NPY em neurônios kisspeptinérgicos do ARH. Verificamos que em neurônios registrados a partir de animais submetidos ao jejum que o RMP médio foi de $-54,54 \pm 2,5$ mV (variação: -40 a 69 mV) e a IR $1,5 \pm 0,1$ G Ω (variação: 0,8 a 2,8 G Ω , n= 13 células obtidas de 10 animais). Cerca de 40% das células registradas (n=7 células de 13 células) exibiram AP. A administração de NPY ao banho não induziu alterações significativas no RMP, IR ou *fAps* de neurônios kisspeptinérgicos do ARH registrados em fatias encefálicas obtidas de fêmeas submetidas ao jejum (**Figura 16D**).

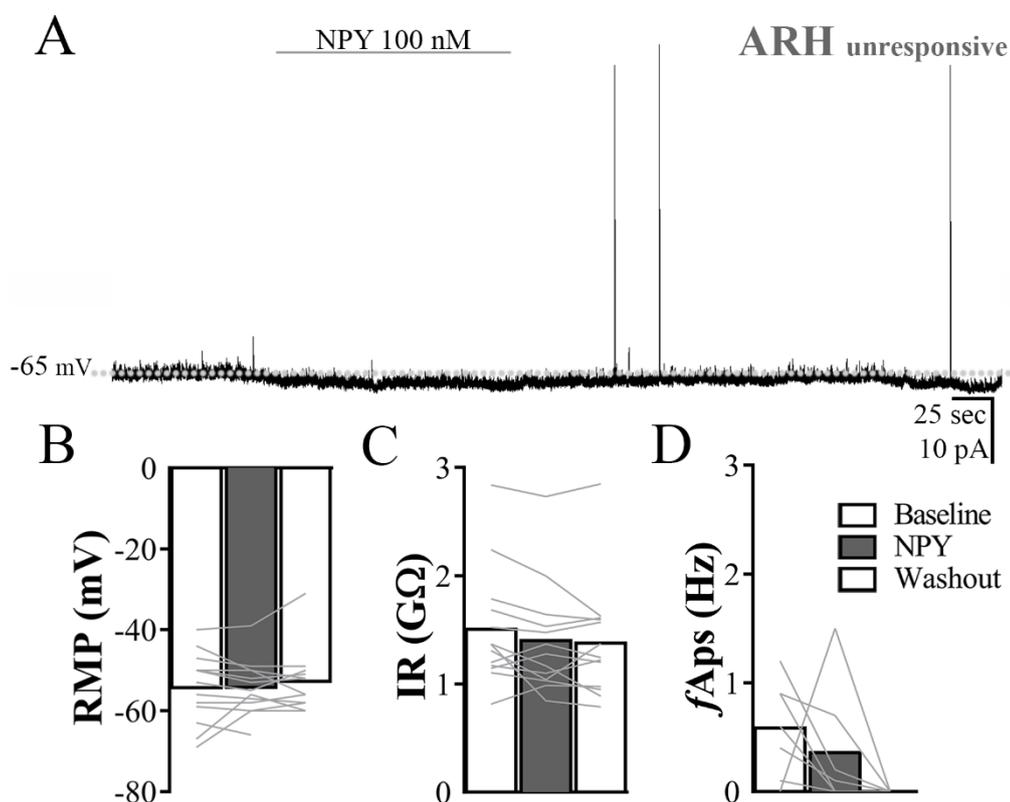


Figura 16. Efeitos do neuropeptídeo Y sobre os neurônios kisspeptinérgicos de fêmeas submetidas ao jejum. (A) Representação gráfica de um registro obtido no *current-clamp* demonstrando que o neuropeptídeo Y (NPY) não modula o potencial de membrana de repouso (RMP) de neurônios kisspeptinérgicos localizados no núcleo arqueado (ARH). A linha pontilhada indica o RMP. (B) Gráfico de barras demonstrando o RMP, (C) a resistência de membrana das células (IR) (n= 13 células de 10 animais) e (D) a frequência de potenciais de ações (*fAps*) dos neurônios kisspeptinérgicos do ARH (n= 7 células). Média \pm SEM.

5.13 Efeitos do NPY no núcleo ARH de machos

Para verificarmos se a diferença entre gêneros poderia influenciar nos resultados observados referente a ação do NPY em células kisspeptinérgicas do ARH, realizamos novos registros para determinar a ação deste neuropeptídeo em neurônios kisspeptinérgicos obtidos de machos adultos *ad libitum*. Os neurônios kisspeptinérgicos do ARH exibiram RMP médio de $-55,6 \pm 1,5$ mV (variação: -45 a -66 mV) e IR de $1,5 \pm 0,15$ G Ω (variação: 0,5 a 2,8 G Ω). Cerca de 60% dos kisspeptinérgicos do ARH registrados (11 de 18 dos neurônios obtidos de 7 animais dispararam potências de ação sendo considerados ativos (f_{APS} : $1,8 \pm 0,6$ Hz), de acordo com a literatura (Frazao et al. 2013, Gottsch et al. 2004). A administração de NPY ao banho não induziu alterações significativas no RMP, IR ou f_{Aps} de neurônios kisspeptinérgicos do ARH registrados em fatias encefálicas obtidas de machos (**Figura 16D**). Sugerindo, portanto, que existe uma diferença de gêneros em relação a resposta de neurônios kisspeptinérgicos registrados no ARH perante a administração de NPY.

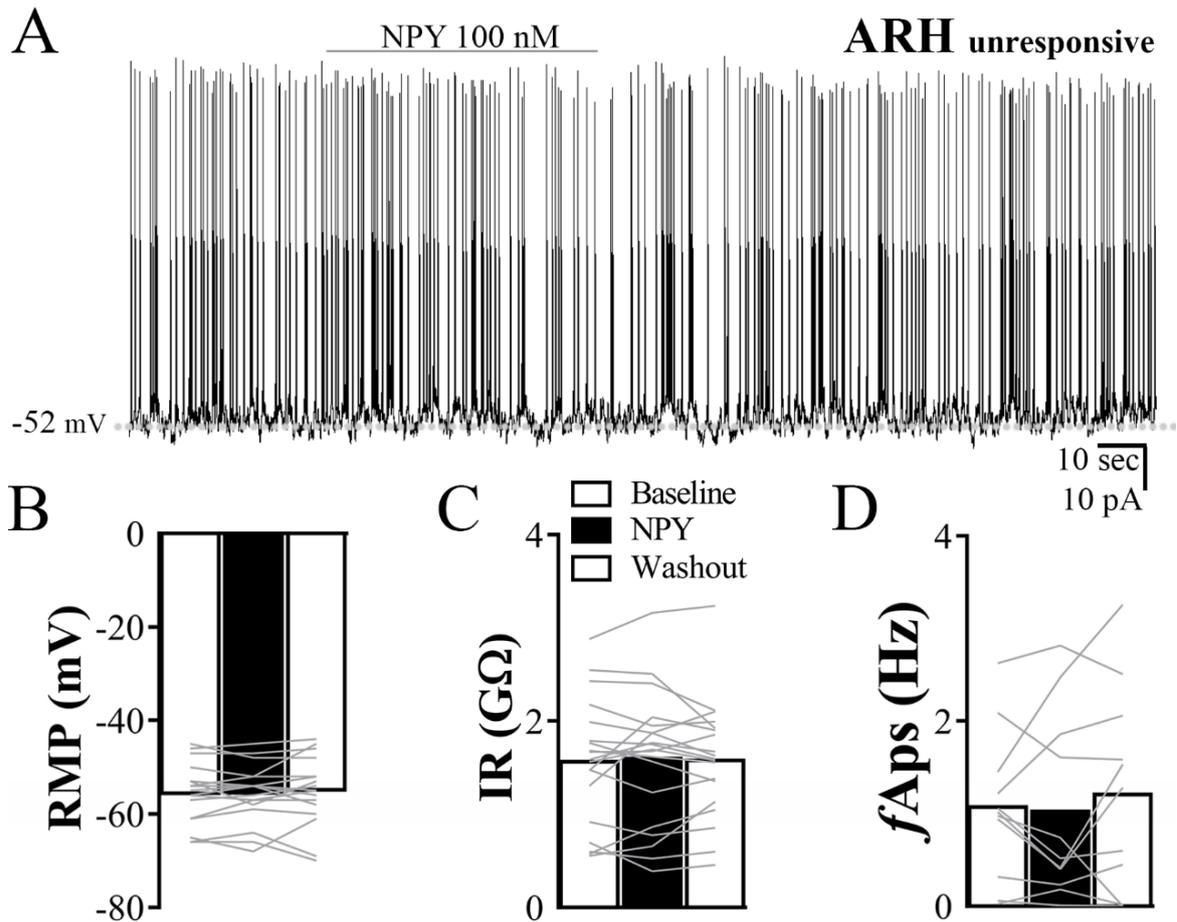


Figura 17. Efeitos do neuropeptídeo Y sobre os neurônios kisspeptinérgicos do ARH de machos. (A) Representação gráfica de um registro obtido no *current-clamp* demonstrando que o neuropeptídeo Y (NPY) não modula o potencial de membrana de repouso (RMP) de neurônios kisspeptinérgicos localizados no núcleo arqueado (ARH). A linha pontilhada indica o RMP. (B) Gráfico de barras demonstrando o RMP, (C) a resistência de membrana (IR) e (D) a frequência de potenciais de ações (*fAps*) dos neurônios kisspeptinérgicos do ARH (n= 18 células de 7 animais). Média \pm SEM.

6. DISCUSSÃO

É bem descrito na literatura que os neurônios kisspeptinérgicos são essenciais para a modulação central da fertilidade e reprodução (de Roux et al. 2003, Seminara et al. 2003, Funes et al. 2003). Há evidências que sugerem que a interação entre os neurônios POMC, AgRP/NPY e neurônios kisspeptinérgicos, pelo menos no ARH, representam a ligação entre o estado nutricional e o eixo reprodutivo (Fu and van den Pol 2010, Hudson et al. 2022). Os nossos achados demonstraram que jejum de 24 horas e a FR foram suficientes para alterar o padrão do ciclo estral. Porém, um único episódio de jejum ou um único período de FR não são suficientes para afetar a fertilidade das fêmeas. Muito embora o jejum tenha induzido o aumento da expressão de Fos no ARH, como esperado (Wu et al. 2014a, Pedroso et al. 2016, Furigo et al. 2019), os neurônios kisspeptinérgicos não coexpressaram a proteína. A expressão gênica das fêmeas submetidas ao jejum revelou uma redução significativa de *Kiss1*, *Cartp*, *TH* e *Pomc* e um aumento da expressão dos genes *Agrp* e *Npy*, como demonstrado na literatura (Ramos - Lobo et al. 2017, Pedroso et al. 2020). A dosagem do hormônio LH não foi alterado no grupo jejum, no entanto, as fêmeas obtiveram aumento dos níveis de FSH, sendo que, esse aumento não está correlacionado com a citologia vaginal. Nas análises eletrofisiológicas, notamos que o jejum não modifica o padrão de excitabilidade excitatória de neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN e ARH de fêmeas, sendo os dados basais de acordo com a literatura (Frazao et al. 2013, Gottsch et al. 2004). Os registros analisados das células kisspeptinérgicas do ARH do grupo de fêmeas submetidas ao jejum exibiram modificações significativas no padrão de excitabilidade inibitória das sIPSC dos neurônios kisspeptinérgicos, sugerindo que o jejum pode modular as vias GABAérgicas que atuam sobre neurônios kisspeptinérgicos do ARH de fêmeas. Em 45% das células kisspeptinérgicas localizadas no ARH o NPY induziu a hiperpolarização do RMP, efeito que não foi observado em machos, revelando a diferença entre gêneros. O efeito observado na presença de bloqueadores evidenciou que a resposta induzida ocorre de forma indireta. Sendo assim, nossos dados sugerem que neurônios kisspeptinérgicos do ARH possam ser a ponte de comunicação entre a homeostase energética e eixo reprodutivo.

O estado nutricional, balanço energético e adiposidade corporal são fatores cruciais para a maturação sexual e reprodução, pois uma quantidade adequada de reserva energética é necessária para a fertilidade (Dunger, Ahmed and Ong 2006, Frisch and McArthur 1974, Kaplowitz et al. 2001, Martos-Moreno, Chowen and Argente 2010, Roa and Tena-Sempere 2014a, Sanchez-Garrido and Tena-Sempere 2013, Bohlen et al. 2019, Bohlen et al. 2018).

Na primeira etapa do nosso trabalho, observamos que o jejum de 24 horas diminuiu o peso corporal, a massa magra e gordura corporal, sendo suficiente para prolongar o ciclo estral de acordo com o que foi descrito anteriormente por Ahima, *et al.* (1996). Estudos anteriores demonstraram que o jejum prolongado (48 horas) induz a redução significativa da expressão do RNAm que codifica o gene *Kiss1*, e afeta o ciclo estral tornando-o prolongado (Matsuzaki *et al.* 2011). Demonstramos, portanto, que efeitos semelhantes são observados em camundongos submetidos a jejum de 24 horas. No entanto, a longo prazo, a fertilidade das fêmeas, bem como, o número de filhotes por ninhada, não foram alterados com uma única intervenção aguda. Ao investigarmos uma intervenção diferente que sabidamente induz diversas adaptações para economizar energia, dentre elas, perda de peso corporal além de supressão dos eixos da tireoide e aumento da secreção de glicocorticoide (Chan *et al.* 2003, Furigo *et al.* 2019), notamos alteração do padrão do ciclo estral. Entretanto, a longo prazo, a fertilidade das fêmeas não foi alterada de forma significativa. Deste modo, as restrições agudas são transmitidas ao eixo HPG, sendo necessário elucidar se os neurônios kisspeptinérgicos fazem parte da via neural que transmitem as alterações ao eixo HPG.

Os eventos que iniciam o processo da ovulação começam com os aumentos dos níveis de estradiol que são percebidos pelos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN, que por sua vez, estimulam os neurônios GnRH para regular a secreção de LH e FSH pela hipófise, no entanto, a ovulação é caracterizada por um evento específico que depende de um pico pré-ovulatório de LH (Christian *et al.* 2010; Goodman *et al.* 2022). Em ratas, está bem estabelecido que, apenas na tarde do proestro, em que há predominância de células epiteliais no lavado vaginal, os neurônios GnRH apresentam a expressão de c-Fos, confirmando a sua atividade neuronal (Lee *et al.* 1990, Donato *et al.* 2009). No final da tarde do proestro, entre a fase do ciclo claro-escuro, surge o pico de LH e simultaneamente, podem ser detectados aumentos nos níveis de FSH (Smith *et al.* 1975). Estudos mais recentes demonstram que além da ativação dos neurônios GnRH, há expressão de Fos em neurônios kisspeptinérgicos localizados no AVPV/PeN de ratas (Mohr *et al.* 2021). É importante ressaltar que o padrão de pico de LH é muito variável em camundongos (Christian *et al.* 2010, Czielesky *et al.* 2016, Lass *et al.* 2020). De qualquer forma, a expressão da proteína Fos é considerada um marcador da atividade neuronal (Hoffman and Lyo 2002).

No presente estudo, utilizamos a marcação de Fos para determinarmos se neurônios kisspeptinérgicos são ativados perante o jejum. Ao verificarmos o padrão de expressão da proteína Fos mediante ao jejum no núcleo ARH, notamos que a expressão de Fos foi

detectada em neurônios localizados próximos ao terceiro ventrículo, representando potencialmente neurônios AgRP/NPY (Wu et al. 2014a, Pedroso et al. 2016, Furigo et al. 2019). No entanto, demonstramos que neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos não coexpressaram Fos mediante ao jejum. Sugerindo que interneurônios devem influenciar os neurônios kisspeptinérgicos e ou outras vias de sinalização podem ser recrutadas mediante o jejum. Em nosso grupo controle observamos que parte dos animais apresentaram aumento de LH circulante e aumento do peso uterino, corroborando com evidências da literatura (Christian et al. 2010, Czieselsky et al. 2016). Demonstramos ainda que o jejum é suficiente para prevenir o pico de LH. Na literatura, fêmeas submetidas a ovariectomia e ao jejum por 48 horas, também apresentam redução dos níveis de LH (Huang et al., 2008). O mesmo foi encontrado em fêmeas ovariectomizadas e submetidas ao jejum curto de 5 horas, sugerindo que a diminuição do LH se deve pela inibição dos neurônios kisspeptinérgicos no ARH e possivelmente populações neurais aferentes às essas células (McCosh et al., 2019). O estudo de McCosh *et al.* (2019) revela que apesar da redução significativa de LH após o breve jejum de 5 horas, além do estresse para coleta seriada, a própria alteração metabólica com administração de insulina ou salina, também pode causar a supressão de LH. Nos nossos resultados, aproximadamente 73% das fêmeas do grupo jejum apresentaram a predominância de células cornificadas, sem alterações no peso uterino e nos níveis de LH. Muito embora, tenhamos verificado um aumento dos níveis de FSH no grupo jejum, sugerimos que este achado não tem correlação com a citologia vaginal.

Na investigação da expressão gênica a partir das microdissecções obtidas da POA, que potencialmente contém os núcleos AVPV/PeN e microdissecções adquiridas na área médio-basal-hipotalâmica, que potencialmente contém o ARH, verificamos que houve uma diminuição significativa da expressão gênica de *Pomc* e um aumento da expressão dos genes *Agrp* e *Npy* no ARH de animais submetidos ao jejum, conforme evidenciado anteriormente (Pedroso et al. 2016). Supreendentemente, nos nossos resultados, a expressão do gene *Th* do ARH foi suprimida em fêmeas submetidas ao jejum, sem que houvesse qualquer alteração no AVPV/PeN. Vale ressaltar que a TH participa da síntese de catecolaminas, como a dopamina e que os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN são em sua maioria dopaminérgicos e apresentam alta co-expressão da TH (Simerly et al. 1985, Scott et al. 2015). Neurônios dopaminérgicos do AVPV/PeN possuem projeções para os neurônios GnRH, sugerindo que a dopamina derivada do AVPV/PeN pode influenciar o eixo HPG (Clarkson e Herbison, 2011, Kumar et al. 2015). Contudo, não está elucidado sobre quais

ações a dopamina exerce sobre os neurônios GnRH. É importante salientar que camundongos que não expressam o gene que codifica a TH especificamente nos neurônios kisspeptinérgicos não apresentam alterações no desenvolvimento da puberdade, na síntese/secreção de hormônios gonodotróficos ou alterações da fertilidade (Stephens et al. 2017). Portanto, o significado da redução da expressão do RNAm que codifica a TH precisará ser melhor investigado. Estudos têm demonstrado uma ligação entre os neurônios kisspeptinérgicos com os neurônios AgRP/NPY e POMC que são essenciais para o metabolismo (Fu and van den Pol 2010, Hudson et al. 2022). Ademais, os neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos têm sido associados com o controle do gasto energético e saciedade (Marraudino et al. 2017). Sabe-se que a redução da ingestão alimentar está associada a à infertilidade (Roa and Tena-Sempere 2014b, Sanchez-Garrido and Tena-Sempere 2013). De acordo com Castellano *et al.* (2005) a atividade de neurônios GnRH não é modulada diretamente por neurônios AgRP/NPY, reforçando a nossa hipótese de que o balanço energético pode potencialmente informar o eixo HPG via neurônios kisspeptinérgicos hipotalâmicos.

Ao analisarmos propriedades biofísicas de neurônios kisspeptinérgicos, demonstramos que os dados basais (RMP, IR, sEPSC e sIPSC) dos neurônios kisspeptinérgicos registrados no grupo controle, estavam de acordo com o que foi descrito anteriormente (Frazao et al. 2013, Gottsch et al. 2004). O jejum não foi suficiente para modular as propriedades avaliadas em neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN. Por outro lado, os neurônios kisspeptinérgicos do ARH exibiram diminuição significativa da frequência e amplitude da sIPSC, sugerindo que mediante o jejum ocorre uma modulação da transmissão GABAérgica pré e pós-sináptica em neurônios kisspeptinérgicos do ARH.

A literatura aborda que as células kisspeptinérgicas do ARH excitam diretamente os neurônios POMC e inibem, de forma indireta, os neurônios AgRP/NPY por vias glutamatérgicas (Nestor et al. 2016, Qiu et al. 2016). Além disso, os neurônios kisspeptinérgicos do ARH se projetam para neurônios do localizados no núcleo dorsomedial hipotalâmico (DMN) (Clarkson et al. 2006) e excitam os neurônios por via glutamatérgica para o controle do gasto de energia (Bosch et al. 2012, Rezai-Zadeh et al. 2014). Enquanto que, os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN também se projetam para o DMN e para o núcleo hipotalâmico paraventricular (PVH), no entanto, exercem os efeitos opostos por via GABAérgica, sob a presença de altos níveis circulantes de estradiol. Ainda é importante salientar que os neurônios AgRP/NPY localizados no ARH projetam-se para os núcleos

PVH e DMH para os neurônios de segunda ordem sob condições de alta demanda energética como por exemplo, na lactação (Valassi et al. 2008). Portanto, novas investigações são necessárias para desvendar quais neurônios (ou populações neuronais) em contrapartida modulam os neurônios kisspeptinérgicos do ARH de camundongos submetidos ao jejum.

Nas nossas investigações eletrofisiológicas com a adição do NPY ao banho, verificamos que o NPY não modulou a RMP ou IR dos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV/PeN. Em contrapartida, no núcleo ARH, 45% dos neurônios kisspeptinérgicos hiperpolarizaram com o NPY adicionado ao ACSF. Diante disto, cabe ressaltar que recentemente, Coutinho et al (2020) demonstrou que os neurônios kisspeptinérgicos localizados no AVPV/PeN e ARH são modulados pelos neurônios AgRP/NPY, o que resulta em inibição da secreção de LH e interrupção da ciclicidade estral (Padilha et al. 2008). A hiperpolarização encontrada em 45% dos neurônios kisspeptinérgicos muito possivelmente trata-se de uma resposta indireta, visto que, o efeito não persistiu na presença de TTX e bloqueadores sinápticos. Surpreendentemente, nas nossas evidências, o NPY não modulou as propriedades biofísicas de neurônios kisspeptinérgicos do grupo jejum, ressaltando a complexidade dos circuitos envolvidos entre os neurônios kisspeptinérgicos e o estado nutricional (Rønnekleiv et al. 2022). Além disso, observamos que os neurônios kisspeptinérgicos do ARH de machos *ad libitum* não respondem ao NPY. Olofsson e colaboradores (2004) evidenciaram o estrogênio regula os neurônios AgRP/NPY, contudo, esses neurônios oxerígenos não expressam o ER α no hipotálamo de camundongos, sugerindo a regulação indireta por meio de interneurônios que expressam ER α . Futuros estudos serão necessários para investigar a importância fisiológica no dimorfismo observado em relação à resposta indireta do NPY em neurônios kisspeptinérgicos do ARH. Além disso, novos estudos serão necessários para determinar qual grupamento neuronal recebe informação direta de neurônios AgRP/NPY e em contrapartida inibe os neurônios kisspeptinérgicos do ARH em uma situação *ad libitum* apenas em fêmeas. Após a identificação dos grupamentos específicos será interessante ainda determinar quais tipos de receptores ao qual o NPY se liga são responsáveis pela hiperpolarização observada.

7. CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que estímulos agudos são suficientes para que ocorra alterações do ciclo estral, expressão gênica e secreção de hormônios gonadotróficos. A longo prazo um único estímulo agudo não é suficiente para afetar a fertilidade. No entanto, o jejum de 24 horas induz alterações significativas na atividade dos neurônios kisspeptinérgicos do ARH. Dessa forma, de acordo com a hipótese formulada, concluímos que neurônios kisspeptinérgicos do ARH compõem a via neural através da qual informações sobre o estado nutricional são transmitidas ao eixo HPG, de acordo dados recentes da literatura. Nossos achados abrem ainda novas perspectivas para explorar as ações dos neurônios AgRP/NPY sobre os neurônios kisspeptinérgicos do ARH e se essa a regulação é dependente de estrógenos.

REFERÊNCIAS

- Ahima, R. S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier & J. S. Flier (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382, 250-2.
- Ahima, R. S., J. Dushay, S. N. Flier, D. Prabakaran & J. S. Flier (1997) Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest*, 99, 391-5.
- Aponte, Y., D. Atasoy & S. M. Sternson (2011) AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci*, 14, 351-5.
- Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM (2012) Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*. 2012 Aug 9;488(7410):172-7.
- Backholer K, Smith JT, Rao A, Pereira A, Iqbal J, Ogawa S, et al. (2010) Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* 151:2233–43.
- Barash, I. A., C. C. Cheung, D. S. Weigle, H. Ren, E. B. Kabigting, J. L. Kuijper, D. K. Clifton & R. A. Steiner (1996) Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*, 137, 3144-7.
- Blevins, J.E., Baskin DG (2010) Hypothalamic-brainstem circuits controlling eating. *Forum Nutr.*;63, 133-140.
- Bohlen, T. M., M. A. Silveira, D. D. C. Buonfiglio, H. C. Ferreira-Neto, J. Cipolla-Neto, J. Donato & R. Frazao (2018) A Short-Day Photoperiod Delays the Timing of Puberty in Female Mice. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 44.
- Bohlen, T. M., M. A. Silveira, T. T. Zampieri, R. Frazao & J. Donato, Jr. (2016) Fatness rather than leptin sensitivity determines the timing of puberty in female mice. *Mol Cell Endocrinol*, 423, 11-21.
- Bohlen, T. M., T. T. Zampieri, I. C. Furigo, P. D. Teixeira, E. O. List, J. Kopchick, J. Donato & R. Frazao (2019) Central growth hormone signaling is not required for the timing of puberty. *J Endocrinol*.
- Bosch, MA, Xue C, Rønnekleiv OK (2012) Kisspeptin expression in guinea pig hypothalamus: effects of 17 β -estradiol. *J Comp Neurol.*;520(10):2143-2162
- Bouret, S. G. & R. B. Simerly (2004) Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology*, 145, 2621-6.
- Bouret, S. G., S. J. Draper & R. B. Simerly (2004) Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*, 304, 108-10.

- Caligioni, C. S. (2009) Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci*, Appendix 4, Appendix 4I.
- Campfield, L. A., F. J. Smith, Y. Guisez, R. Devos & P. Burn (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269, 546-9.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1994). Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*. Oct 1;348(1):41-79.
- Cara AL, Myers MG, Elias CF (2020). Lack of AR in LepRb Cells Disrupts Ambulatory Activity and Neuroendocrine Axes in a Sex-Specific Manner in Mice. *Endocrinology*. Aug 1;161(8)110.
- Castellano, J. M., V. M. Navarro, R. Fernandez-Fernandez, R. Nogueiras, S. Tovar, J. Roa, M. J. Vazquez, E. Vigo, F. F. Casanueva, E. Aguilar, L. Pinilla, C. Dieguez & M. Tena-Sempere (2005) Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*, 146, 3917-25.
- Chan, J. L., K. Heist, A. M. DePaoli, J. D. Veldhuis & C. S. Mantzoros (2003) The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1409-1421.
- Chehab, F. F., M. E. Lim & R. Lu (1996) Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*, 12, 318-20.
- Cheung, C. C., J. E. Thornton, J. L. Kuijper, D. S. Weigle, D. K. Clifton & R. A. Steiner (1997) Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology*, 138, 855-858.
- Christian CA, Moenter SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges (2010). *Endocr Rev*;31:544-77.
- Clarkson J, Herbison AE (2006). Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. Dec;147(12):5817-25.
- Clarkson J, Herbison AE (2011) Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing

- hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 23:293–301. 10.1111/j.1365-2826.2011.02107.
- Cone, R. D., D. Lu, S. Koppula, D. I. Vage, H. Klungland, B. Boston, W. Chen, D. N. Orth, C. Pouton & R. A. Kesterson (1996) The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res*, 51, 287-317; discussion 318.
- Coutinho EA, Prescott M, Hessler S, Marshall CJ, Herbison AE, Campbell RE. Activation of a classic hunger circuit slows luteinizing hormone pulsatility. *Neuroendocrinology*. 2020;110(7-8):671-687.
- Cowley, M. A., N. Pronchuk, W. Fan, D. M. Dinulescu, W. F. Colmers & R. D. Cone (1999) Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron*, 24, 155-63.
- Cravo, R. M., L. O. Margatho, S. Osborne-Lawrence, J. Donato, S. Atkin, A. L. Bookout, S. Rovinsky, R. Frazão, C. E. Lee, L. Gautron, J. M. Zigman & C. F. Elias (2011) Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience*, 173, 37-56.
- Cravo, R. M., R. Frazao, M. Perello, S. Osborne-Lawrence, K. W. Williams, J. M. Zigman, C. Vianna & C. F. Elias (2013) Leptin signaling in Kiss1 neurons arises after pubertal development. *PloS one*, 8, e58698.
- Czieselsky K, Prescott M, Porteous R, Campos P, Clarkson J, Steyn FJ, Campbell RE, Herbison AE (2016) Pulse and Surge Profiles of Luteinizing Hormone Secretion in the Mouse. *Endocrinology*;157: 4794-802.
- d'Anglemont dTX, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH (2008) Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149:3926-3932.
- de Croft S, Boehm U, Herbison AE (2013) Neurokinin B activates arcuate kisspeptin neurons through multiple tachykinin receptors in the male mouse. *Endocrinology*. 154:2750-2760.
- de Paula DG, Bohlen TM, Zampieri TT, Mansano NS, Vieira HR, Gusmao DO, Wasinski F, Donato J Jr, Frazao R (2021) Distinct effects of growth hormone deficiency and disruption of hypothalamic kisspeptin system on reproduction of male mice. *Life Sci*. Nov 15; 285:119970.

- de Roux, N., E. Genin, J. C. Carel, F. Matsuda, J. L. Chaussain & E. Milgrom (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10972-6.
- Donato Jr. J, Silva RJ, Sita LV, Lee S, Lee C, Lacchini S, Bittencourt JC, Franci CR, Canteras NS, Elias CF (2009) The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion. *J Neurosci*;29:5240-50.
- Donato, J., R. M. Cravo, R. Frazao, L. Gautron, M. M. Scott, J. Lachey, I. A. Castro, L. O. Margatho, S. Lee, C. Lee, J. A. Richardson, J. Friedman, S. Chua, R. Coppari, J. M. Zigman, J. K. Elmquist & C. F. Elias (2011) Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *Journal of Clinical Investigation*, 121, 355-368.
- Dunger, D. B., M. L. Ahmed & K. K. Ong (2006) Early and late weight gain and the timing of puberty. *Mol Cell Endocrinol*, 254-255, 140-5.
- Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, Elmquist JK (2000) Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol*. Jul 24;423(2):261-81. PMID: 10867658.
- Elias CF, Lee CE, Kelly JF, Ahima RS, Kuhar M, Saper CB, Elmquist JK (2001) Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol*. Mar 26;432(1):1-19.
- Frazao, R., R. M. Cravo, J. Donato, D. V. Ratra, D. J. Clegg, J. K. Elmquist, J. M. Zigman, K. W. Williams & C. F. Elias (2013) Shift in Kiss1 Cell Activity Requires Estrogen Receptor alpha. *Journal of Neuroscience*, 33, 2807-2820.
- Friedman, J. M. (2000) Obesity in the new millennium. *Nature*, 404, 632-634.
- Frisch, R. E. & J. W. McArthur (1974) Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science*, 185, 949-51.
- Fu, L. Y. & A. N. van den Pol (2010) Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci*, 30, 10205-19.
- Funes, S., J. A. Hedrick, G. Vassileva, L. Markowitz, S. Abbondanzo, A. Golovko, S. Yang, F. J. Monsma & E. L. Gustafson (2003) The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for

- the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun*, 312, 1357-63.
- Furigo, I. C., P. D. S. Teixeira, G. O. de Souza, G. C. L. Couto, G. G. Romero, M. Perelló, R. Frazão, L. L. Elias, M. Metzger, E. O. List, J. J. Kopchick & J. Donato (2019) Growth hormone regulates neuroendocrine responses to weight loss via AgRP neurons. *Nat Commun*, 10, 662.
- Glanowska KM, Moenter SM (2015) Differential regulation of GnRH secretion in the preoptic area (POA) and the median eminence (ME) in male mice. *Endocrinology* 156:231-241.
- Göcz B, Rumpler É, Sárvári M, Skrapits K, Takács S, Farkas I, Csillag V, Trinh SH, Bardóczi Z, Ruska Y, Solymosi N, Póliska S, Szőke Z, Bartoloni L, Zouaghi Y, Messina A, Pitteloud N, Anderson RC, Millar RP, Quinton R, Manchishi SM, Colledge WH, Hrabovszky E (2022) Transcriptome profiling of kisspeptin neurons from the mouse arcuate nucleus reveals new mechanisms in estrogenic control of fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Jul 5;119(27):e2113749119. doi: 10.1073/pnas.2113749119. Epub 2022 Jun 28.
- Goodman RL, Herbison AE, Lehman MN, Navarro VM (2022) Neuroendocrine control of gonadotropin-releasing hormone: Pulsatile and surge modes of secretion. *J Neuroendocrinol*. May;34(5):e13094.
- Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ (2007) Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148:5752-5760
- Gottsch, M. L., M. J. Cunningham, J. T. Smith, S. M. Popa, B. V. Acohido, W. F. Crowley, S. Seminara, D. K. Clifton & R. A. Steiner (2004) A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145, 4073-4077.
- Gruaz NM, Lalaoui M, Pierroz DD, Englaro P, Sizonenko PC, Blum WF, Aubert ML. Chronic administration of leptin into the lateral ventricle induces sexual maturation in severely food-restricted female rats. *J Neuroendocrinol*. 1998 Aug;10(8):627-33.
- Gu G, Varoqueaux F, Simerly RB. Hormonal regulation of glutamate receptor gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*. 1999 Apr 15;19(8):3213-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-08-03213.1999. PMID: 10191334; PMCID: PMC6782292.

- Haisenleder, D. J., L. L. Burger, H. E. Walsh, J. Stevens, K. W. Aylor, M. A. Shupnik & J. C. Marshall (2008) Pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulation of gonadotropin subunit transcription in rat pituitaries: evidence for the involvement of Jun N-terminal kinase but not p38. *Endocrinology*, 149, 139-45.
- Han SY, McLennan T, Czieselsky K, Herbison AE (2015) Selective optogenetic activation of arcuate kisspeptin neurons generates pulsatile luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:13109-13114.
- Han, S. K., M. L. Gottsch, K. J. Lee, S. M. Popa, J. T. Smith, S. K. Jakawich, D. K. Clifton, R. A. Steiner & A. E. Herbison (2005) Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*, 25, 11349-56.
- Herbison AE. A simple model of estrous cycle negative and positive feedback regulation of GnRH secretion (2020) *Front Neuroendocrinol*;57:100837.
- Hessler S, Liu X, Herbison AE (2020) Direct inhibition of arcuate kisspeptin neurones by neuropeptide Y in the male and female mouse. *J Neuroendocrinol*. May;32(5):e12849.
- Hill, J. W., C. F. Elias, M. Fukuda, K. W. Williams, E. D. Berglund, W. L. Holland, Y. R. Cho, J. C. Chuang, Y. Xu, M. Choi, D. Lauzon, C. E. Lee, R. Coppari, J. A. Richardson, J. M. Zigman, S. Chua, P. E. Scherer, B. B. Lowell, J. C. Brüning & J. K. Elmquist (2010) Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metab*, 11, 286-97.
- Hoffman, G. E. & D. Lyo (2002) Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *J Neuroendocrinol*, 14, 259-68.
- Hrabovszky E, Sipos MT, Molnar CS, Ciofi P, Borsay BA, Gergely P, Herczeg L, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillon WS, Liposits Z (2012) Low degree of overlap between kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin immunoreactivities in the infundibular nucleus of young male human subjects challenges the KNDy neuron concept. *Endocrinology* 153:4978-4989.
- Huang W, Acosta-Martínez M, Horton TH, Levine JE (2008) Fasting-induced suppression of LH secretion does not require activation of ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Dec;295(6):E1439-46.

- Hudson AD, Kauffman AS. Metabolic actions of kisspeptin signaling: Effects on body weight, energy expenditure, and feeding (2022). *Pharmacol Ther.* Mar;231:107974. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.
- Jayasena CN, Abbara A, Veldhuis JD, Comninou AN, Ratnasabapathy R, De Silva A, Nijher GM, Ganiyu-Dada Z, Mehta A, Todd C, Ghatei MA, Bloom SR, Dhillon WS (2014) Increasing LH pulsatility in women with hypothalamic amenorrhoea using intravenous infusion of Kisspeptin-54. *J Clin Endocrinol Metab* 99:E953-961.
- Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ, Reppert SM (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell.* Jan 8;96(1):57-68.
- Kaplowitz, P. B., E. J. Slora, R. C. Wasserman, S. E. Pedlow & M. E. Herman-Giddens (2001) Earlier onset of puberty in girls: relation to increased body mass index and race. *Pediatrics*, 108, 347-53.
- Kotani, M., M. Detheux, A. Vandenbogaerde, D. Communi, J. M. Vanderwinden, E. Le Poul, S. Brezillon, R. Tyldesley, N. Suarez-Huerta, F. Vandeput, C. Blanpain, S. N. Schiffmann, G. Vassart & M. Parmentier (2001) The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*, 276, 34631-6.
- Kumar D, Candlish M, Periasamy V, Avcu N, Mayer C, Boehm U (2015) Specialized subpopulations of kisspeptin neurons communicate with GnRH neurons in female mice. *Endocrinology* 156:32–38. 10.1210/en.2014-1671
- Lee WS, Smith MS, Hoffman GE (1990). Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*;87:5163-7.
- Lee, J. H., M. E. Miele, D. J. Hicks, K. K. Phillips, J. M. Trent, B. E. Weissman & D. R. Welch (1996) KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*, 88, 1731-7.
- Lehman, M.N., Coolen L.M., Goodman, R.L (2010) Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 151:3479-3489.
- Lehman, M.N., Coolen L.M., Steiner RA, Neal-Perry G., Wang L., Moenter S.M., Moore A.M., Goodman R.L., Hwa-Yeo S., Padilla S.L., Kauffman A.S., Garcia J., Kelly M.J., Clarkson J., Radovick S., Babwah A.V., Leon S., Tena-Sempere M., Comninou

- A., Seminara S., Dhillon W.S., Levine J., Terasawa E., Negron A., Herbison A.E. (2018). The 3rd World Conference on Kisspeptin, "Kisspeptin 2017: Brain and Beyond": Unresolved questions, challenges and future directions for the field. *J Neuroendocrinol*, e12600.
- Lehman, M. N., S. M. Hileman & R. L. Goodman (2013) Neuroanatomy of the kisspeptin signaling system in mammals: comparative and developmental aspects. *Adv Exp Med Biol*, 784, 27-62.
- Manfredi-Lozano, M., J. Roa, F. Ruiz-Pino, R. Piet, D. Garcia-Galiano, R. Pineda, A. Zamora, S. Leon, M. A. Sanchez-Garrido, A. Romero-Ruiz, C. Dieguez, M. J. Vazquez, A. E. Herbison, L. Pinilla & M. Tena-Sempere (2016) Defining a novel leptin-melanocortin-kisspeptin pathway involved in the metabolic control of puberty. *Mol Metab*, 5, 844-857.
- Mansano NDS, Paradelo RS, Bohlen TM, Zanardi IM, Chaves FM, Silveira MA, Tavares MR, Donato J Jr, Frazao R (2022). Vasoactive intestinal peptide exerts an excitatory effect on hypothalamic kisspeptin neurons during estrogen negative feedback. *Mol Cell Endocrinol*. Feb 15;542:111532.
- Marraudino M, Miceli D, Farinetti A, Ponti G, Panzica G, Gotti S (2017) Kisspeptin innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus: sexual dimorphism and effect of estrous cycle in female mice. *J Anat.*;230(6):775-786
- Martos-Moreno, G. A., J. A. Chowen & J. Argente (2010) Metabolic signals in human puberty: effects of over and undernutrition. *Mol Cell Endocrinol*, 324, 70-81.
- Matsuzaki, T., T. Iwasa, R. Kinouchi, S. Yoshida, M. Murakami, G. Gereltsetseg, S. Yamamoto, A. Kuwahara, T. Yasui & M. Irahara (2011) Fasting reduces the kiss1 mRNA levels in the caudal hypothalamus of gonadally intact adult female rats. *Endocr J*, 58, 1003-12.
- Matteri, R.L., 2001. Overview of central targets for appetite regulation. *J. Anim. Sci.* 79(E. Suppl.): E148-E158.
- McCosh RB, Kreisman MJ, Tian K, Ho BS, Thackray VG, Breen KM (2019) Insulin-induced hypoglycaemia suppresses pulsatile luteinising hormone secretion and arcuate Kiss1 cell activation in female mice. *J Neuroendocrinol*, Dec;31(12):e12813.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinger I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA (2005) Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled

- receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 1;102(5):1761-6. doi: 10.1073/pnas.0409330102. Epub 2005 Jan 21.
- Mizuno, T. M. & C. V. Mobbs (1999) Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology*, 140, 814-7.
- Mohr MA, Esparza LA, Steffen P, Micevych PE, Kauffman AS (2021) Progesterone Receptors in AVPV Kisspeptin Neurons Are Sufficient for Positive Feedback Induction of the LH Surge. *Endocrinology*;162.
- Moore RY & Speh JC (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Letters* 150 112-116.
- Moore RY, Speh JC & Leak RK (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 309 89-98.
- Navarro, V.M., Gottsch M.L., Chavkin, C., Okamura H., Clifton, D.K., Steiner, R.A. (2009) Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29:11859-11866.
- Nestor, C. C., J. Qiu, S. L. Padilla, C. Zhang, M. A. Bosch, W. Fan, S. A. Aicher, R. D. Palmiter, O. K. Rønnekleiv & M. J. Kelly (2016) Optogenetic Stimulation of Arcuate Nucleus Kiss1 Neurons Reveals a Steroid-Dependent Glutamatergic Input to POMC and AgRP Neurons in Male Mice. *Mol Endocrinol*, 30, 630-44.
- Ohtaki, T., Y. Shintani, S. Honda, H. Matsumoto, A. Hori, K. Kanehashi, Y. Terao, S. Kumano, Y. Takatsu, Y. Masuda, Y. Ishibashi, T. Watanabe, M. Asada, T. Yamada, M. Suenaga, C. Kitada, S. Usuki, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura & M. Fujino (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411, 613-7.
- Olofsson LE, Pierce AA, Xu AW (2009) Functional requirement of AgRP and NPY neurons in ovarian cycle-dependent regulation of food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 15;106(37):15932-7.
- Padilla, S. L., J. Qiu, C. C. Nestor, C. Zhang, A. W. Smith, B. B. Whiddon, O. K. Rønnekleiv, M. J. Kelly & R. D. Palmiter (2017) AgRP to Kiss1 neuron signaling links nutritional state and fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 2413-2418.
- Pedroso, J. A., M. A. Silveira, L. B. Lima, I. C. Furigo, T. T. Zampieri, A. M. Ramos-Lobo, D. C. Buonfiglio, P. D. Teixeira, R. Frazão & J. Donato (2016) Changes in Leptin

- Signaling by SOCS3 Modulate Fasting-Induced Hyperphagia and Weight Regain in Mice. *Endocrinology*, 157, 3901-3914.
- Pedroso, J.A.B, Wasinski, F., Donato, J. Jr. (2020) Prolonged fasting induces long-lasting metabolic consequences in mice. *J Nutr Biochem*. Oct; 84:108457.
- Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, M. B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone & F. Collins (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269, 540-3.
- Piet R, Dunckley H, Lee K, Herbison AE. Vasoactive Intestinal Peptide Excites GnRH Neurons in Male and Female Mice. *Endocrinology*. 2016 Sep;157(9):3621-30. doi: 10.1210/en.2016-1399. Epub 2016 Aug 8. PMID: 27501185.
- Piet, R., A. Fraissenon, U. Boehm & A. E. Herbison (2015) Estrogen permits vasopressin signaling in preoptic kisspeptin neurons in the female mouse. *J Neurosci*, 35, 6881-92.
- Popa, S.M., Clifton, D.K., Steiner, R.A (2005) A KiSS to remember. *Trends Endocrinol Metab*. Aug;16(6):249-50.
- Qiu, J., C. C. Nestor, C. Zhang, S. L. Padilla, R. D. Palmiter, M. J. Kelly & O. K. Rønnekleiv (2016) High-frequency stimulation-induced peptide release synchronizes arcuate kisspeptin neurons and excites GnRH neurons. *Elife*, 5.
- Ramos -Lobo AM, Donato J, Jr. The role of leptin in health and disease (2017). *Temperature*.4:258 -91.
- Rezai-Zadeh K, Yu S, Jiang Y, et al (2014) Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. *Mol Metab*.;3(7):681-693.
- Roa, J. & M. Tena-Sempere (2014a) Connecting metabolism and reproduction: roles of central energy sensors and key molecular mediators. *Mol Cell Endocrinol*, 397, 4-14.
- Roa, J. & M. Tena-Sempere (2014b) Connecting metabolism and reproduction: Roles of central energy sensors and key molecular mediators. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 397, 4-14.
- Rønnekleiv OK, Qiu J, Kelly MJ. Hypothalamic Kisspeptin Neurons and the Control of Homeostasis. *Endocrinology*. 2022 Feb 1;163(2):bqab253.
- Ross RA, Leon S, Madara JC, Schafer D, Fergani C, Maguire CA, Verstegen AM, Brengle E, Kong D, Herbison AE, Kaiser UB, Lowell BB, Navarro VM (2018) PACAP

- neurons in the ventral premammillary nucleus regulate reproductive function in the female mouse. *Elife*. Jun 15;7:e35960.
- Ruka KA, Burger LL, Moenter SM. Regulation of arcuate neurons coexpressing kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin by modulators of neurokinin 3 and kappa-opioid receptors in adult male mice. *Endocrinology*. 2013;154:2761-2771.
- Sanchez-Garrido, M. A. & M. Tena-Sempere (2013) Metabolic control of puberty: Roles of leptin and kisspeptins. *Hormones and Behavior*, 64, 187-194.
- Scott, N., Prigge, M., Yizhar, O., Kimchi, T (2015) A sexually dimorphic hypothalamic circuit controls maternal care and oxytocin secretion. *Nature* 525:519–522. 10.1038/nature15378
- Seminara, S. B., S. Messenger, E. E. Chatzidaki, R. R. Thresher, J. S. Acierno, J. K. Shagoury, Y. Bo-Abbas, W. Kuohung, K. M. Schwinof, A. G. Hendrick, D. Zahn, J. Dixon, U. B. Kaiser, S. A. Slaugenhaupt, J. F. Gusella, S. O'Rahilly, M. B. Carlton, W. F. Crowley, S. A. Aparicio & W. H. Colledge (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*, 349, 1614-27.
- Simerly R.B., Swanson LW, Gorski RA (1985) The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of gonadotropin release: immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism. *Brain Res* 330:55–64.
- Simonian SX, Spratt DP, Herbison AE (1999) Identification and characterization of estrogen receptor alpha-containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *J Comp Neurol*. Aug 23;411(2):346-58.
- Skrapits K, Borsay BA, Herczeg L, Ciofi P, Liposits Z, Hrabovszky E (2015) Neuropeptide co-expression in hypothalamic kisspeptin neurons of laboratory animals and the human. *Front Neurosci* 9:29
- Smith MS, Freeman ME, Neill JD (1975) The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*;96:219-26.
- Smith, J. T., B. V. Acohido, D. K. Clifton & R. A. Steiner (2006) KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol*, 18, 298-303.

- Smith, J. T., M. J. Cunningham, E. F. Rissman, D. K. Clifton & R. A. Steiner (2005) Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146, 3686-92.
- Stafford, L. J., C. Xia, W. Ma, Y. Cai & M. Liu (2002) Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. *Cancer Res*, 62, 5399-404.
- Stengel, A., L. Wang, M. Goebel-Stengel & Y. Tache (2011) Centrally injected kisspeptin reduces food intake by increasing meal intervals in mice. *Neuroreport*, 22, 253-7.
- Stephens SB, Tolson KP, Rouse ML Jr, Poling MC, Hashimoto-Partyka MK, Mellon PL, Kauffman AS. (2015) Absent Progesterone Signaling in Kisspeptin Neurons Disrupts the LH Surge and Impairs Fertility in Female Mice. *Endocrinology*. Sep;156(9):3091-7.
- Stephens SBZ, Rouse ML, Tolson KP, Liaw RB, Parra RA, Chahal N, Kauffman AS (2017) Effects of Selective Deletion of Tyrosine Hydroxylase from Kisspeptin Cells on Puberty and Reproduction in Male and Female Mice. *eNeuro*. Jun 22;4(3):
- Szawka RE, Ribeiro AB, Leite CM, Helena CV, Franci CR, Anderson GM, Hoffman GE, Anselmo-Franci JA (2010) Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. *Endocrinology* 151:3247-3257.
- Tena-Sempere, M. (2007) Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. *Neuroendocrinology*, 86, 229-41.
- Terry KK, Chatman LA, Foley GL, Kadyszewski E, Fleeman TL, Hurtt ME, Chapin RE. Effects of feed restriction on fertility in female rats (2005) *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. Oct;74(5):431-41.
- Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K, Steiner RA, Okamura H (2010) Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 30:3124-3132.
- Wu, Q., M. B. Lemus, R. Stark, J. A. Bayliss, A. Reichenbach, S. H. Lockie & Z. B. Andrews (2014a) The temporal pattern of cfos activation in hypothalamic, cortical, and brainstem nuclei in response to fasting and refeeding in male mice. *Endocrinology*, 155, 840-53.

- Wu, S., S. Divall, A. Nwaopara, S. Radovick, F. Wondisford, C. Ko & A. Wolfe (2014b) Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell. *Diabetes*, 63, 1270-82.
- Yip SH, Boehm U, Herbison AE, Campbell RE (2015) Conditional Viral Tract Tracing Delineates the Projections of the Distinct Kisspeptin Neuron Populations to Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons in the Mouse. *Endocrinology* 156:2582-2594.

ANEXOS

A) Mansano NDS, et al. Vasoactive intestinal peptide exerts an excitatory effect on hypothalamic kisspeptin neurons during estrogen negative feedback. *Mol Cell Endocrinol.* 2022 Feb 15;542:111532. doi: 10.1016/j.mce.2021.111532.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

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



Vasoactive intestinal peptide exerts an excitatory effect on hypothalamic kisspeptin neurons during estrogen negative feedback

Naira da Silva Mansano^{a,1}, Regina Silva Paradela^{a,1}, Tabata M. Bohlen^a, Izabela M. Zanardi^a, Fernanda Machado Chaves^b, Marina Augusto Silveira^a, Mariana Rosolen Tavares^b, Jose Donato Jr.^b, Renata Frazao^{a,*}

^a Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Kiss1
Hypothalamus
VIP receptors
Sex steroids

ABSTRACT

Hypothalamic kisspeptin neurons are the primary modulators of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. It has been shown that circadian rhythms driven by the suprachiasmatic nucleus (SCN) contribute to GnRH secretion. Kisspeptin neurons are potential targets of SCN neurons due to reciprocal connections with the anteroventral periventricular and rostral periventricular nuclei (AVPV/PeN) and the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH). Vasoactive intestinal peptide (VIP), a notable SCN neurotransmitter, modulates GnRH secretion depending on serum estradiol levels, aging or time of the day. Considering that kisspeptin neurons may act as interneurons and mediate VIP's effects on the reproductive axis, we investigated the effects of VIP on hypothalamic kisspeptin neurons in female mice during estrogen negative feedback. Our findings indicate that VIP induces a TTX-independent depolarization of approximately 30% of AVPV/PeN kisspeptin neurons in gonad-intact (diestrus) and ovariectomized (OVX) mice. In the ARH, the percentage of kisspeptin neurons that were depolarized by VIP was even higher (approximately 90%). An intracerebroventricular infusion of VIP leads to an increased percentage of kisspeptin neurons expressing the phospho^{Ser133} cAMP-response-element-binding protein (pCREB) in the AVPV/PeN. On the other hand, pCREB expression in ARH kisspeptin neurons was similar between saline- and VIP-injected mice. Thus, VIP can recruit different signaling pathways to modulate AVPV/PeN or ARH kisspeptin neurons, resulting in distinct cellular responses. The expression of VIP receptors (VPACR) was upregulated in the AVPV/PeN, but not in the ARH, of OVX mice compared to mice on diestrus and estradiol-primed OVX mice. Our findings indicate that VIP directly influences distinct cellular aspects of the AVPV/PeN and ARH kisspeptin neurons during estrogen negative feedback, possibly to influence pulsatile LH secretion.

1. Introduction

The preovulatory peak of the luteinizing hormone (LH) occurring in the late afternoon of proestrus in rodents is synchronized by circadian cues (Bronson and Vom Saal 1979; Christian et al., 2005). The suprachiasmatic nucleus (SCN), which drives circadian rhythms, is comprised of a complex and heterogeneous population of cells that are responsible for the synthesis and release of various biogenic amines and neuropeptides, including the vasoactive intestinal peptide (VIP) (Moore and Speth 1993; Moore et al., 2002). SCN cells modulate the activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons by at least three main mechanisms. The first mechanism involves direct innervation of GnRH

neurons by SCN terminals (de la Iglesia et al., 1995; Van Der Beek et al., 1997; van der Beek et al., 1993), and the second and third refer to reciprocal connections between the SCN and the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) and the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) (Abrahamson and Moore 2001; Gu and Simerly 1997; Hahn and Coen 2006; Saeb-Parsy et al., 2000; Simerly and Swanson 1987; Van Der Beek et al., 1997; Vida et al., 2010; Watson et al., 1995; Wintermantel et al., 2006; Yi et al., 2006).

It is well known that the AVPV and the rostral periventricular nucleus (here referred to as AVPV/PeN) and the ARH are composed of various cell types, including *Kiss1*-expressing cells, known as kisspeptin neurons (Gottsch et al., 2004). Kisspeptin neurons coexpress the

* Corresponding author. Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, São Paulo, 05508-000, Brazil.

E-mail address: rfrazao@usp.br (R. Frazao).

¹ Authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111532>

Received 22 July 2021; Received in revised form 10 December 2021; Accepted 11 December 2021

Available online 13 December 2021

0303-7207/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

- B) Chaves FM et al. Effects of the Isolated and Combined Ablation of Growth Hormone and IGF-1 Receptors in Somatostatin Neurons. *Endocrinology*. 2022 May 1;163(5):bqac045. doi: 10.1210/endocr/bqac045.

JOURNAL ARTICLE

Effects of the Isolated and Combined Ablation of Growth Hormone and IGF-1 Receptors in Somatostatin Neurons

Get access >

Fernanda M Chaves, Frederick Wasinski, Mariana R Tavares, Naira S Mansano, Renata Frazao, Daniela O Gusmao, Paula G F Quaresma, João A B Pedroso, Carol F Elias, Edward O List ... Show more

Endocrinology, Volume 163, Issue 5, May 2022, bqac045,

<https://doi.org/10.1210/endocr/bqac045>

Published: 08 April 2022 **Article history** ▼

“ Cite  Permissions  Share ▼

Abstract

Hypophysiotropic somatostatin (SST) neurons in the periventricular hypothalamic area express growth hormone (GH) receptor (GHR) and are frequently considered as the key neuronal population that mediates the negative feedback loop controlling the hypothalamic–GH axis. Additionally, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) may also act at the hypothalamic level to control pituitary GH secretion via long-loop negative feedback. However, to the best of our knowledge, no study so far has tested whether GHR or IGF-1 receptor (IGF1R) signaling specifically in SST neurons is required for the homeostatic control of GH secretion. Here we show that GHR ablation in SST neurons did not impact the negative feedback mechanisms that control pulsatile GH secretion or body growth in male and female mice. The sex difference in hepatic gene expression profile was only mildly affected by GHR ablation in SST neurons. Similarly, IGF1R ablation in SST neurons did not affect pulsatile GH secretion, body growth, or hepatic gene expression. In contrast, simultaneous ablation of both GHR and IGF1R in SST-expressing cells increased mean GH levels and pulse amplitude in male and female mice, and partially disrupted the sex differences in hepatic gene expression. Despite the increased GH secretion in double knockout mice, no alterations in body growth and serum or liver IGF-1 levels were observed. In summary, GHR and IGF1R signaling in SST neurons play a redundant role in the control of GH secretion. Furthermore, our results reveal the importance of GH/IGF-1 negative feedback mechanisms

- C) de Paula DG, et al. Distinct effects of growth hormone deficiency and disruption of hypothalamic kisspeptin system on reproduction of male mice. *Life Sci.* 2021 Nov 15;285:119970. doi: 10.1016/j.lfs.2021.

Life Sciences 285 (2021) 119970



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

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



Distinct effects of growth hormone deficiency and disruption of hypothalamic kisspeptin system on reproduction of male mice

Daniella G. de Paula^a, Tabata M. Bohlen^a, Thais Tessari Zampieri^a, Naira S. Mansano^a, Henrique R. Vieira^a, Daniela O. Gusmao^b, Frederick Wasinski^b, Jose Donato Jr^b, Renata Frazao^{a,*}

^a Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Fertility
GH deficiency
Kisspeptin
Metabolic imbalance
Monosodium glutamate
Puberty

ABSTRACT

Growth hormone (GH) deficiency is a common cause of late sexual maturation and fertility issues. To determine whether GH-induced effects on reproduction are associated with alterations in hypothalamic kisspeptin system, we studied the male reproduction in two distinct GH deficiency mouse models. In the first model, mice present GH deficiency secondary to arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) lesions induced by postnatal monosodium glutamate (MSG) injections. MSG-induced ARH lesions led to significant reductions in hypothalamic *Ghrh* mRNA expression and consequently growth. Hypothalamic *Kiss1* mRNA expression and *Kiss1*-expressing cells in the ARH were disrupted in the MSG-treated mice. In contrast, kisspeptin immunoreactivity remained preserved in the anteroventral periventricular and rostral periventricular nuclei (AVPV/PeN) of MSG-treated mice. Importantly, ARH lesions caused late sexual maturation and infertility in male mice. In our second mouse model, we studied animals profound GH deficiency due to a loss-of-function mutation in the *Ghrhr* gene (*Ghrhr^{bl/bl}* mice). Interestingly, although *Ghrhr^{bl/bl}* mice exhibited late puberty onset, hypothalamic *Kiss1* mRNA expression and hypothalamic kisspeptin fiber density were normal in *Ghrhr^{bl/bl}* mice. Despite presenting dwarfism, the majority of *Ghrhr^{bl/bl}* male mice were fertile. These findings suggest that spontaneous GH deficiency during development does not compromise the kisspeptin system. Furthermore, ARH *Kiss1*-expressing neurons are required for fertility, while AVPV/PeN kisspeptin expression is sufficient to allow maturation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in male mice.

1. Introduction

Normal somatotrophic axis development is essential for sexual maturation. Previous studies have shown that disturbances in growth hormone (GH) secretion contribute to puberty dysfunctions, which can eventually culminate in infertility [1–11]. Pituitary GH secretion is regulated by hypothalamic neurons that modulate the activity of somatotrophic cells. In turn, GH acts in the liver to control insulin-like growth factor-I (IGF-1) synthesis [12,13]. GH and/or IGF-1 can influence reproductive function by acting on different hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis components. In the gonads, GH and/or IGF-1 promotes steroidogenesis, enhances gonadotropin sensitivity and exerts stimulatory action on spermatogenesis and follicular development [14–16]. In the pituitary, gonadotrophs are direct targets of GH

[17–19]. Consistent with the role of the GH-IGF-1 axis regulating reproduction, GH receptor (GHR) knockout mice exhibit a reduced number of ovarian follicles, delayed testicular development and diminished fertility [6,11,20–22]. IGF-1 knockout mice show a significant reduction in FSH receptor expression and exhibit delayed gonadal development and infertility [23,24]. GH deficient rats exhibit less severe reproduction impairments, presenting normal testicular steroidogenesis and spermatogenesis [25]. However, depending on the animal model, such as mice, GH deficiency leads to subfertility or infertility [25–27].

It has been proposed that GH can also regulate the central components of the HPG axis since GH induces the phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 (pSTAT5) in several hypothalamic nuclei involved in the control of reproduction, including the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) and anteroventral

* Corresponding author at: Dept. Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 room 108, 05508-000, SP, Brazil. E-mail address: rfrazao@usp.br (R. Frazao).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119970>

Received 10 May 2021; Received in revised form 8 September 2021; Accepted 16 September 2021

Available online 22 September 2021

0024-3205/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

D) Wasinski F, et al. Growth hormone receptor in dopaminergic neurones regulates stress-induced prolactin release in male mice. *J Neuroendocrinol.* 2021 Mar;33(3):e12957. doi: 10.1111/jne.12957.

Received: 23 April 2020 | Revised: 3 February 2021 | Accepted: 10 February 2021

DOI: 10.1111/jne.12957

ORIGINAL ARTICLE

Journal of Neuroendocrinology | WILEY

Growth hormone receptor in dopaminergic neurones regulates stress-induced prolactin release in male mice

Frederick Wasinski¹ | Fernanda M. Chaves¹ | João A. B. Pedroso¹ | Naira S. Mansano² | João Paulo Camporez³ | Daniela O. Gusmão⁴ | Edward O. List⁵ | John J. Kopchick⁵ | Renata Frazão²  | Raphael E. Szawka⁴  | Jose Donato Jr¹ 

¹Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

³Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

⁴Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

⁵Edison Biotechnology Institute and Heritage College of Osteopathic Medicine, Ohio University, Athens, OH, USA

Correspondence

Jose Donato Jr, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, São Paulo, SP, 05508-000, Brazil.
Email: jdonato@icb.usp.br

Funding information

National Institute on Aging, Grant/Award Number: R01AG059779; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 16/20897-3, 17/02983-2, 17/21840-8, 17/21854-9, 17/22189-9, 18/04956-5 and 20/01318-8; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 409323/2018-7

Abstract

Arcuate nucleus (ARH) dopaminergic neurones regulate several biological functions, including prolactin secretion and metabolism. These cells are responsive to growth hormone (GH), although it is still unknown whether GH action on ARH dopaminergic neurones is required to regulate different physiological aspects. Mice carrying specific deletion of GH receptor (GHR) in tyrosine hydroxylase (TH)- or dopamine transporter (DAT)-expressing cells were produced. We investigated possible changes in energy balance, glucose homeostasis, fertility, pup survival and restraint stress-induced prolactin release. GHR deletion in DAT- or TH-expressing cells did not cause changes in food intake, energy expenditure, ambulatory activity, nutrient oxidation, glucose tolerance, insulin sensitivity and counter-regulatory response to hypoglycaemia in male and female mice. In addition, GHR deletion in dopaminergic cells caused no gross effects on reproduction and pup survival. However, restraint stress-induced prolactin release was significantly impaired in DAT- and TH-specific GHR knockout male mice, as well as in pegvisomant-treated wild-type males, whereas an intact response was observed in females. Patch clamp recordings were performed in ARH DAT neurones and, in contrast to prolactin, GH did not cause acute changes in the electrical activity of DAT neurones. Furthermore, TH phosphorylation at Ser⁴⁰ in ARH neurones and median eminence axonal terminals was not altered in DAT-specific GHR knockout male mice during restraint stress. In conclusion, GH action in dopaminergic neurones is required for stress-induced prolactin release in male mice, suggesting the existence of sex differences in the capacity of GHR signalling to affect prolactin secretion. The mechanism behind this regulation still needs to be identified.

KEYWORDS

dopamine transporter, hypothalamus, pituitary, tuberoinfundibular dopaminergic, tyrosine hydroxylase

1 | INTRODUCTION

Catecholaminergic neurones are found in numerous brain areas and play important roles regulating different physiological aspects, including arousal, the sympathetic nervous system, motivation/reward,

locomotion, metabolism and the neuroendocrine axes.¹ Dopamine, noradrenaline and adrenaline are the final products of the catecholamine biosynthesis, depending on the expression of specific enzymes that allow the synthesis of each of these substances.¹ Tyrosine hydroxylase (TH) is the rate limiting enzyme in the catecholamine biosynthesis

E) Quaresma PGF, et al. Leptin Receptor Expression in GABAergic Cells is Not Sufficient to Normalize Metabolism and Reproduction in Mice. *Endocrinology*. 2021 Nov 1;162(11):bqab168. doi: 10.1210/endo/bqab168.

Leptin Receptor Expression in GABAergic Cells is Not Sufficient to Normalize Metabolism and Reproduction in Mice [Get access >](#)

Paula G F Quaresma, Frederick Wasinski, Naira S Mansano, Isadora C Furigo, Priscila D S Teixeira, Daniela O Gusmao, Renata Frazao, Jose Donato, Jr. ✉

Endocrinology, Volume 162, Issue 11, November 2021, bqab168,

<https://doi.org/10.1210/endo/bqab168>

Published: 17 August 2021 **Article history** ▼

“ Cite  Permissions  Share ▼

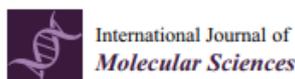
Abstract

Previous studies indicate that leptin receptor (LepR) expression in GABAergic neurons is necessary for the biological effects of leptin. However, it is not clear whether LepR expression only in GABAergic neurons is sufficient to prevent the metabolic and neuroendocrine imbalances caused by LepR deficiency. In the present study, we produced mice that express the LepR exclusively in GABAergic cells (LepR^{VGAT} mice) and compared them with wild-type (LepR^{+/+}) and LepR-deficient (LepR^{Null/Null}) mice. Although LepR^{VGAT} mice showed a pronounced reduction in body weight and fat mass, as compared with LepR^{Null/Null} mice, male and female LepR^{VGAT} mice exhibited an obese phenotype relative to LepR^{+/+} mice. Food intake was normalized in LepR^{VGAT} mice; however, LepR^{VGAT} mice still exhibited lower energy expenditure in both sexes and reduced ambulatory activity in the females, compared with LepR^{+/+} mice. The acute anorexigenic effect of leptin and hedonic feeding were normalized in LepR^{VGAT} mice despite the hyperleptinemia they present. Although LepR^{VGAT} mice showed improved glucose homeostasis compared with LepR^{Null/Null} mice, both male and female LepR^{VGAT} mice exhibited insulin resistance. In contrast, LepR expression only in GABAergic cells was sufficient to normalize the density of agouti-related peptide (AgRP) and α -MSH immunoreactive fibers in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. However, LepR^{VGAT} mice exhibited reproductive dysfunctions, including subfertility in males and alterations in the estrous cycle of females. Taken together, our findings indicate that LepR expression in GABAergic cells, although critical to the physiology of leptin, is insufficient to normalize several metabolic aspects and the reproductive function in mice.

Keywords: cytokines, diabetes, food intake, hypothalamus, obesity, VGAT

Issue Section: Research article

- E) Chaves FM et al. Tumor Necrosis Factor α and Interleukin-1 β Acutely Inhibit AgRP Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 25;21(23):8928. doi: 10.3390/ijms21238928.



Article

Tumor Necrosis Factor α and Interleukin-1 β Acutely Inhibit AgRP Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus

Fernanda M. Chaves ¹, Naira S. Mansano ², Renata Frazão ^{2,*} and Jose Donato Jr. ^{1,*}

¹ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; fernandamchaves@gmail.com

² Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil; naira.mansano@gmail.com

* Correspondence: rfrazao@usp.br (R.F.); jdonato@icb.usp.br (J.D.J.)

Received: 9 November 2020; Accepted: 20 November 2020; Published: 25 November 2020



Abstract: Obesity-associated low-grade inflammation favors weight gain, whereas systemic infection frequently leads to anorexia. Thus, inflammatory signals can either induce positive or negative energy balance. In this study, we used whole-cell patch-clamp to investigate the acute effects of three important proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6, and interleukin-1 β (IL-1 β) on the membrane excitability of agouti-related peptide (AgRP)- or proopiomelanocortin (POMC)-producing neurons. We found that both TNF- α and IL-1 β acutely inhibited the activity of 35–42% of AgRP-producing neurons, whereas very few POMC neurons were depolarized by TNF- α . Interleukin-6 induced no acute changes in the activity of AgRP or POMC neurons. Our findings indicate that the effect of TNF- α and IL-1 β , especially on the activity of AgRP-producing neurons, may contribute to inflammation-induced anorexia observed during acute inflammatory conditions.

Keywords: cytokines; inflammation; interleukin-6; obesity; POMC; sepsis

1. Introduction

The hypothalamus is a brain structure responsible for the regulation of numerous visceral functions, including the control of body temperature, autonomic nervous system, and feeding behavior, among others [1]. Particularly regarding the regulation of energy homeostasis, hypothalamic lesions can produce striking changes in hunger and body weight [2,3]. Several hypothalamic nuclei are involved in the central control of metabolism, even though a well-characterized population is composed of neurons located in the ventral aspects of the third ventricle. In rodents, this area is called the arcuate nucleus (ARH) and is composed of several neurochemically defined neuronal populations [4–7]. In the ventromedial aspects of the ARH, there is a great number of neurons co-expressing agouti-related peptide (AgRP) and neuropeptide Y (NPY) [8]. AgRP/NPY-producing neurons are powerful inducers of hunger, and their activation leads to weight gain [9,10]. A different group of neurons are spread over the lateral part of the ARH and they express proopiomelanocortin (POMC), which is a prohormone cleaved into different peptides, including α -melanocyte-stimulating hormone [11,12]. In contrast to AgRP/NPY-expressing cells, POMC neurons generally promote satiety [13,14].

An important aspect of ARH neurons is that they are very close to the median eminence, which is one of the circumventricular organs of the brain. Therefore, this region possesses a blood-brain barrier less selective than that in other brain areas [15]. Consequently, ARH neurons are exposed to circulating factors such as hormones, cytokines, nutrients, and toxins [15,16]. On the one hand, this characteristic

- F) Furigo IC et al. STAT5 ablation in AgRP neurons increases female adiposity and blunts food restriction adaptations. *J Mol Endocrinol.* 2020 Jan;64(1):13-27. doi: 10.1530/JME-19-0158.

Journal of Molecular Endocrinology	I C Furigo et al.	STAT5 in AgRP neurons regulates metabolism	64:1	13-27
------------------------------------	-------------------	--	------	-------

RESEARCH

STAT5 ablation in AgRP neurons increases female adiposity and blunts food restriction adaptations

Isadora C Furigo¹, Priscila D S Teixeira¹, Paula G F Quaresma¹, Naira S Mansano², Renata Frazão² and Jose Donato Jr¹

¹Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

²Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence should be addressed to J Donato: jdonato@icb.usp.br

Abstract

AgRP neurons are important players in the control of energy homeostasis and are responsive to several hormones. In addition, STAT5 signalling in the brain, which is activated by metabolic hormones and growth factors, modulates food intake, body fat and glucose homeostasis. Given that, and the absence of studies that describe STAT5 function in AgRP cells, the present study investigated the metabolic effects of *Stat5a/b* gene ablation in these neurons. We observed that STAT5 signalling in AgRP neurons regulates body fat in female mice. However, male and female STAT5-knockout mice did not exhibit altered food intake, energy expenditure or glucose homeostasis compared to control mice. The counter-regulatory response or glucoprivic hyperphagia induced by 2-deoxy-D-glucose treatment were also not affected by AgRP-specific STAT5 ablation. However, under 60% food restriction, AgRP STAT5-knockout mice had a blunted upregulation of hypothalamic *Agrp* mRNA expression and corticosterone serum levels compared to control mice, suggesting a possible role for STAT5 in AgRP neurons for neuroendocrine adaptations to food restriction. Interestingly, *ad libitum* fed knockout male mice had reduced *Pomc* and *Ucp-1* mRNA expression compared to control group. Taken together, these results suggest that STAT5 signalling in AgRP neurons regulates body adiposity in female mice, as well as some neuroendocrine adaptations to food restriction.

Key Words

- ▶ neuroendocrine adaptation
- ▶ energy expenditure
- ▶ food intake
- ▶ POMC

Journal of Molecular Endocrinology (2020) **64**, 13–27

Introduction

The arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) is an important sensory relay from peripheral signals to the central nervous system (CNS) receiving information about the availability of fuel sources. As a consequence, ARH neurons coordinate appropriate adaptive responses, for example, regulating food intake and energy expenditure (Könner et al. 2009). Recently, single-cell analysis

performed in the hypothalamus revealed an important heterogeneity of ARH cells indicating that additional investigations are necessary to fully characterize hypothalamic regulations of body energy homeostasis (Lanfray & Richard 2017, Romanov et al. 2017). Among the approximately 50 transcriptionally distinct ARH cell populations, several agouti-related protein (AgRP),