UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

LARISSA CAMPISTA LANA DE MORAES

ANÁLISE MORFOLÓGICA DE NEURÔNIOS QUE EXPRESSAM O RECEPTOR DE LEPTINA DURANTE AS DIFERENTES FASES DA MATURAÇÃO SEXUAL DE CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2019

LARISSA CAMPISTA LANA DE MORAES

Análise morfológica de neurônios que expressam o receptor de leptina durante as diferentes fases da maturação sexual de camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2019

LARISSA CAMPISTA LANA DE MORAES

Análise morfológica de neurônios que expressam o receptor de leptina durante as diferentes fases da maturação sexual de camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Profa. Dra. Renata Frazão

Versão Original

SÃO PAULO
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Moraes, Larissa Campista Lana
Análise morfológica de neurônios que expressam receptor de leptina durante as diferentes fases da maturação sexual de camundongoso / Larissa Campista Lana de Moraes; orientador Renata Frazão. -- São Paulo, 2019.
48 p.

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

1. hipotálamo. 2. leptina. 3. estrógeno. 4. reprodução. 5. desenvolvimento sexual. I. Frazão, Renata , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Larissa Campista Lana de Moraes

Titulo da Dissertação/Tese: Análise morfológica de neurônios que expressa receptor de leptina durante as diferentes fases da maturação sexual de camundongos

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: .....

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Renata Frazão (Boss), pela oportunidade e por ter acreditado em mim, permitindo que eu iniciasse minha vida acadêmica, apesar do pouco conhecimento prévio. Agradeço, também, pela orientação, ensinamentos e, principalmente, pelo apoio dado durante este tempo. Só uma palavra define o sentimento que será levado comigo: gratidão.

Agradeço às minhas colegas de laboratório: Daniela Paula, Naira Mansano, Fernanda Machado e Igor Tomáz. Em especial, à Tabata Bohlen e Thais Zampiere, obrigada por todos os ensinamentos e pelo carinho. Foi uma honra ter tido a oportunidade de aprender e trabalhar com vocês.

Agradeço às minhas amigas, Mariana Burgos e Elisa Nobre por sempre me apoiarem, por comemorarem comigo as minhas conquistas e por compreenderem o motivo da distância. Agradeço, também, à Fernanda Haubenthal, por ter estado comigo durante todo caminho.

Agradeço, principalmente, aos meus pais, Graça Campista e Geraldo Lana. O amor incondicional, o incentivo e os conselhos de vocês foram fundamentais para a minha formação, não só profissional, como pessoal. Vocês são os melhores pais que alguém poderia ter.

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

RESUMO

De Moraes LCL. Análise morfológica de neurônios que expressam receptor de leptina durante as diferentes fases da maturação sexual de camundongos. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

Humanos e camundongos deficientes tanto na produção da leptina quanto na expressão do seu receptor (LepR) são obesos, hiperfágicos e inférteis; o tratamento com reposição de leptina em indivíduos deficientes na produção desse hormônio garante que haja redução no peso corporal, seja retomada ciclicidade estral e a fertilidade. Ainda, o tratamento com leptina em fêmeas pré-púberes normais acelera o início da puberdade, sugerindo que esse hormônio tem papel crucial no tempo de início da puberdade. Ao relacionarmos leptina e puberdade, uma informação interessante é que, neurônios que secretam hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), localizados na área pré-óptica medial (MPO) não coexpressam o LepR. Além disso, embora poucos neurônios que expressam o RNAm que codifica o gene *Kiss1* do núcleo arqueado sejam responsivos à leptina, a sinalização da leptina nesses neurônios só ocorre após a puberdade e, a inativação do LepR nesses neurônios não afeta a reprodução. Por esses motivos, acredita-se que a leptina atue de forma indireta no controle da reprodução. Além dos núcleos MPO e ARH, o núcleo pré-mamilar ventral (PMv), que apresenta uma parcela de neurônios que expressam o LepR, também está envolvido na regulação neuroendócrina da reprodução. Estudos anteriores demonstraram que alterações nos níveis circulantes de estrógeno alteram características biofísicas e morfológicas de neurônios que expressam o gene *Kiss1*. Embora a leptina seja fundamental na maturação sexual não sabemos se os neurônios que expressam o LepR são suscetíveis a essas alterações durante a maturação sexual. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar se neurônios LepR presentes nos núcleos MPO, ARH e PMv sofrem alterações morfológicas durante a maturação sexual e mediante ausência de hormônios gonadais. Foram utilizados camundongos (fêmeas) LepR-Cre *td*Tomato, divididas em 4 grupos experimentais: pré-púberes, púberes, adultas e ovarectomizadas (OVX). A maturação sexual foi avaliada, para determinação do dia da abertura vaginal e primeiro estro. Nas idades específicas os encéfalos foram processados e coletados para posterior quantificação e aferição da área de superfície de neurônios LepR. Realizamos, também, imunoistoquímica de fluorescência para pSTAT3 para quantificar o percentual de neurônios responsivos à leptina. Os resultados obtidos demostraram que ocorreu um aumento no número de neurônios LepR no núcleo ARH com o avanço da idade. Porém, não houveram diferenças significativas quanto ao número de neurônios nos núcleos MPO e PMv. Também não observamos alterações na área de superfície nos núcleos analisados.

Em relação a ativação de neurônios LepR via marcação de pSTAT3, o núcleo MPO apresentou uma diminuição no percentual de neurônios ativos quando comparamos os grupos pré-púberes com os grupos adulta e OVX. O oposto aconteceu no núcleo ARH onde obtivemos um aumento desse percentual com o avanço da idade. Em ambos os núcleos (MPO e ARH) o percentual de neurônios LepR ativados no grupo OVX foi estatisticamente semelhante ao grupo adulta, diferindo somente do grupo pré-púbere. O núcleo PMv não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos analisados. Nossos dados sugerem que estrógeno e leptina podem interagir de formas distintas em diferentes regiões hipotalâmicas.

Palavras-chave: Hipotálamo, receptor de leptina, estrógeno, reprodução, maturação sexual.

ABSTRACT

De Moraes LCL. Morphological analysis of leptin receptor neurons during sexual maturation in mice. [Master thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

Leptin or leptin receptor (LepR) deficient humans and mice are obese, hyperphagic and infertile; leptin replacement in leptin deficient subjects is capable of reducing body mass and restores estrous cyclicity and fertility. In addition, leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice, suggesting that this hormone plays a critical role in the timing of puberty. Interestingly, the gonadotropin releasing hormone neurons, located at the medial pre-optic area (MPO) does not coexpress the LepR. Although few kisspeptin neurons in the arcuate nucleus (ARH; 15%) are responsive to leptin, leptin signaling in kisspeptin neurons arises only after pubertal development and leptin receptor inactivation in kisspeptin cells did not affect reproduction. Therefore, the effects of leptin on reproduction is believed to occur indirectly. In addition to ARH and MPO, the ventral premammillary nucleus (PMv) is also involved in the neuroendocrine regulation of reproduction and a fraction of PMv neurons coexpress LepR. Curiously, previous studies have shown that changing levels of estrogen alters the biophysical properties and morphology of hypothalamic neurons, such as expressing the ones expressing the *Kiss1* gene. Although leptin has an important role on the puberty onset, it is not known whether LepR-expressing neurons are also susceptible to changes in their morphology during sexual maturation. Therefore, our goal was to investigate whether LepR-expressing neurons in the MPO, ARH and PMv nuclei are susceptible to cell morphology modifications throughout the sexual maturation and after manipulation of estrogen levels. LepR-Cre tdTomato mice (females) were divided into 4 experimental groups: prepubertal, pubertal, adult and ovarectomized (OVX). The sexual maturation was evaluated to determine the day of vaginal opening and first estrus. At specific ages the brains were processed and collected for further quantification and measurement of the surface area of LepR neurons. We also performed fluorescence immunohistochemistry for pSTAT3 to quantify the percentage of neurons responsive to leptin. The results showed that there is an increase in the number of LepR neurons in the ARH nucleus with advancing age. However, there were no significant differences in the number of neurons in the MPO and PMv nuclei. We also did not observe changes in the surface area in the nuclei analyzed. In relation to the activation of LepR neurons via pSTAT3 labeling, the MPO nucleus showed a decrease in the percentage of active neurons when comparing the prepubertal groups with the adult and OVX groups. The opposite happened in the ARH nucleus

where we had an increase of this percentage with the advancement of the age. In both nuclei (MPO and ARH) the percentage of LepR neurons activated the OVX group was statistically similar to the adult group, differing only from the pre-pubertal group. The PMv nucleus did not present statistical differences between the analyzed groups. Our data suggest that estrogen and leptin may interact differently in different hypothalamic regions.

Key Words: Hypothalamus, leptin receptor, estrogen, reproduction, sexual maturation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Demonstração da delimitação da área de contagem do número de neurônios LepR nos cortes representativos dos núcleos hipotalâmicos analisados 27
Figura 2: Demonstração da contagem do número total de neurônios LepR em corte coronal representativo de encéfalo de camundongo 28
Figura 3: Fotomicrografia representativa de delimitação de área de superfície do corpo de neurônio LepR 29
Figura 4: Análise de parâmetros do sistema reprodutivo das fêmeas 30
Figura 5: Análise do peso uterino 31
Figura 6: Avaliação de neurônios que expressam o gene Kiss1 nos núcleos arqueado rostral e caudal 32
Figura 7: Área de superfície de neurônios que expressam o gene Kiss1 nos núcleos arqueado rostral e caudal 32
Figura 8: Avaliação de neurônios que expressam o receptor de leptina na área pré-óptica medial 33
Figura 9: Avaliação de neurônios que expressam o receptor de leptina no núcleo arqueado 34
Figura 10: Avaliação de neurônios que expressam o receptor de leptina no núcleo pré-mamilar ventral 35
Figura 11: Imunoistoquímica de fluorescência para marcação do estado fosforilado de neurônios LepR no núcleo arqueado 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Percentual de neurônios responsivos à leptina nos núcleos MPO, ARH e PMv 38

LISTA DE ABREVIATURAS

1E – primeiro estro

3V – terceiro ventrículo

ARH – Núcleo Arqueado

AV – Abertura vaginal

AVPV – Núcleo periventricular anteroventral

ERα – receptor de estrógeno alfa

FSH – hormônio folículo-estimulante

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas

Gpr54 – receptor de kisspeptinas

HPG – eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

hrGFP – proteína verde fluorescente "humanized renilla"

Kiss1 – gene supressor de metastase KiSS-1

JAK2 – proteína Janus Kinase

LepR – receptor de leptina

LepRb – receptor de leptina isoforma b

LH – Hormônio Luteinizante

MPO – área pré-óptica medial

nNOS – neurônios óxido nítrico sintetase

NO – óxido nítrico

OVX – grupo de fêmeas ovarectomizadas

OVX+E2 – grupo de fêmeas ovarectomizadas com reposição de estrógeno

PeN – núcleo periventricular anterior

PMv – núcleo pré-mamilar ventral

pSTAT3 – proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 fosforilada

qo – quiasma óptico

RNAm – ácido ribonucleico mensageiro

SNC – sistema nervoso central

SOCS3 – gene supressor de sinalização de citocinas 3

STAT3 – proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3

STAT5 – proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 5

Y – resíduo de tirosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

1.1 Controle neural da puberdade 15

1.2 A descoberta da leptina 16

1.3 A leptina como fator permissivo para o início da puberdade 17

1.4 Interação entre leptina e neurônios que modulam o eixo reprodutivo 17

1.5 Níveis circulantes de estrógeno podem provocar mudanças morfológicas em neurônios do eixo reprodutivo 20

2 OBJETIVOS 22

2.1 Objetivos específicos 22

3 MATERIAIS E MÉTODOS 23

3.1 Animais experimentais 23

3.2 Genotipagem 23

3.3 Grupos experimentais 24

3.3.1 Fêmeas Kiss1-hrGFP 24

3.3.2 Fêmeas LepR/tdTomato 24

3.4 Coleta e preparo de tecido 25

3.5 Teste de resposta aguda à leptina 26

3.6 Imunoistoquímica de fluorescência para pSTAT3 26

3.7 Aquisição de imagem e Quantificação 27

3.8 Aferição da área de superfície 28

3.9 Análise estatística 29

4 RESULTADOS 30

4.1 Avaliação da maturação sexual 30

4.2 Controle positivo do método para análise da área de superfície 31

4.3 Quantificação e medida da área de superfície dos neurônios LepR na área pré-óptica medial 33

4.4 Quantificação e medida da área de superfície dos neurônios LepR no núcleo arqueado 33

4.5 Quantificação e medida da área de superfície dos neurônios LepR no núcleo pré-mamilar ventral 34

4.6 Percentual de neurônios responsivos à leptina 35

5 DISCUSSÃO **39**
6 CONCLUSÃO **43**
7 REFERÊNCIAS **44**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Controle neural da puberdade

A puberdade é um fenômeno complexo, controlado não só por fatores genéticos e endógenos, como também pelo meio ambiente, na qual características sexuais secundárias são desenvolvidas e se adquire capacidade reprodutiva, além de mudanças comportamentais e psicológicas (Elias 2012; Sanchez-Garrido and Tena-Sempere 2013; Solorzano and McCartney 2010). Para que a puberdade tenha início, ocorre um aumento da secreção e pulsatilidade do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo, sendo este considerado o principal regulador do eixo reprodutivo (Grumbach 2002; Ojeda et al. 2006; Solorzano and McCartney 2010). A população neuronal de GnRH está localizada na área pré-óptica medial (MPO) do hipotálamo e recebe projeções neuronais de núcleos hipotalâmicos importantes relacionados à reprodução (Cavalcante et al. 2014; Glanowska and Moenter 2015; Putteeraj et al. 2016). Neurônios GnRH são ativos durante a fase embrionária e logo no início da vida, até atingir um estado de quiescência, chamado de "pausa juvenil" (Sisk and Foster 2004; Styne 1994). Esse hormônio é liberado na eminência mediana do hipotálamo agindo na adenohipófise, onde estimula a liberação de gonadotrofinas: hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (de Tassigny and Colledge 2010). O padrão pulsátil de secreção de GnRH vai garantir que ocorra a síntese e a secreção, também em pulsos, dos hormônios gonadotróficos (LH e FSH) (J. Donato, Jr. et al. 2011b; Elias 2012; Michalakis et al. 2013). Os hormônios gonadotróficos agem perifericamente nas gônadas (ovários e testículos) estimulando a produção de hormônios sexuais esteroides como estrógeno, progesterona e testosterona, atuando na maturação sexual e na gametogênese; estes hormônios, por sua vez, realizam um feedback negativo modulando a secreção de GnRH no hipotálamo e FSH e LH na adenohipófise (de Tassigny and Colledge 2010; Michalakis et al. 2013).

Os aspectos fisiológicos que fazem com que seja desencadeado o aumento na frequência da pulsatilidade de GnRH e dão início ao processo de maturação sexual ainda não estão completamente esclarecidos. Contudo, alguns sinais são apontados como sendo cruciais para que esse evento ocorra, como por exemplo, o estado nutricional e a reserva energética do indivíduo (Elias 2012). Entende-se que é necessária uma quantidade mínima de gordura corporal para que a puberdade seja iniciada, e que o peso corporal tem mais influência no tempo de início da puberdade do que a própria faixa etária (Ahima et al. 1997; Barash et al. 1996; T. M. Bohlen et al. 2016; Sanchez-Garrido and Tena-Sempere 2013). Neste contexto, a função da leptina, hormônio secretado, principalmente, pelos adipócitos de forma proporcional à

quantidade de gordura corporal (Y. Y. Zhang et al. 1994a), é alvo de diversos estudos no que se refere ao controle neuroendócrino da reprodução.

1.2 A descoberta da leptina.

A leptina foi descoberta após experimentos realizados em linhagens de camundongos que apresentavam peso corporal muito mais elevado que camundongos selvagens. Coleman e colaboradores realizaram estudos de parabiose em camundongos obesos, geneticamente diferentes. Esses estudos de parabiose consistiam em unir, cirurgicamente, animais *db/db* (mutação homozigótica no gene *db*, que codifica a expressão do receptor de leptina [LepR]) e animais *ob/ob* (mutação homozigótica no gene *ob,* que codifica a síntese de leptina) pela pele provocando uma anastomose, ou seja, provocando uma junção na circulação sanguínea desses animais. A partir desses estudos, os pesquisadores puderam concluir que animais *ob/ob,* que tiveram redução de peso corporal, não produziam um determinado fator circulante que era abundante em animais *db/db*, que não respondiam a tal fator circulante. Sugerindo que esse possível fator circulante poderia ser a cura para a obesidade no caso de animais *ob/ob* (Coleman 1973, 2010). Foi somente 40 anos depois que ocorreu a descoberta do gene que se pensava ser o responsável pelo efeito observado nos estudos de parabiose realizados por Coleman e colaboradores (Munzberg and Morrison 2015; Y. Zhang et al. 1994b). A descoberta do hormônio leptina foi inicialmente pensada como a cura para a obesidade humana e, subsequente a isso, a produção de leptina recombinante se seguiu rapidamente. Entretanto, injeções de leptina aplicadas em pacientes obesos foram capazes de corrigir somente raros casos de obesidade e alguns casos de anormalidades neuroendócrinas associadas à deficiência de leptina (Farooqi et al. 1999; Munzberg and Morrison 2015; Rodgers et al. 1998; Y. Zhang et al. 1994b). Para a maioria dos casos de obesidade, os níveis circulantes de leptina eram altos e correlacionados positivamente com a adiposidade do indivíduo. Além disso, as injeções de leptina que foram administradas em modelos experimentais obesos, que não apresentavam mutação genética relacionada ao gene que codifica a leptina, não foram capazes de reduzir o peso corporal e o consumo alimentar quando comparados com camundongos controle, condição está conhecida, hoje, como resistência a leptina. Essa mesma condição foi vista também em pacientes humanos, ou seja, a maioria dos pacientes obesos não respondeu ao tratamento feito com leptina.

1.3 A leptina como fator permissivo para o início da puberdade

Os níveis circulantes de leptina são percebidos pelo SNC e este modula o eixo reprodutivo informando se os níveis de reserva energética estão adequados, permitindo que aconteça a maturação sexual, reprodução, gestação e lactação, eventos que demandam um gasto de energia considerável (Ahima et al. 1997; Barash et al. 1996; Park and Ahima 2015; Roa and Tena-Sempere 2014). Casos onde não há estoque energético suficiente, resultam em um atraso no início da puberdade e infertilidade; ou em caso contrário, quando há excesso de gordura (obesidade), puberdade precoce (Barash et al. 1996; T. M. Bohlen et al. 2016; Chan et al. 2003; Kiess et al. 1999; Roa and Tena-Sempere 2014; Sanchez-Garrido and Tena-Sempere 2013). Além disto, estudos realizados em humanos e camundongos fêmeas *ob/ob* ou *db/db*, além de apresentarem hiperfagia e serem obesas, são inférteis. Camundongos fêmeas *ob/ob*, quando tratadas com leptina, apresentam redução de peso corporal, e passam a apresentar ciclo estral e fertilidade (Ahima et al. 1997; Licinio et al. 2004); o mesmo resultado de tratamento é observado em humanos que apresentam deficiência na produção de leptina (Licinio et al. 2004). Ainda, o mesmo tipo de tratamento, quando realizado em camundongos fêmeas pré-púberes (sem nenhum tipo de déficit na síntese de leptina), acelera o início da puberdade sem que ocorra nenhuma alteração no peso corporal (Ahima et al. 1997). Além disto, indivíduos (animais e humanos) deficientes na expressão do gene *ob* apresentam baixos níveis de LH circulante, que são reestabelecidos após a administração de doses de leptina (Barash et al. 1996; Welt et al. 2004). Isso mostra que a leptina age como um fator permissivo para o início da puberdade e reprodução, desde que o estado nutricional do indivíduo e a sinalização da leptina no sistema nervoso central estejam adequados (Ahima et al. 1997; Chan et al. 2003; Farooqi and O'Rahilly 2009; Kiess et al. 1999; Licinio et al. 2004; Montague et al. 1997).

1.4 Interação entre a leptina e neurônios que modulam o eixo reprodutivo

A atuação da leptina se dá através da sua ligação ao seu receptor (LepR). Há 6 isoformas do receptor de leptina (LepRa-f) que são geradas a partir de splicing alternativos do gene que codifica o LepR. A isoforma b do LepR é chamada de isoforma longa, além de ser considerada a isoforma funcional do receptor de leptina e é responsável pelos principais efeitos da leptina como, por exemplo, homeostase energética e outras funções neuroendócrinas. Para este trabalho, definimos LepRb como LepR. Esta isoforma apresenta um extenso domínio de sinalização intracelular quando ativado. A ligação da leptina nesse receptor permite o recrutamento e a ativação da proteína janus kinase (JAK2) que propaga uma autofosforilação e a fosforilação de 3 resíduos de tirosina (Y) no próprio receptor e cada uma dessas 3 fosforilações

induz uma cascata de sinalização com funções fisiológicas específicas. Os resíduos Y^{1077} e Y^{1138} são necessários para a fosforilação e recrutamento das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição 5 e 3 (STAT5 e STAT3), respectivamente (Myers et al. 2008). Quando fosforilada, a proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (pSTAT3) age no núcleo celular estimulando a transcrição de genes, incluindo a transcrição do gene supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS-3). A proteína SOCS-3, por sua vez age no resíduo Y^{985}, que vai ser responsável por inibir a sinalização do LepR, bloqueando a atividade da JAK2 e provocando um sistema de feedback negativo (Bjørbæk et al. 2000; Myers et al. 2008).

O LepR é expresso em diversos tipos celulares, incluindo diversas áreas do sistema nervoso central (SNC). Um núcleo hipotalâmico importante no controle da reprodução e que apresenta neurônios que expressam o LepR é o MPO (Bellefontaine et al. 2014; J. Donato et al. 2010). O núcleo MPO contém neurônios que sintetizam GnRH sendo estes essenciais para o controle da reprodução, como citado anteriormente. Os neurônios GnRH não coexpressam o LepR, sugerindo que a possível ação da leptina sobre o eixo reprodutivo ocorra de forma indireta (Louis et al. 2011; Quennell et al. 2009). Sabe-se que neurônios localizados no núcleo MPO são responsivos a hormônios sexuais e lesões nessa região podem interromper o comportamento sexual de ambos, machos e fêmeas (McCarthy et al. 2008; Saper and Lowell 2014). No núcleo MPO encontramos uma grande concentração de neurônios que expressam o LepR e que sintetizam óxido nítrico sintetase (nNOS), atuando como mediadores na sinalização da leptina no que diz respeito ao eixo reprodutivo. Está bem estabelecido na literatura que neurônios GnRH, presentes no núcleo MPO, não coexpressam o LepR, sendo a atuação da leptina nesses neurônios feita por neurônios intermediários, responsivos à leptina (Louis et al. 2011; Quennell et al. 2009). Estudos mostram que neurônios nNOS estão envolvidos na coordenação de sinais metabólicos e que a sinalização de NO na região MPO é essencial para o efeito da leptina no eixo reprodutivo, uma vez que a liberação de NO está diretamente ligada ao estímulo de secração de GnRH. Com isso, neurônios nNOS são ativados diretamente pela leptina, facilitando seu efeito no eixo reprodutivo e a deleção de LepR em neurônios nNOS provoca um atraso significativo no início da puberdade (Zuure et al. 2016).

Nesse contexto, outras populações neuronais localizadas no hipotálamo, que também estão envolvidas com o controle do eixo reprodutivo, foram analisadas afim de compreender a dimensão da influência da leptina. Um desses grupamentos neuronais se refere aos neurônios que expressam o gene *Kiss1* (denominados como "neurônios Kiss1" no presente projeto), presentes nos núcleos periventricular anteroventral (AVPV), periventricular anterior (PeN) e também no ARH (Gottsch et al. 2004). Estudos realizados em 2003 demonstraram que

mutações no gene *Kiss1* ou no gene que codifica a expressão do receptor ao qual as kisspeptinas se ligam, denominado como *Kiss1R* (ou *Gpr54)*, são acompanhadas por um quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico e infertilidade, tanto em humanos como em roedores (de Roux et al. 2003; Funes et al. 2003; Seminara et al. 2003). A kisspeptina, produto da expressão do gene *Kiss1*, acabou se mostrando, então, indispensável para o controle neuroendócrino da puberdade e da fertilidade uma vez que seu receptor é expresso em neurônios que sintetizam o GnRH e controla a secreção deste hormônio (Han et al. 2005; Messager et al. 2005). Apesar do núcleo arqueado (ARH) ser o núcleo que apresenta maior expressão do RNAm que codifica a expressão do LepR (Scott et al. 2009), somente cerca de 10 a 15% dos neurônios Kiss1 coexpressam o LepR (fêmeas adultas em diestro), sendo que, este baixo percentual de neurônios Kiss1 do ARH são responsivos à leptina somente após a puberdade já ter sido desencadeada (Cravo et al. 2013). Entretanto, os neurônios Kiss1 localizados nos núcleos AVPV e PeN não expressam o LepR e não são considerados responsivos à leptina (Cravo et al. 2011; Cravo et al. 2013). Além disto, camundongos geneticamente modificados que sofrem deleção seletiva de LepR nos neurônios Kiss1 apresentam maturação sexual normal e são férteis, sugerindo que a sinalização da leptina nesses neurônios não é necessária para que ocorra o desenvolvimento da puberdade (Cravo et al. 2011).

Ao entender que a leptina tem papel fundamental para que ocorra a maturação sexual, o núcleo pré-mamilar ventral (PMv) foi posto em evidência justamente por apresentar grande quantidade de neurônios que expressam o LepR, por apresentar neurônios que expressam receptores para hormônios sexuais esteroides que são ativados por exposição a odores sexuais, além de emitir projeções para outros núcleos hipotalâmicos relacionados à reprodução (Canteras et al. 1992; J. Donato et al. 2009; Leshan et al. 2009). Esse núcleo está bem posicionado anatomicamente para que seus neurônios integrem sinais sexualmente relevantes (como assimilar o odor de machos), comportamento reprodutivo (detecção de hormônios sexuais), respostas neuroendócrinas (estimulação da secreção de LH) e pistas metabólicas (receptores para leptina) (Cavalcante et al. 2014; J. Donato et al. 2011a). Neurônios LepR, presentes no núcleo PMv, emitem projeções para áreas relacionadas ao eixo reprodutivo, inervando, por exemplo, regiões onde neurônios Kiss1, na região do AVPV e ARH, e neurônios GnRH, na área MPO, estão localizados indicando que neurônios presentes nesses núcleos podem sofrer influência indireta da leptina via neurônios do PMv (J. Donato et al. 2009; Louis et al. 2011). Em 2011, foi realizado um estudo (J. Donato et al. 2011a) com um modelo experimental de camundongos geneticamente modificados que não expressam o LepR, onde foi realizada reexpressão de LepR somente no núcleo PMv. A reexpressão do LepR apenas no

PMv é capaz de induzir a puberdade e retomar a maturação sexual na maioria das fêmeas avaliadas. Porém, a reexpressão do LepR não corrige o fenótipo de obesidade (ocasionado pela falta de sinalização da leptina) e nem as diversas disfunções endócrinas, uma vez que a maioria das fêmeas grávidas sofreu aborto, fato que pode estar relacionado ao fenótipo de obesidade e diabetes que animais que não expressam o LepR apresentam (J. Donato et al. 2011a). Além disto, percebeu-se que a deficiência na sinalização de leptina, no núcleo PMv, é acompanhada por um aumento no conteúdo de secreção dos neurônios GnRH localizados na eminência mediana (J. Donato et al. 2011a), corroborando outros estudos que mostram que a secreção de GnRH é inibida em fêmeas que apresentam essa deficiência e que a leptina atua estimulando a liberação de GnRH (Johnson and Sidman 1979; Wojcik-Gladysz et al. 2009). Após a reexpressão do receptor de leptina somente no PMv, o conteúdo de secreção de neurônios GnRH é normalizado (J. Donato et al. 2011a). Esse e outros estudos demonstram que o núcleo PMv é fundamental para a ação da leptina permitindo que ocorra maturação sexual e que, portanto, a ação direta da leptina no núcleo PMv não só é necessária, como também é suficiente para o início da puberdade (J. Donato et al. 2011a; Louis et al. 2011).

1.5 Níveis circulantes de estrógeno podem provocar mudanças morfológicas em neurônios do eixo reprodutivo

Dentre as alterações induzidas pela redução dos níveis circulante de estrógenos, seja em decorrência da idade ou à cirurgia para remoção dos ovários, mudanças importantes no SNC, do ponto de vista da morfologia e excitabilidade neuronal acontecem, porém estas não são completamente compreendidas (Frazao et al. 2013; Rance et al. 1990; Rance and Young 1991; Rometo et al. 2007). Alguns estudos mostram que mudanças nos níveis circulantes de estrógeno, podem alterar propriedades não só biofísicas como também morfológicas de populações neuronais envolvidas no controle do eixo reprodutivo, como os neurônios Kiss1 (Frazao et al. 2013; McCarthy et al. 2008; Rance et al. 1990; Rance and Young 1991; Rometo et al. 2007; Schwarz et al. 2008). O grupo de Rance *et al.* (Abel and Rance 2000; Rance et al. 1990; Rance and Young 1991) demostrou que há um aumento de 30% no tamanho de uma subpopulação de neurônios que expressam o RNAm para receptor de estrógeno (ERα) presentes no núcleo infundibular quando comparados aos cortes encefálicos de mulheres antes e após a menopausa, sem que haja alteração no número de neurônios. Os neurônios hipertrofiados tem características marcantes, como por exemplo, corpo celular, núcleo e nucléolo aumentados, sendo que, na análise da mesma área hipotalâmica de mulheres jovens,

raramente neurônios com essa morfologia são encontrados (Abel and Rance 2000). Rometo *et al.* (2007), demonstraram que ocorre um aumento nítido no diâmetro dos neurônios que expressam o gene *Kiss1* (do núcleo infundibular do hipotálamo e do ARH, respectivamente), bem como, aumento significativo do RNAm que codifica o gene *Kiss1*, tanto em mulheres em um período pós menopausa como em primatas (*Macaca fascicularis)* que foram submetidas a ovarectomia (Rometo et al. 2007), sugerindo que as mudanças na morfologia e expressão gênica observadas, tanto em mulheres pós-menopausa quanto em primatas ovarectomizadas, são secundárias à perda de estrógeno ovariano. Além da hipertrofia e do aumento da expressão do gene *Kiss1* nesses neurônios, esse estudo mostra que o número de neurônios praticamente dobra em mulheres pós menopausa e primatas ovarectomizadas (Rometo et al. 2007). Além de mudanças morfológicas, Frazão et al. (2013) demonstraram, em camundongos, que ao longo da maturação sexual, bem como quando os níveis circulantes de estrógenos são manipulados, ocorrem mudanças significativas em termos de excitabilidade de membrana dos neurônios Kiss1. Um outro dado relevante apresentado por estes autores, que corrobora as alterações morfológicas citadas anteriormente, se refere ao aumento significativo da capacitância celular que também pode ser modulada pelos níveis circulantes de estrógenos diminuídos (Frazao et al. 2013). A capacitância celular é um parâmetro eletrofisiológico, que serve como indicativo do tamanho da área da membrana celular (Sakmann and Neher 2009). Embora diversos estudos tenham notado alterações significativas no que se refere a morfologia e excitabilidade de neurônios Kiss1, não existem descrições semelhantes a respeito da morfologia de outras classes neuronais durante a maturação sexual e mediante a modulação dos níveis de estrógenos circulantes (Frazao et al. 2013; Rance and Young 1991; Rometo et al. 2007).

Desta forma, sabendo que a leptina exerce um papel crucial no controle neuroendócrino do eixo reprodutivo e que mudanças nos níveis de estrógeno circulante provocam alteração morfológica em neurônios Kiss1, o presente projeto investigou se os neurônios que expressam o LepR nos núcleos MPO, ARH e PMv sofrem alterações morfológicas durante a maturação sexual e mediante a manipulação dos níveis de estrógenos circulantes. Compreender se os neurônios que expressam o LepR sofrem alterações de morfologia representa um passo importante no estudo das diferenças neuronais que acompanham o fenômeno da maturação sexual, uma vez que essas alterações podem indicar possíveis alterações na atividade neuronal.

2 OBJETIVOS

Avaliar se neurônios que expressam o LepR presentes nos núcleos MPO, ARH e PMv sofrem alterações morfológicas durante as diferentes fases da maturação sexual e ou em condição de ausência de hormônios sintetizados pelas gônadas.

2.1 Objetivos específicos

1. Determinar a área de superfície de neurônios Kiss1 no núcleo ARH em diferentes condições hormonais como controle positivo da metodologia;

2. Quantificar o número de neurônios que expressam o LepR nos núcleos MPO, ARH e PMv em diferentes estágios da maturação sexual e em condição de ausência de hormônios gonadais.

3. Determinar a área de superfície de neurônios que expressam o LepR nos núcleos MPO, ARH e PMv em diferentes estágios da maturação sexual e em condição de ausência de hormônios gonadais;

4. Determinar o percentual de neurônios responsivos à leptina nos núcleos MPO, ARH e PMv em diferentes estágios da maturação sexual e em condição de ausência de hormônios gonadais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos (fêmeas) geneticamente modificados, que apresentam a expressão da enzima Cre recombinase em células que expressam o LepR (LepRbIRES-Cre - B6.129-Leprtm2(cre)Rck/J, Jackson Laboratories); a descrição e a caracterização desse animal geneticamente modificado já foi realizada anteriormente (Scott et al. 2009). Os animais LepR-Cre foram cruzados com animais que expressam a proteína fluorescente vermelha tdTomato, condicionalmente à atividade da Cre recombinase (Creinducible tdTomato-reporter – Gt (ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J, Jackson Laboratories). Portanto, neste caso, a proteína fluorescente é expressa exclusivamente em células que expressam o LepR, ou seja, apenas as células que expressam o LepR serão visualizadas por meio dessa proteína, sem a necessidade de qualquer reação para sua marcação. Isso torna esse modelo ideal para uso em experimentos que visam estudar especificamente as células que expressam o LepR.

Os animais foram mantidos 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 21/2017).

3.2 Genotipagem

O tecido utilizado para realização da genotipagem foi composto de amostras da ponta da cauda do animal. Para os procedimentos de extração e amplificação de DNA foi utilizado o Sigma-Extract-N-Amp™ Tissue PCR, procedimentos conforme manual do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram submetidas a procedimento de amplificação para identificação das regiões mutadas utilizando primers específicos para a identificação LepR-Cre (5'-ACCTGTTCCACGCACAGTCACA -3'; 5'-AGCTGGCCAAATCTCAGAGCTGC -3'; 5'-TGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT -3'; 5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCAC -3') e para o tdTomato (5'-AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA-3'; 5'-CCGAAAATCTGTGGGAAGTC-3'; 5'-GGCATTAAAGCAGCGTATCC-3'; 5'-CTGTTCCTGTACGGCATGG-3'). As fêmeas experimentais foram aquelas que expressaram o LepR-Cre em homozigoze e o gene que codifica a proteína tdTomato em heterozigose ou homozigose.

3.3 Grupos experimentais

3.3.1 Fêmeas Kiss1-hrGFP

Foram utilizadas fêmeas de genótipo Kiss1/hrGFP (10-12 semanas de idade), dividas em 3 grupos experimentais: Grupo I- Diestro, Grupo II- Ovarectomizadas (OVX) e Grupo III- Ovarectomizadas + Estradiol (OVX + E2). Animais Kiss1-hrGFP foram tratados e tiveram seus encéfalos coletados anteriormente por Paradela, 2015. No Grupo I as fêmeas Kiss1/hrGFP foram sacrificadas quando estavam no segundo dia consecutivo da fase de diestro (n= 3). No Grupo II as fêmeas Kiss1/hrGFP foram submetidas a cirurgia para remoção dos ovários (n= 3) e, no grupo III as fêmeas Kiss1/hrGFP foram ovarectomizadas e subsequentemente receberam implante de cânula preenchida com E2 (n= 3); as cânulas contendo E2 foram preparadas quatro dias antes da cirurgia para o implante. Para o preparo da cânula, um tubo de material plástico específico (Dow Corning) foi cortado no tamanho de 1,8cm e uma de suas extremidades selada com silicone; no segundo dia, as cânulas foram preenchidas com E2 previamente diluído em óleo de sésamo (Sigma), sendo que, o conteúdo da cânula apresentava concentração final de 0.625 micrograma por microlitro, sendo a outra extremidade da cânula selada como mencionado; no terceiro dia, as cânulas foram lavadas e mantidas em solução salina por um período mínimo de 12 horas. Após este período, as cânulas foram implantadas via subcutânea na região dorsal do animal logo após a remoção dos ovários (Christian et al. 2005; Frazao et al. 2013; Frazao et al. 2014; Paradela 2015). As fêmeas OVX+E2 foram sacrificadas no terceiro dia após o procedimento cirúrgico e implante da cânula (n= 3) (Paradela 2015).

3.3.2 Fêmeas LepR/tdTomato

Após a genotipagem, as fêmeas foram selecionadas para os experimentos nas seguintes idades: grupo pré-púbere (8-12 dias de vida); grupo púbere (38-42 dias de vida); grupo adulto (80-100 dias de vida, segundo dia de diestro) e grupo ovarectomizadas (120-160 dias de vida). As fêmeas dos grupos púberes, adultas e ovarectomizadas foram acompanhadas diariamente durante o desenvolvimento sexual a partir do desmame (aproximadamente 21 dias). O acompanhamento da maturação sexual foi feito observando-se a data da abertura vaginal, primeiro estro (presença células cornificadas) e início da ciclicidade estral. Esse acompanhamento foi feito através da coleta diária do lavado vaginal das fêmeas com salina a partir do dia em que foi observado a abertura vaginal. Os animais foram acompanhados pela manhã (intervalo entre 10 e 11 horas da manhã). As fêmeas foram selecionadas para experimento desde que a maturação sexual fosse observada em faixa de idade considerada normal (conforme dados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa) e no caso do animais

adultos após constatação da regularidade do ciclo estral (Bohlen *et al.*, 2016). O peso corporal foi verificado nos dias em que foram detectados os eventos descritos abertura vaginal e primeiro estro, bem como, no dia da eutanásia. Os animais do grupo pré-púbere tiveram seu peso aferido apenas no dia do sacrifício.

A ovarectomia (OVX) foi realizada após sedação do animal com ketamina e xilazina (80µg/g; 10µg/g). Em seguida foi realizada uma incisão na região dorsal entre o rebordo costal inferior e a coxa, após a assepsia desta região; foi realizada a incisão na pele e camada muscular para termos acesso a cavidade abdominal e após localização do ovário, o mesmo foi removido. Após remoção, a camada muscular foi suturada e, em seguida, a pele. O mesmo procedimento foi repetido do lado contralateral para a retirada do ovário do lado oposto. Após 30 dias, as fêmeas foram sacrificadas para coleta do encéfalo. As fêmeas do grupo OVX também tiveram seu peso aferido no dia cirurgia, bem como no dia da eutanásia. Além disso, coletamos os úteros de todas as fêmeas para aferição do peso uterino.

3.4 Coleta e preparo de tecido

Os animais, de cada grupo específico, foram anestesiados e após confirmação da anestesia (onde o animal não se mostrou responsivo), estes foram submetidos a perfusão transcardíaca. As eutanásias dos animais LepR/tdTomato ocorreram no período entre 10:00 e 12:00 horas e, dos animais Kiss1-hrGFP entre 12:00 e 14:00, sendo que os encéfalos dos animais Kiss1-hrGFP foram coletados anteriormente por Paradela, 2015. Para a realização da perfusão transcardíaca foi realizada a abertura da caixa torácica fazendo o rebatimento da porção ventral do gradil costal, expondo o coração de forma que a visualização fosse adequada para o procedimento. Foi realizado um pequeno corte no átrio direito para permitir que o sangue fosse retirado por completo do sistema circulatório; uma agulha foi inserida no ventrículo esquerdo e, através de um sistema de bomba de perfusão, inicialmente, solução salina 0,9% foi infundida até o clareamento do fígado. Na sequência a solução salina foi substituída por uma solução tamponada de formalina a 10%, sendo o volume e velocidade de fluxo ajustado para cada grupo. Após a perfusão, os encéfalos foram coletados e permaneceram em solução tamponada de formalina 10% por 1h (período de pós-fixação); passado esse período, os encéfalos foram transferidos para uma solução de crioproteção de tampão fosfato de potássio (KPBS) 0,02M mais 20% de sacarose, ficando em geladeira por um período de 24 - 48 hs quando, então, foram submetidos a microtomia. Os encéfalos coletados foram seccionados em cortes coronais de 30 µM em micrótomo (SM2010R, Leica) e organizados em quatro séries representativas. Os cortes foram colocados em solução crioprotetora e foram armazenados em

freezer a -20 ºC para posterior montagem de lâminas. Na sequência, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, e cobertas com lamínulas utilizando solução Dapi-Fluoromount-G™ (EMS) como meio de montagem.

3.5 Teste de resposta aguda à leptina

Para determinar o percentual de células responsivas à leptina em cada núcleo de interesse, os animais LepR/tdTomato foram separados em 3 grupos: pré-púbere, adulta e OVX. As fêmeas foram colocadas em jejum por um período de 4 horas (com início entre 9 e 11 horas da manhã). Após as 4 horas, injetamos leptina ou PBS Dubeco (solução utilizada para diluição da leptina) em uma concentração de 2,5 μl por grama de peso corporal do animal. Após noventa minutos os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca. Na sequência os encéfalos foram coletados, pós-fixados e seccionados em cortes coronais de 30 μm, sendo coletados em 4 séries representativas e armazenados em solução crioprotetora.

3.6 Imunoistoquímica de fluorescência para pSTAT3

Uma das séries representativas de cortes de cada animal experimental que recebeu injeção de salina ou leptina, foi submetida à imunoistoquímica de fluorescência para marcação de pSTAT3. Os cortes foram lavados em KPBS 0,02M. Após ser lavado, o tecido foi colocado em solução contendo água destilada, 1% de peróxido de hidrogênio e 1% de hidróxido de sódio por 20 minutos. Após esse tempo, o tecido foi lavado novamente em KPBS 0,02M e colocado em solução de KPBS 0,02M com 0,3% de glicina por 10 minutos. Lavou-se a série de cortes em KPBS 0,02M e em seguida colocamos os cortes em solução de KPBS 0,02M com 0,03% de SDS à 10% por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram transferidos para tubo do tipo ependorff contendo 1 ml de KPBS 0,02M-Triton X-100, 3% de soro normal de burro (NDS) onde ficaram por um período de 1 hora. Após esse período, os cortes passaram para um outro tubo do tipo ependorff com solução contendo 1 ml de KPBS 0,02M -Triton X-100 com azida, 3% de soro normal de burro (NDS) e 1 μl de anticorpo primário (1:1000; pSTAT3, coelho) onde ficaram por um período de 48 horas. Passadas as 48 horas, os cortes foram lavados novamente em KPBS 0,02M e transferidos para um tubo do tipo ependorff com solução contendo 1 ml de KPBS 0,02M -Triton X-100 e 2 μl de anticorpo secundário (1:500; Alexa Fluor 488, anti-coelho) por noventa minutos. Os cortes foram lavados e, em seguida, montados em lâminas gelatinizadas e cobertos com meio de montagem Fluoromount-G™ (EMS).

3.7 Aquisição de imagens e Quantificação

Para análise do material obtido, um nível representativo do MPO (bregma 0,62 a 0,38 mm), dois níveis do ARH, nível rostral (bregma -1,70 mm a -2,06) e nível caudal (bregma -2,18 a -2,54 mm) e um nível do PMv (bregma -2,46 a -2,54 mm) foram selecionados para análise com base no Atlas The Mouse Brain (Franklin and Paxinos). Fotomicrografias das referidas áreas foram realizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss). Foram utilizados os filtros adequados para captura de imagem da proteína tdTomato (marcador das células que expressam o LepR em nosso modelo experimental), Dapi-Fluoromount-G e, fluoresceína conjugada à anticorpo secundário para visualização das células imunorreativas à pSTAT3. Com a ajuda do software ImageJ, delimitamos a região de contagem de neurônios LepR em cada corte representativo, conforme apresentado na Figura 1.

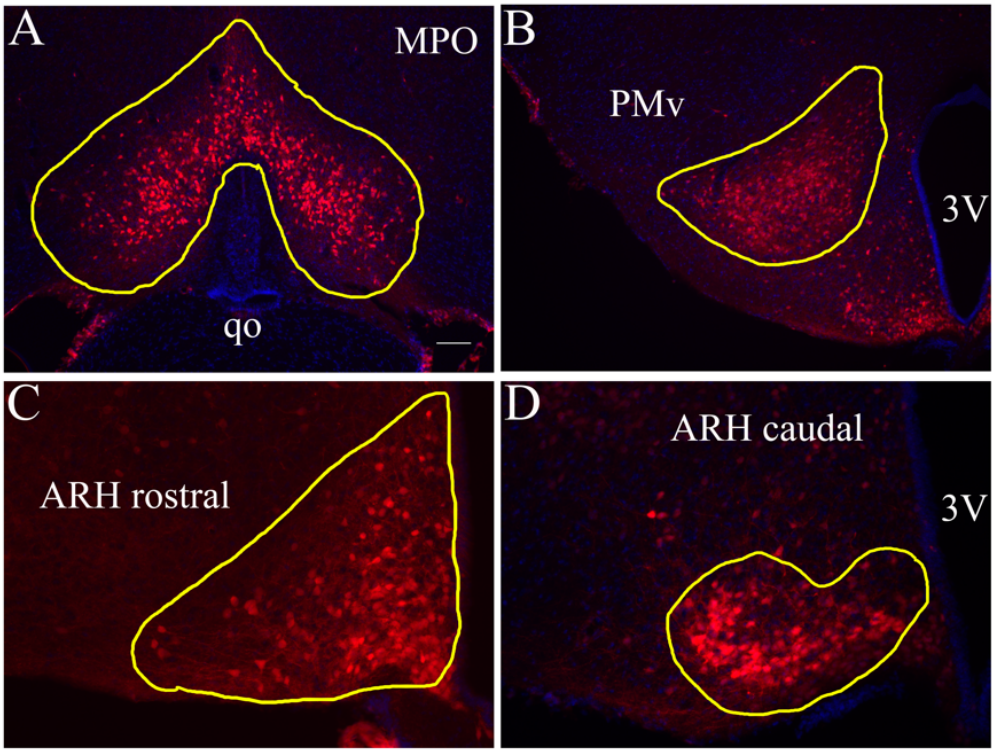

Figura 1: Demonstração da delimitação da área de contagem do número de neurônios LepR nos cortes representativos dos núcleos hipotalâmicos analisados. Fotomicrografias em fluorescência demonstrando cortes coronais do encéfalo de camundongo contendo área pré-óptica medial (MPO) **(A)**, núcleo pré-mamilar ventral **(B)** e núcleo arqueado rostral **(C)** e caudal **(D)**. Delimitação da área de contagem do número de neurônios representada pela linha amarela. Abreviaturas: oq, quiasma óptico, 3V, terceiro ventrículo. Escala =100 µm.

A contagem do número de neurônios foi realizada, manualmente, em um corte representativo no eixo rostrocaudal de cada núcleo escolhido com base no atlas de referência e

conforme descrito na literatura (Tabata Mariz Bohlen et al. 2018; Silveira et al. 2017). Após selecionarmos a imagem de interesse, utilizamos a ferramenta "Cell Couter", presente no software ImageJ, para contar o número de neurônios totais naquela sessão representativa do núcleo. Com essa ferramenta, conseguimos ampliar a imagem até termos uma visão satisfatória dos neurônios e, então, marcar um ponto em cada neurônio LepR no qual era possível delimitar o corpo celular (Figura 2) sendo, assim, contabilizados o número total de neurônios, dentro do perímetro de cada núcleo, ao final da marcação.

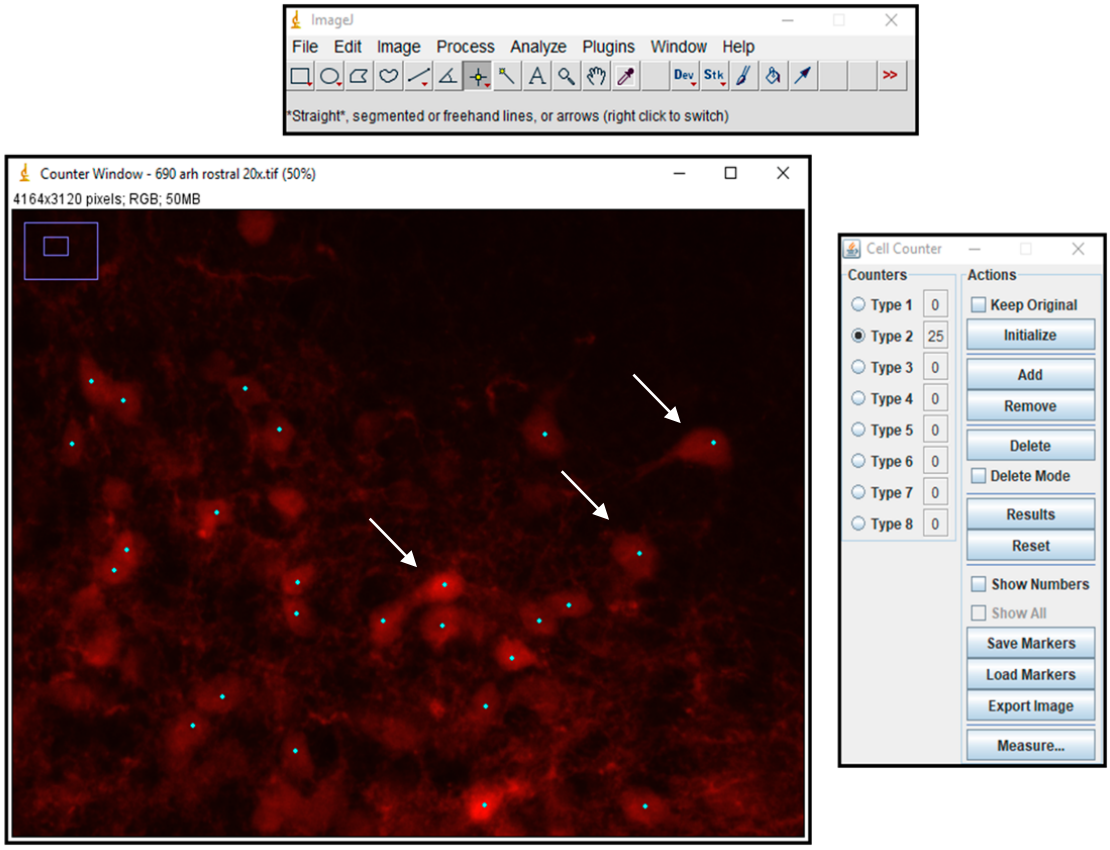

Figura 2: Demonstração da contagem do número total de neurônios LepR em corte coronal representativo de encéfalo de camundongo. Imagem representativa do software Image J, aplicando a ferramenta "Cell Counter" para contagem do número de neurônios LepR. Cada neurônio considerado na contagem é marcado com um ponto branco, sendo o número total contabilizado pela própria ferramenta do software. São considerados na contagem somente neurônios cujo corpo celular estava delimitado (setas).

3.8 Aferição da área de superfície

Para a aferição da área de superfície utilizamos o software ImageJ, com auxílio da ferramenta "ROI Manager – Measure". Em cada núcleo específico, foi quantificada a área de superfície de 10 neurônios por núcleo, circundando manualmente o corpo dos neurônios. Os

neurônios foram escolhidos de forma aleatória em cada região, sendo que, apenas neurônios com o corpo delimitado foram selecionados para análise (Figura 3).

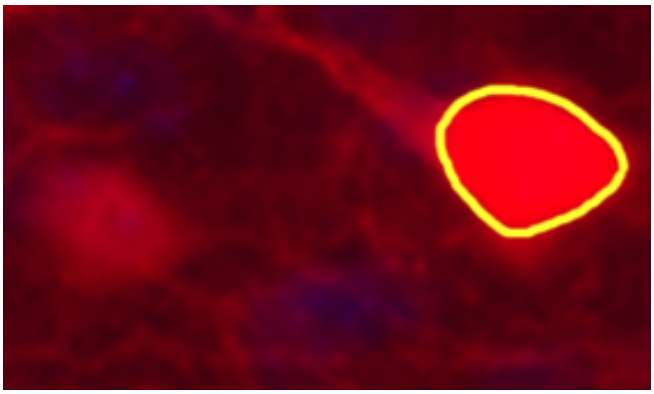

Figura 3*:* Fotomicrografia representativa da delimitação da área de superfície do corpo de neurônio LepR. Fotomicrografia em fluorescência demonstrando um neurônio que expressa a proteína *td*Tomato (LepR) que foi selecionado para a análise. A aferição da área de superfície de neurônios LepR foi realizada com o uso da ferramenta "ROI Manager – Measure", Image J. Delimitação da área de superfície do corpo de neurônio, realizada manualmente, exemplificado pela linha amarela.

3.9 Análise estatística

Os dados obtidos em cada grupo foram submetidos à análise de variância de uma via. Os resultados foram demonstrados como média ± erro padrão (EP). A análise estatística foi realizada com o uso do software GraphPad Prism.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da maturação sexual

Todas as fêmeas LepR utilizadas no presente projeto foram acompanhadas a partir do dia do desmame (21 dias), com exceção das fêmeas do grupo pré-púbere, visto que, a coleta dos encéfalos foi realizada anteriormente ao desmame. Os animais foram observados diariamente para observação da data da abertura vaginal e após a abertura vaginal, o ciclo estral começou a ser acompanhado diariamente na mesma faixa de horário, através da observação do lavado vaginal, para que fosse verificado se as fêmeas adultas utilizadas no projeto apresentavam um ciclo estral regular. As fêmeas avaliadas (n= 22) apresentaram abertura vaginal com aproximadamente 31,8 ± 0,6 dias e primeiro estro com idade média de 36,8 ± 1,1 dias (Figura 4A). O peso corporal dessas fêmeas foi aferido nos respectivos eventos, mostrando que as fêmeas pesavam 13,6 ± 0,3 g no dia da abertura vaginal e, 15,3 ± 0,4 g no dia em que o primeiro estro foi detectado através da observação do lavado vaginal (Figura 4B).

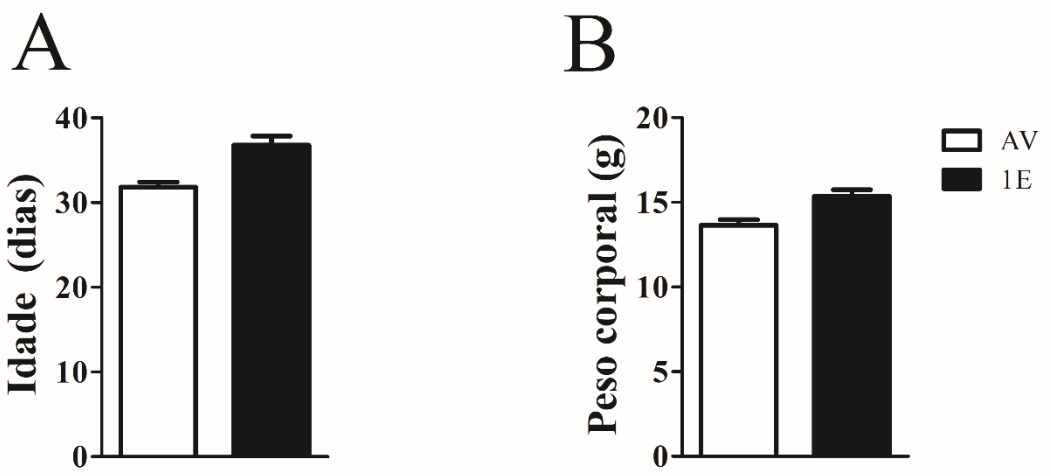

Figura 4: Análise de parâmetros do sistema reprodutivo das fêmeas. Gráficos de barras representando a média da idade **(A)** e do peso corporal **(B)** na qual foi observada a abertura vaginal (AV) e o primeiro estro (1E).

Além disto, o peso uterino, que pode servir como um indicador dos níveis circulantes de estrógenos, foi aferido (Frazao et al. 2013). Observamos que as fêmeas do grupo pré-púbere apresentaram o peso uterino significativamente menor em relação as fêmeas dos grupos púbere e adulta, porém não diferiu quando comparado com os úteros coletados das fêmeas do grupo OVX (Figura 5). De acordo com a literatura (Frazao et al. 2013), as fêmeas do grupo OVX

apresentaram o tamanho uterino significativamente menor em relação aos úteros coletados de fêmeas adultas.

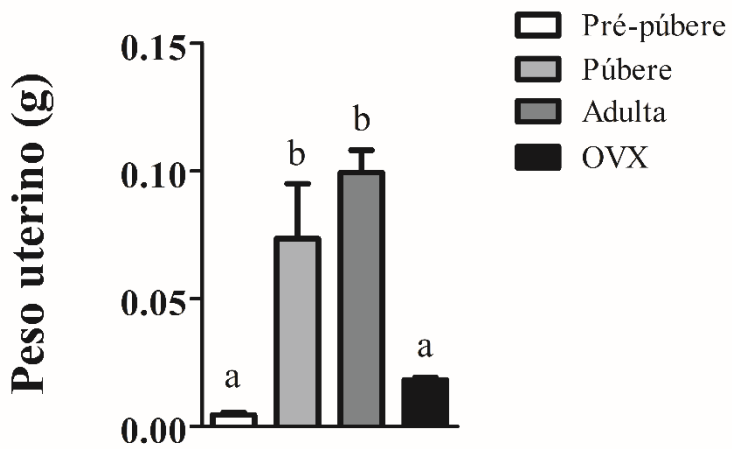

Figura 5: Análise do peso uterino. Gráfico de barra demonstrando o peso uterino nas diferentes condições: fêmeas pré-púberes (n= 9), púberes (n= 5), adultas (n= 10) ou que foram submetidas à ovarectomia (OVX) (n= 11). As barras que não compartilham as mesmas letras apresentam diferenças estatísticas ($P < 0,0001$).

4.2 Controle positivo do método utilizado para análise de área de superfície.

Para confirmar o método utilizado na aferição da área de superfície, utilizamos, como controle positivo, cortes encefálicos do núcleo ARH nível rostral e caudal, onde avaliamos neurônios que expressam o gene *Kiss1* e que expressam, condicionalmente ao gene, a proteína fluorescente verde (hrGFP) de fêmeas adultas, em diferentes condições: diestro, OVX e OVX com reposição de estradiol (OVX+E2) (Figura 6).

Ao avaliarmos a área de superfície de neurônios que expressam o gene *Kiss1* no núcleo ARH nível rostral, notamos que o grupo OVX continha neurônios Kiss1 com maior área de superfície em relação aos grupos diestro e OVX+E2 (Figura 7A). Ao analisarmos a área de superfície de neurônios Kiss1 no núcleo ARH caudal, observamos que, além dos neurônios apresentarem maior área de superfície em relação aos demais grupos, os neurônios avaliados no grupo OVX+E2 eram significativamente menores em relação aos dados obtidos no grupo diestro (Figura 7B), de acordo com dados publicados previamente (Frazao et al. 2013).

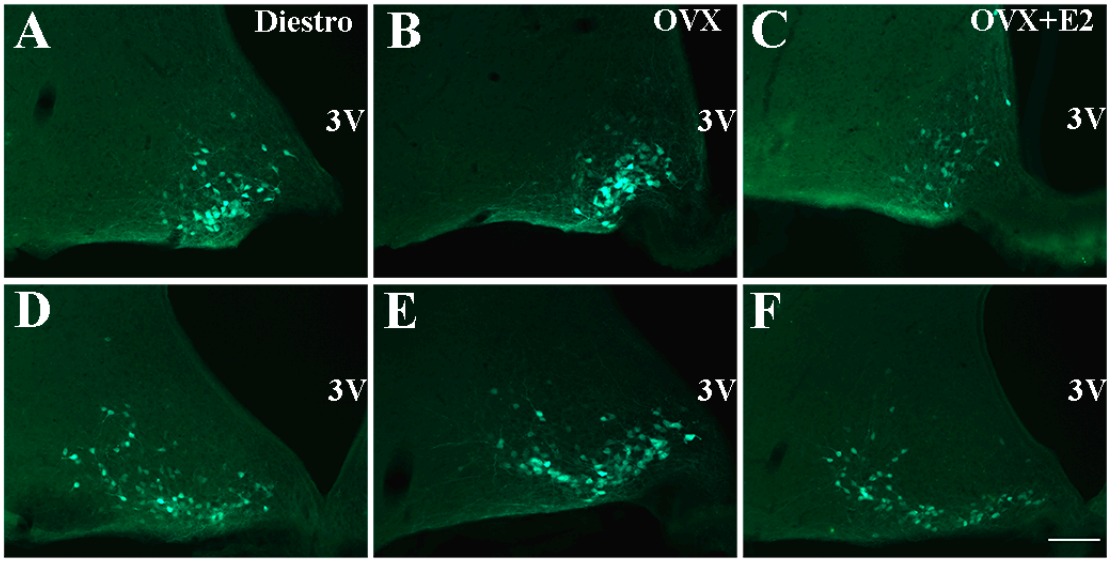

Figura 6: Avaliação de neurônios que expressam o gene *Kiss1* nos núcleos arqueado rostral e caudal. Fotomicrografias em fluorescência demonstrando um corte coronal do encéfalo de camundongo contendo os núcleos arqueado (ARH) rostral **(A, B, C)** e arqueado caudal **(D, E, F)** de fêmeas adultas (60 a 90 dias) em diferentes condições. **(A, D):** Diestro (n= 3), **(B, E):** submetidas à ovarectomia (OVX) (n= 3), **(C, F):** submetidas à ovarectomia com reposição de estradiol (OVX+E2) (n= 3). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo. Escala =100 µm.

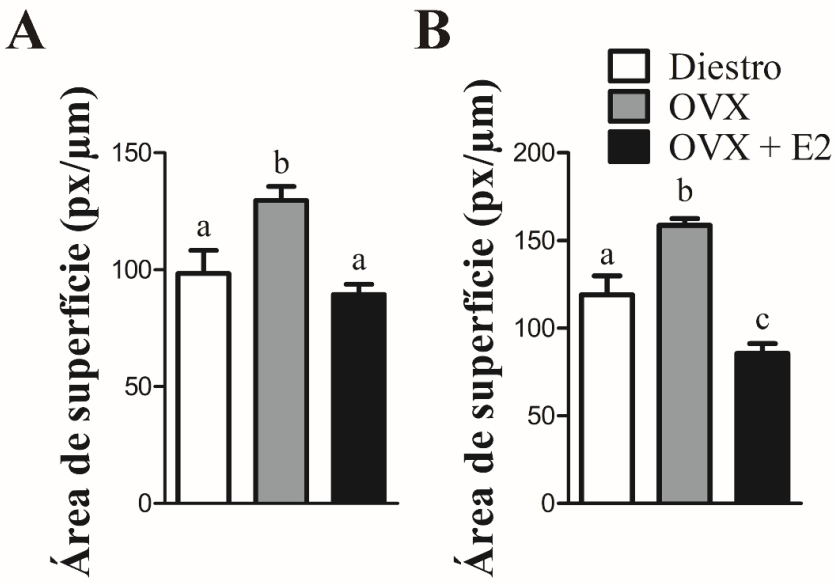

Figura 7: Área de superfície de neurônios que expressam o gene *Kiss1* no núcleo arqueado nível rostral e caudal. (A, B) Gráficos de barras demonstrando a área de superfície de neurônios que expressam o gene *Kiss1* no núcleo arqueado (ARH) rostral **(A)** e caudal **(B)** em diferentes condições: Diestro (n= 3), fêmeas submetidas à ovarectomia (OVX) (n= 3), ou submetidas à ovarectomia com reposição de estradiol (OVX+E2) (n= 3). Média ± EP, as barras que não compartilham as mesmas letras apresentam diferenças estatísticas sendo que: para **(A)** ARH rostral (P< 0,02) e para **(B)** ARH caudal (P< 0,001).

4.3 Quantificação e medida da área de superfície dos neurônios LepR na área pré-óptica medial

Os cortes encefálicos obtidos das fêmeas LepR em diferentes idades: pré-púbere, púbere, adultas e OVX foram submetidos a análise, conforme mencionado no tópico 3.6. Ao avaliarmos o número de neurônios na região MPO (Figura 8A), observamos que tanto o número de neurônios (Fig 8B), como a área de superfície aferida neste núcleo (Fig 8C), nos grupos pré-púbere, púbere, adulta e OVX foram semelhantes.

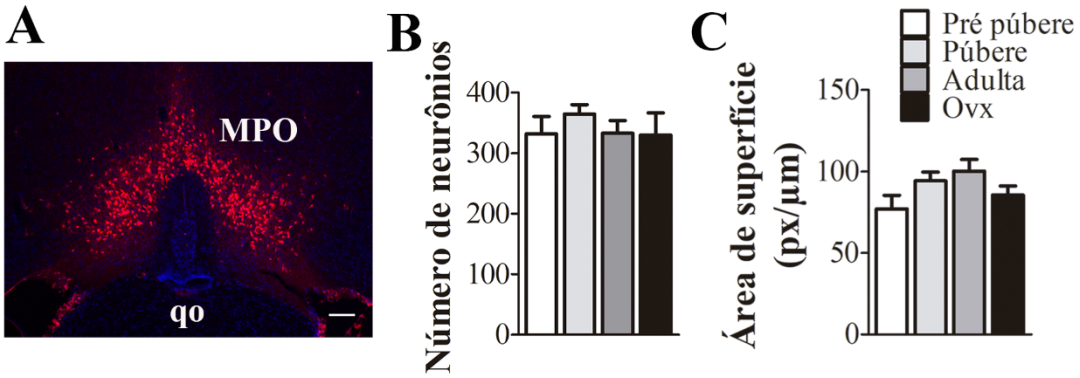

Figura 8: Avaliação de neurônios que expressam o receptor de leptina na área pré-óptica medial. (A) Fotomicrografia em fluorescência demonstrando um corte coronal do encéfalo de camundongo contendo a área médial pré-óptica (MPO) de fêmea adulta. **(B)** Gráfico de barras demonstrando o número de neurônios que expressam o receptor de leptina (LepR) na MPO de fêmeas em diferentes fases da maturação sexual: pré-púberes (n= 9), púberes (n= 5), adultas (n= 10) ou que foram submetidas à ovarectomia (OVX) (n= 11). **(C)** Gráfico de barras demonstrando área de superfície de neurônios que expressam o LepR na MPO em diferentes fases da maturação sexual e em fêmeas submetidas à OVX. Média ± EP (P > 0,05). Abreviaturas: qo, quiasma óptico. Escala =100 µm.

4.4 Quantificação e medida da área de superfície dos neurônios LepR no núcleo arqueado.

Ao avaliarmos a porção rostral do ARH (figura 9A) observamos que o número de neurônios do grupo pré-púbere era significativamente menor quando comparado com os dados obtidos nos grupos púbere, adultas e OVX (Figura 9B). Entretanto, na porção caudal do ARH (Figura 9D), notamos que a contagem do número de neurônios foi semelhante entre os animais dos grupos púbere e adulta, sendo diferente dos demais grupos experimentais. Sugerindo que ocorre um aumento progressivo no número de neurônios com a idade (Figura 9E). Entretanto, na análise da área de superfície dos neurônios que expressam o LepR nos níveis rostral e caudais do ARH (Figuras 9C e 9F), não observamos diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais.

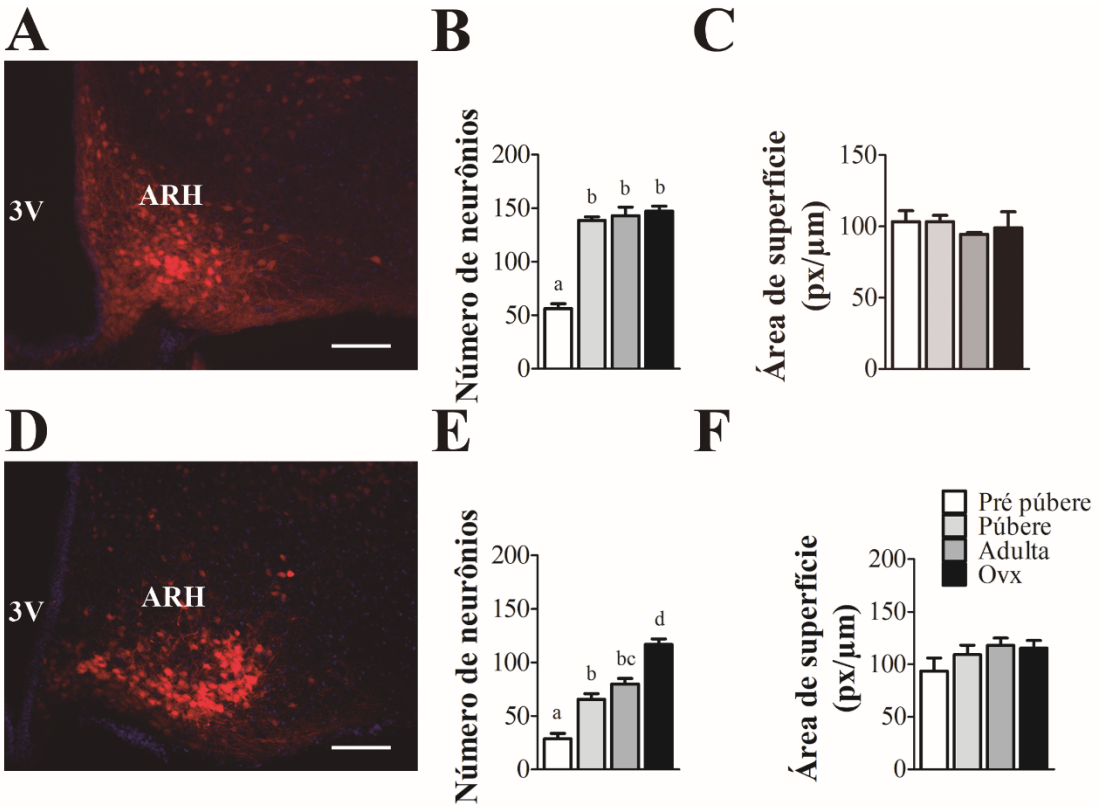

Figura 9: Avaliação de neurônios que expressam o receptor de leptina no núcleo arqueado. Fotomicrografia em fluorescência demonstrando corte coronal do encéfalo de camundongo contendo núcleo arqueado (ARH) rostral e caudal de fêmea adulta. **(A, D)** Gráfico de barras demonstrando o número de neurônios que expressam o receptor de leptina (LepR) no ARH rostral e caudal de fêmeas em diferentes fases da maturação sexual: pré-púberes (n= 10), púberes (n= 5), adultas (n= 9) ou que foram submetidas à ovarectomia (OVX) (n= 11). **(B, E)** Gráfico de barras demonstrando a área de superfície de neurônios que expressam o LepR no ARH rostral e caudal em diferentes fases da maturação sexual e em fêmeas submetidas à OVX **(C, F)**. Média ± EP, as barras que não compartilham as mesmas letras apresentam diferenças estatísticas (P < 0,05). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo. Escala =100 µm.

4.5 Quantificação e medida da área de superfície dos neurônios LepR no núcleo pré-mamilar ventral.

Na análise do núcleo PMv (Figura 10) observamos que não houve diferença significativa no número de neurônios que expressam o LepR entre os grupos analisados (Figura 10B). Além disso, ao realizarmos a aferição da área de superfície de neurônios LepR, neste núcleo, não observamos diferenças significativas entre os grupos avaliados (Figura 10C).

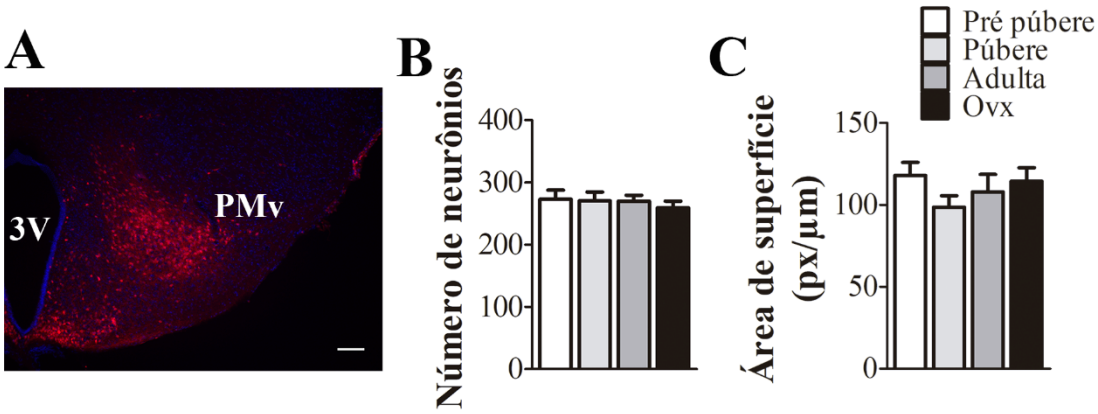

Figura 10: Avaliação de neurônios que expressam o receptor de leptina no núcleo pré-mamilar ventral. (A) Fotomicrografia em fluorescência demonstrando um corte coronal do encéfalo de camundongo contendo o núcleo pré-mamilar ventral (PMv) de fêmea adulta. **(B)** Gráfico de barra demonstrando o número de neurônios que expressam o receptor de leptina (LepR) no PMv de fêmeas em diferentes fases da maturação sexual: pré-púberes (n= 9), púberes (n= 5), adultas (n= 10) ou que foram submetidas à ovarectomia (OVX) (n= 11). **(C)** Gráfico de barras demonstrando a área de superfície de neurônios que expressam o LepR no PMv em diferentes fases da maturação sexual e em fêmeas submetidas à OVX. Média ± EP, as barras que não compartilham as mesmas letras apresentam diferenças estatísticas ($P < 0,05$). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo. Escala =100 µm.

4.6 Percentual de neurônios responsivos à LepR.

Para que pudéssemos calcular o percentual de células responsivas à leptina, realizamos a técnica de imunoistoquímica de fluorescência para detecção de pSTAT3 em uma série representativa dos cortes encefálicos de cada grupo experimental (pré-púbere, adulta e OVX). Para que pudéssemos contabilizar somente neurônios responsivos à leptina em cada núcleo analisado, após o jejum, cada grupo experimental foi subdivido em um grupo controle, que recebeu injeção de PBS Dubeco, e em um grupo leptina, que, que recebeu injeção de leptina. Nos núcleos analisados, neurônios LepR do grupo controle não foram duplamente marcados (Figura 11A e 11C), enquanto que no grupo leptina, podemos ver que ocorreu dupla marcação em neurônios responsivos à leptina (Figura 11B e 11D).

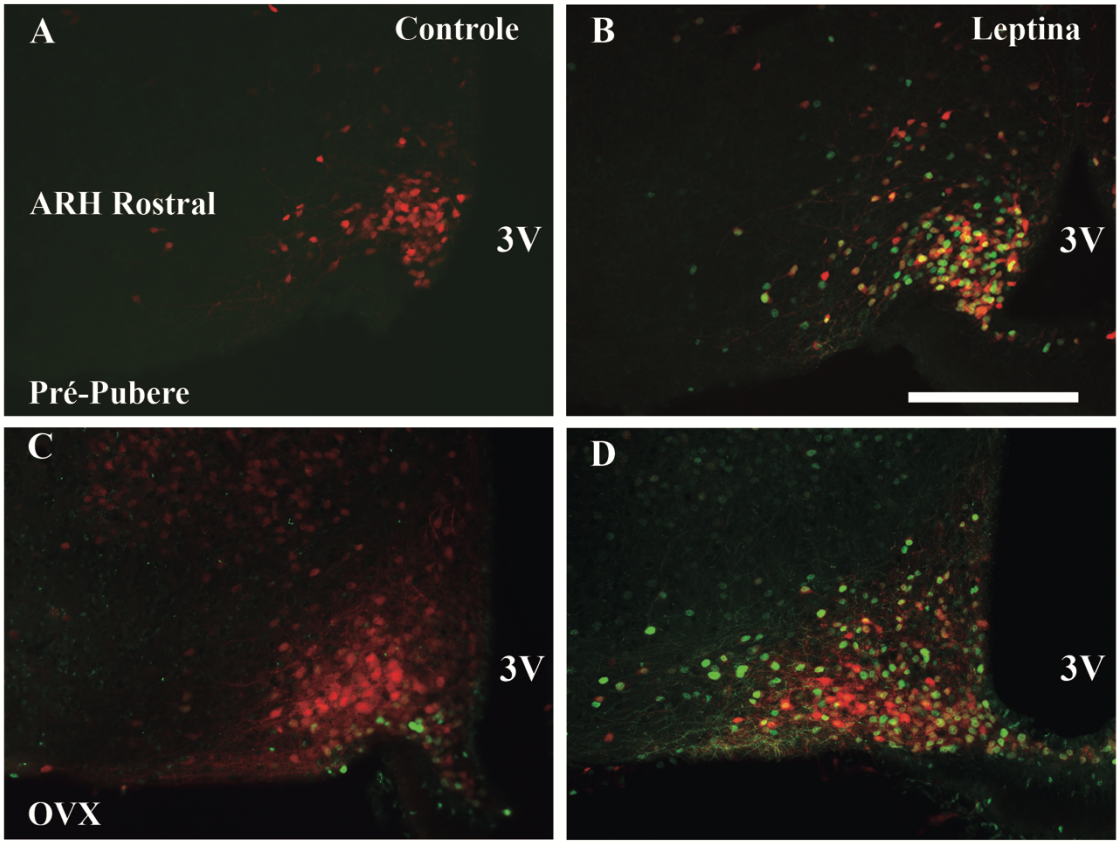

Figura 11: Imunoistoquímica de fluorescência para marcação do estado fosforilado de neurônios LepR no núcleo arqueado. Fotomicrografias em fluorescência demonstrando um corte coronal do encéfalo de camundongo contendo o núcleo arqueado (ARH) rostral de fêmeas pré-púberes **(A, B)** e OVX **(C, D)**. Os animais foram submetidos à injeção de PBS Dubeco no grupo controle **(A, C)** ou à injeção de leptina **(B, D)**. Neurônios que expressam o receptor de leptina (LepR) foram identificados pela sua proteína fluorescente endógena, tdTomato (vermelha); neurônios que tiveram seu receptor ativado foram identificados pela imunorreatividade ao pSTAT3 (verde), e os neurônios duplamente marcados, tanto LepR quanto pSTAT3, apresentam coloração amarela na sobreposição das imagens. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo. Escala =100 µm.

Ao analisarmos o percentual de neurônios LepR responsivos à leptina observamos que na MPO um percentual similar de células que expressam o LepR é responsivo à leptina nos grupos pré-púbere e adulta e nos grupos adulta e OVX, entretanto, notamos uma diminuição significativa no percentual de neurônios responsivos à leptina no grupo OVX em comparação ao grupo pré-púbere (Tabela 1).

Na análise do percentual de células responsivas no núcleo ARH observamos que houve um aumento no percentual de neurônios responsivos à leptina quando comparamos o grupo pré-púbere ao grupo adulta, sendo os dados obtido no grupo OVX semelhantes aos grupos pré-púbere e adulta no nível rostral do ARH. No nível caudal do ARH, embora não tenhamos notado diferenças significativas no percentual de neurônios responsivos à leptina entre os

grupos, podemos observar que houve uma tendência ao aumento do número desses neurônios ($P = 0.08$) (Tabela 1).

Na análise do núcleo PMv, verificamos um aumento não significativo no percentual de células responsivas à leptina quando comparamos o grupo pré-púbere aos grupos adulta e OVX. Contudo, houve diferenças estatísticas quando analisamos o número de neurônios que foram duplamente marcados quando comparamos os grupos pré-púbere e adulta, porém o grupo OVX apresentou semelhança estatística com os grupos pré-púbere e adulta (Tabela 1).

MPO	*Pré-púbere* n=3	*Adulta* n=3	*OVX* n=3	*P*
LepR	334,3 ± 16,4[a]	295,3 ± 48,8[a]	251,0 ± 77,7[a]	0,6
Dupla marcação	165,7 ± 14,8[a]	122,0 ± 5,0[ab]	56,3 ± 13,8[b]	0,05
%	49.6 ± 4,0[a]	43.5 ± 6,6[ab]	24.2 ± 3,09[bc]	0,02

ARH rostral	*Pré-púbere* n=3	*Adulta* n=3	*OVX* n=3	*P*
LepR	55,3 ± 14,6[a]	143,0 ±13,8[b]	142,7 ± 6,7[bc]	0,003
Dupla marcação	25,7 ± 10,4[a]	94,3 ± 8,6[b]	88,3 ± 3,7[bc]	0,002
%	41,7 ± 8,8[a]	66,1 ± 2,4 [b]	61,9 ± 1,4[ab]	0,03

ARH caudal	*Pré-púbere* n=2	*Adulta* n=3	*OVX* n=3	*P*
LepR	19,0 ± 13,0 [a]	82,3 ± 8,7 [b]	114,0 ± 7,0[bc]	0,002
Dupla marcação	8,0 ± 6,0 [a]	48,7 ± 12,0[ab]	63,7 ± 7,4[bc]	0,03
%	38,5 ± 5,2 [a]	57,2 ± 9,5[a]	55,5 ± 3,0 [a]	0,25

PMv	*Pré-púbere* n=2	*Adulta* n=3	*OVX* n=3	*P*
LepR	306,5 ± 50,5[a]	256,3 ±15,03[a]	236,7 ± 32,4[a]	0,4
Dupla marcação	114,5 ± 0,5 [a]	154,3 ± 5,2 [b]	138,0 ± 10,0[ab]	0,04
%	38,5 ± 6,1[a]	60,4 ± 1,7[a]	60,5 ± 8,8[a]	0,12

Tabela 1. Percentual de neurônios responsivos à leptina na área medial pré-óptica, núcleo arqueado e núcleo pré-mamilar ventral. Média ± EP, letras diferentes representam diferenças estatísticas. Abreviaturas: MPO, área pré-óptica medial; ARH, núcleo arqueado do hipotálamo; PMv, núcleo pré-mamilar ventral; LepR, receptor de leptina; %, percentual de neurônios responsivos à leptina

5 DISCUSSÃO

Nosso trabalho averiguou se neurônios LepR presentes em núcleos hipotalâmicos, diretamente relacionados com eventos reprodutivos, sofrem alterações morfológicas mediante diferentes condições hormonais, uma vez que essas mudanças podem indicar possíveis variações na atividade neuronal. Para que as fêmeas fossem incluídas no presente projeto, analisamos parâmetros de maturação sexual já descritos por nosso grupo de pesquisa; os animais que não estavam dentro da média de idade correspondente aos eventos não foram inclusos neste projeto (T. M. Bohlen et al. 2016; Tabata Mariz Bohlen et al. 2018; Silveira et al. 2017). Além disso, a metodologia empregada para a análise das alterações morfológicas, quando analisamos neurônios Kiss1, corroborou com resultados descritos na literatura (Frazao et al. 2013; Rometo et al. 2007), mostrando que a escolha da técnica utilizada foi eficaz para avaliar os parâmetros propostos por este projeto.

Dentre núcleos analisados, não observamos alteração no número de neurônios nos núcleos MPO e PMv. Entretanto, nossas análises mostraram que no núcleo ARH, especificamente, tanto no nível rostral quanto no nível caudal, ocorre um aumento no número de neurônios LepR concomitante ao avanço da idade. Não podemos descartar a possibilidade de que esse resultado seja resultante da metodologia empregada, embora seja rotineiramente utilizada por nosso grupo de pesquisa (T. M. Bohlen et al. 2016; Tabata Mariz Bohlen et al. 2018; Cravo et al. 2013; Frazao et al. 2013; Lima et al. 2018; Silveira et al. 2017). Apesar de quantificarmos neurônios LepR localizados na superfície do corte e em um plano de duas dimensões, consideramos somente os neurônios que tiveram sua membrana nitidamente delimitada, desconsiderando possíveis distorções ou deformações que pudessem estar presentes na imagem contendo o núcleo analisado.

Estrógeno e leptina interagem assumindo um papel fundamental não só no controle metabólico (regulando adiposidade, gasto energético e termogênese), provocando um efeito anorexígeno, mas também no controle do eixo reprodutivo (Heine et al. 2000; Naaz et al. 2002). Corroborando esse fato, estudos mostraram que em regiões do hipotálamo ligadas tanto a homeostase energética quanto ao controle da reprodução, dentre elas os núcleos MPO, ARH e PMv, a maioria das células LepR também são imunorreativas a anticorpos que reconhecem receptores de estrógeno alfa e beta (ERα e ERβ) (Clegg et al. 2006; Del Bianco-Borges et al. 2010; Diano et al. 1998; Simerly et al. 1990). Tendo em vista essa relação entre estrógeno e leptina, Bless e colaboradores demonstraram que ocorre a formação de novos neurônios que coexpressam ERα e LepR no núcleo ARH de fêmeas adultas dependentes do nível de estradiol e alimentação hipercalórica (Bless et al. 2016). Sabe-se que o desenvolvimento do hipotálamo

depende da exposição a um ambiente intrauterino, onde células são geradas, assim como exposição a um ambiente extrauterino, onde conexões neurais são estabelecidas (Bouret et al. 2004). A capacidade do hipotálamo de gerar novos neurônios não se restringe somente a vida intrauterina, sendo possível que ocorra neurogênese durante a vida adulta (Kokoeva et al. 2007). Diferente do que foi mostrado no trabalho de Bless e colaboradores (2016), as fêmeas utilizadas no presente estudo não passaram por uma dieta hipercalórica, porém, foram analisadas em diferentes estágios de maturação sexual, ou seja, fêmeas em diferentes condições hormonais, pois, como vimos no nosso trabalho, houve variação no peso uterino nos diferentes grupos, fato que pode ser um indicativo dos níveis séricos de estradiol, ou associado ao crescimento do animal (Frazao et al. 2013). Analisando os momentos onde possíveis variações hormonais estão acontecendo, principalmente, da fase pré-púbere à fase adulta, poderíamos sugerir que o aumento no número de neurônios LepR, presentes no núcleo ARH, concomitante com o aumento da idade, pode ser resultado de um processo de neurogênese influenciado pela presença de estrógenos circulantes, hipótese que precisará ser confirmada.

Uma outra hipótese que poderia ser levantada, a partir dos resultados mostrados no nosso trabalho, é se esse aumento no número de neurônios observado no ARH ocorre por uma posterior expressão de LepR, ou seja, se neurônios que tem potencial para expressar RNAm para esse receptor já estão presentes no núcleo ARH e passam a ser expressos após um determinado estímulo, como por exemplo o aumento na massa de gordura corporal. Estudos em camundongos e ratos mostram que, no início do período pré-púbere há um aumento nos níveis de leptina circulante e aumento da expressão de RNAm de LepR, no núcleo ARH, que é independente da massa de gordura corporal e que, apesar dos níveis aumentados de leptina sérica, os animais apresentam uma elevada ingestão alimentar (Ahima et al. 1998; Devaskar et al. 1997; Morash et al. 2003). Isso sugere que nesse período inicial de vida, o efeito anorexígeno da leptina é ausente (Cottrell et al. 2009; Proulx et al. 2002). Diferente da sua função em adultos, onde a leptina participa, dentre outras atividades, do controle da homeostase energética, em neonatos a leptina atua na proliferação, manutenção, além da diferenciação de neurônios e células gliais (Udagawa et al. 2007). O presente estudo mostra que, no núcleo ARH, o número de neurônios aumenta a partir da fase púbere. Por não exercer controle no metabolismo energético durante esse estágio inicial da vida, é possível que neurônios que tem potencial para expressar LepR não o expressem por um determinado período até que a leptina comece a exercer funções metabólicas e neuroendócrinas para que o estímulo seja reconhecido e o LepR passe então a ser expresso nesses neurônios. Um estudo realizado em camundongos machos, revelou que o pico de neurogênese, no núcleo ARH, acontece entre os dias 12 e 14 de vida

intrauterina (cerca de 60-70% dos neurônios LepR) e entre os dias 16 e 18 do mesmo período (40-20%, respectivamente). Esse estudo aponta que somente 1-10% dos neurônios responsivos à leptina são fruto de neurogênese na fase adulta (Ishii and Bouret 2012). A partir dessas informações, seria interessante investigar se o aumento no número de neurônios pode ser explicado por uma possível neurogênese ou se esses neurônios LepR já se encontram presentes no núcleo ARH até que um determinado estímulo seja percebido para que seu receptor passe a ser expresso. Também seria interessante investigar o número de neurônios LepR em janelas temporais menores, ou seja, investigar o número de neurônios LepR em animais que estão na faixa de idade entre os grupos pré-púbere e púbere, de forma a confirmar se esse aumento no número de neurônios acontece uma vez que a puberdade é iniciada ou se ocorre um aumento progressivo no número de células com o avanço da idade.

Quanto à área de superfície de neurônios LepR, nossos resultados indicaram que somente algumas populações neuronais específicas no ARH são passíveis de sofrer alteração morfológica mediante variação nos níveis de hormonais, visto que não foram observados efeitos semelhantes em neurônios LepR no ARH e demais áreas analisadas em comparação aos dados obtidos em neurônios Kiss1 (Frazao et al. 2013; Rometo et al. 2007). Além disso, uma outra causa pode ser o fato de termos diferentes populações neuronais do ponto de vista neuroquímico (inclusive no ARH) que expressam o LepR, o que pode dificultar que essas alterações sejam percebidas. Isso pode ser justificado, também, pelo fato da sinalização do estrógeno não agir diretamente na via de sinalização de pSTAT3, uma vez que a ativação de neurônios que expressam ambos os receptores ocorrem de forma independente (Kim et al. 2016).

Embora a área MPO e o núcleo PMv sejam extremamente relevantes para que ocorra o início da maturação sexual, não notamos, nesses núcleos, diferenças estatísticas quanto ao número de neurônios ou quanto à área de superfície de neurônios LepR. Entretanto, esses resultados não excluem a possibilidade de que outras alterações possam ocorrer. Seria interessante avaliar se esses neurônios sofrem alteração do ponto de vista biofísico (dado que está sendo investigado pelo nosso grupo de pesquisa), além de modificações quanto a conexões neurais ou arborização dendrítica.

Além de quantificar o número de neurônios e aferir a área de superfície de neurônios LepR, realizamos a técnica de imunoistoquímica de fluorescência para o estado fosforilado de STAT3 para avaliar o percentual de neurônios LepR responsivos à leptina. Observamos que o percentual de neurônios que expressam pSTAT3 após estímulo da leptina variou entre os grupos em cada núcleo analisado. Ao analisar a densidade relativa de pSTAT3 de neurônios LepR responsivos a leptina, o percentual de neurônios responsivos foi significativamente maior em

animais pré-púberes na MPO. Um estudo em 2010, analisou diferentes regiões hipotalâmicas e mostrou que a expressão de pSTAT3 em pré-púberes é relativamente maior quando comparada com animais adultos nessa área (Caron et al. 2010). Nossos resultados diferem dos dados apresentados nesse estudo, uma vez que não vimos diferença estatística entre os grupos pré-púbere e o grupo adulta. Nossos dados da área MPO, mostraram uma diminuição somente quando comparamos os grupos pré-púbere e OVX. Todavia, essa diferença nos resultados pode ser devido a escolha do método utilizado para análise; Caron e colaboradores avaliaram a densidade relativa de expressão de pSTAT3, enquanto que o nosso estudo mostra uma quantificação manual de neurônios duplamente marcados. Uma hipótese que poderia justificar a diminuição do percentual de neurônios responsivos à leptina que vimos ao analisarmos os grupos pré-púbere e OVX na área MPO, poderia explicado pelo fato de que a população de neurônios imunorreativos ao ERα, nessa área, diminuem com o avanço da idade (Yaghmaie et al. 2005). Visto que nesse núcleo a maioria dos neurônios que expressam ERα colocalizam com LepR (cerca de 80%) (Del Bianco-Borges et al. 2010; Kim et al. 2016), é possível que a diminuição de neurônios LepR seja influenciada pela diminuição de neurônios que expressam ERα. No núcleo PMv, não observamos diferença estatística entre os grupos e sim, uma tendência ao aumento no número de células responsivas à leptina, fato que pode ser justificado pelo N experimental. Porém assim como no ARH a responsividade à leptina parece aumentar após a puberdade. Entretanto é necessário ressaltar que em nosso modelo, a proteína fluorescente *td*Tomato está condicionada a expressão do gene que codifica o LepR. A sequência que transcreve o *td*Tomato é genomicamente ativada de forma permanente se o neurônio, em algum momento, expressar o LepR. Se por algum motivo a célula não expressar o LepR posteriormente a proteína permanecerá expressa. Associados ao estudo das propriedades biofísicas de neurônios LepR os resultados apresentados contribuirão com o conhecimento sobre possíveis alterações ocorrem com neurônios LepR ao longo do desenvolvimento.

6 CONCLUSÃO

Os neurônios que expressam o LepR nas áreas MPO e PMv não sofrem alterações morfológicas ao longo do desenvolvimento, entretanto a responsividade à leptina parece ser influenciada pelos níveis circulantes de estrógenos nesses núcleos hipotalâmicos. Por outro lado, no ARH o avanço da idade é acompanhado pelo aumento do número de neurônios, porém, não foram detectadas diferenças na responsividade à leptina no que se refere aos níveis circulantes de estrógenos. Sugerimos, portanto, que a interação entre estrógenos e leptina pode atuar modulando diferentes regiões hipotalâmicas de forma diferenciada.

7 REFERÊNCIAS

Abel, Ty William and Rance, Naomi Ellen (2000), 'Stereologic study of the hypothalamic infundibular nucleus in young and older women', *The Journal of Comparative Neurology,* 424 (4), 679-88.

Ahima, R. S., Prabakaran, D., and Flier, J. S. (1998), 'Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function', *The Journal of Clinical Investigation,* 101 (5), 1020-27.

Ahima, R. S., et al. (1997), 'Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice', *J Clin Invest,* 99 (3), 391-5.

Barash, I. A., et al. (1996), 'Leptin is a metabolic signal to the reproductive system', *Endocrinology,* 137 (7), 3144-47.

Bellefontaine, N., et al. (2014), 'Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction (vol 124, pg 2550, 2014)', *Journal of Clinical Investigation,* 124 (8), 3678-78.

Bjørbæk, Christian, et al. (2000), 'SOCS3 Mediates Feedback Inhibition of the Leptin Receptor via Tyr985', *Journal of Biological Chemistry,* 275 (51), 40649-57.

Bless, Elizabeth P., et al. (2016), 'Adult Neurogenesis in the Female Mouse Hypothalamus: Estradiol and High-Fat Diet Alter the Generation of Newborn Neurons Expressing Estrogen Receptor α', *eNeuro,* 3 (4), ENEURO.0027-16.2016.

Bohlen, T. M., et al. (2016), 'Fatness rather than leptin sensitivity determines the timing of puberty in female mice', *Molecular and Cellular Endocrinology,* 423 (C), 11-21.

Bohlen, Tabata Mariz, et al. (2018), 'A Short-Day Photoperiod Delays the Timing of Puberty in Female Mice via Changes in the Kisspeptin System', *Frontiers in Endocrinology,* 9, 44.

Bouret, Sebastien G., Draper, Shin J., and Simerly, Richard B. (2004), 'Formation of Projection Pathways from the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus to Hypothalamic Regions Implicated in the Neural Control of Feeding Behavior in Mice', *The Journal of Neuroscience,* 24 (11), 2797-805.

Canteras, N. S., Simerly, R. B., and Swanson, L. W. (1992), 'Projections of the Ventral Premammillary Nucleus', *Journal of Comparative Neurology,* 324 (2), 195-212.

Caron, E., et al. (2010), 'Distribution of Leptin-Sensitive Cells in the Postnatal and Adult Mouse Brain', *Journal of Comparative Neurology,* 518 (4), 459-76.

Cavalcante, J. C., Bittencourt, J. C., and Elias, C. F. (2014), 'Distribution of the neuronal inputs to the ventral premammillary nucleus of male and female rats', *Brain Research,* 1582, 77-90.

Chan, J. L., et al. (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 (9), 1409-21.

Christian, Catherine A., Mobley, Jessica L., and Moenter, Suzanne M. (2005), 'Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 102 (43), 15682-87.

Clegg, Deborah J., et al. (2006), 'Gonadal Hormones Determine Sensitivity to Central Leptin and Insulin', *Diabetes,* 55 (4), 978.

Coleman, D. L. (1973), 'Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice', *Diabetologia,* 9 (4), 294-98.

--- (2010), 'A historical perspective on leptin', *Nature Medicine,* 16, 1097-99.

Cottrell, E. C., et al. (2009), 'Developmental changes in hypothalamic leptin receptor: relationship with the postnatal leptin surge and energy balance neuropeptides in the postnatal rat', *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology,* 296, R631-R39.

Cravo, R. M., et al. (2013), 'Leptin Signaling in Kiss1 Neurons Arises after Pubertal Development', *Plos One,* 8 (3).

--- (2011), 'CHARACTERIZATION OF Kiss1 NEURONS USING TRANSGENIC MOUSE MODELS', *Neuroscience,* 173, 37-56.

de Roux, N., et al. (2003), 'Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 100 (19), 10972-76.

de Tassigny, X. D. and Colledge, W. H. (2010), 'The Role of Kisspeptin Signaling in Reproduction', *Physiology,* 25 (4), 207-17.

Del Bianco-Borges, B., Cabral, F. J., and Franci, C. R. (2010), 'Co-Expression of Leptin and Oestrogen Receptors in the Preoptic-Hypothalamic Area', *Journal of Neuroendocrinology,* 22 (9), 996-1003.

Devaskar, Sherin U., et al. (1997), 'Developmental Changes inobGene Expression and Circulating Leptin Peptide Concentrations', *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 238 (1), 44-47.

Diano, Sabrina, et al. (1998), 'Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus', *Brain Research,* 812 (1), 256-59.

Donato, J., et al. (2010), 'Leptin Induces Phosphorylation of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Defined Hypothalamic Neurons', *Endocrinology,* 151 (11), 5415-27.

--- (2009), 'The Ventral Premammillary Nucleus Links Fasting-Induced Changes in Leptin Levels and Coordinated Luteinizing Hormone Secretion', *Journal of Neuroscience,* 29 (16), 5240-50.

--- (2011a), '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 (1), 355-68.

Donato, J., Jr., et al. (2011b), 'Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction', *Neuroendocrinology,* 93, 9-18.

Elias, C. F. (2012), 'Leptin action in pubertal development: recent advances and unanswered questions', *Trends in Endocrinology and Metabolism,* 23 (1), 9-15.

Farooqi, I. S. and O'Rahilly, S. (2009), 'Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis', *American Journal of Clinical Nutrition,* 89 (3), 980s-84s.

Farooqi, I. S., et al. (1999), 'Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency', *N Engl J Med,* 341, 879-84.

Frazao, R., et al. (2014), 'Estradiol modulates Kiss1 neuronal response to ghrelin', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism,* 306, E606-E14.

--- (2013), 'Shift in Kiss1 Cell Activity Requires Estrogen Receptor alpha', *Journal of Neuroscience,* 33, 2807-20.

Funes, S., et al. (2003), 'The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system', *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 312 (4), 1357-63.

Glanowska, K. M. and Moenter, S. M. (2015), 'Differential Regulation of GnRH Secretion in the Preoptic Area (POA) and the Median Eminence (ME) in Male Mice', *Endocrinology,* 156 (1), 231-41.

Gottsch, M. L., et al. (2004), 'A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse', *Endocrinology,* 145 (9), 4073-77.

Grumbach, M. M. (2002), 'The neuroendocrinology of human puberty revisited', *Hormone Research,* 57, 2-14.

Han, S. K., et al. (2005), 'Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty', *Journal of Neuroscience,* 25 (49), 11349-56.

Heine, P. A., et al. (2000), 'Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-α knockout mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 97 (23), 12729.

Ishii, Y. and Bouret, S. G. (2012), 'Embryonic Birthdate of Hypothalamic Leptin-Activated Neurons in Mice', *Endocrinology,* 153, 3657-67.

Johnson, L. M. and Sidman, R. L. (1979), 'A reproductive endocrine profile in the diabetes (db) mutant mouse', *Biol Reprod,* 20 (3), 552-9.

Kiess, W., et al. (1999), 'A role for leptin in sexual maturation and puberty?', *Hormone Research,* 51, 55-63.

Kim, Joon S., et al. (2016), 'Leptin Signaling Is Not Required for Anorexigenic Estradiol Effects in Female Mice', *Endocrinology,* 157 (5), 1991-2001.

Kokoeva, Maia V., Yin, Huali, and Flier, Jeffrey S. (2007), 'Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus', *Journal of Comparative Neurology,* 505 (2), 209-20.

Leshan, R. L., et al. (2009), 'Direct Innervation of GnRH Neurons by Metabolic- and Sexual Odorant-Sensing Leptin Receptor Neurons in the Hypothalamic Ventral Premammillary Nucleus', *Journal of Neuroscience,* 29 (10), 3138-47.

Licinio, J., et al. (2004), 'Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 101 (13), 4531-36.

Lima, Leandro Bueno, et al. (2018), 'Conspecific odor exposure predominantly activates non-kisspeptin cells in the medial nucleus of the amygdala', *Neuroscience Letters,* 681, 12-16.

Louis, G. W., et al. (2011), 'Molecular Mapping of the Neural Pathways Linking Leptin to the Neuroendocrine Reproductive Axis', *Endocrinology,* 152 (6), 2302-10.

McCarthy, M. M., et al. (2008), 'Mechanisms mediating oestradiol modulation of the developing brain', *Journal of Neuroendocrinology,* 20 (6), 777-83.

Messager, S., et al. (2005), 'Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 102 (5), 1761-66.

Michalakis, K., et al. (2013), 'The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review', *Metabolism-Clinical and Experimental,* 62 (4), 457-78.

Montague, C. T., et al. (1997), 'Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans', *Nature,* 387 (6636), 903-08.

Morash, Barbara A., et al. (2003), 'Leptin receptors are developmentally regulated in rat pituitary and hypothalamus', *Molecular and Cellular Endocrinology,* 210 (1), 1-8.

Munzberg, H. and Morrison, C. D. (2015), 'Structure, production and signaling of leptin', *Metabolism-Clinical and Experimental,* 64, 13-23.

Myers, Martin G., Cowley, Michael A., and Münzberg, Heike (2008), 'Mechanisms of Leptin Action and Leptin Resistance', *Annual Review of Physiology,* 70 (1), 537-56.

Naaz, Afia, et al. (2002), *Effect of Ovariectomy on Adipose Tissue of Mice in the Absence of Estrogen Receptor Alpha (ER??): a Potential Role for Estrogen Receptor Beta (ER??)* (34) 758-63.

Ojeda, S. R., et al. (2006), 'Neuroendocrine mechanisms controlling female puberty: new approaches, new concepts', *International Journal of Andrology,* 29 (1), 256-63.

Paradela, Regina (2015), 'Envolvimento dos neurônios Kiss1 na via neural através da qual o sistema circadiano regula o ciclo ovulatório', (Universidade de São Paulo).

Park, H. K. and Ahima, R. S. (2015), 'Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism', *Metabolism-Clinical and Experimental,* 64 (1), 24-34.

Proulx, Karine, Walker, Claire-Dominique, and Richard, Denis (2002), 'Leptin Regulates Appetite-Related Neuropeptides in the Hypothalamus of Developing Rats without Affecting Food Intake', *Endocrinology,* 143 (12), 4683-92.

Putteeraj, M., et al. (2016), 'A "Timed" Kiss is essential for Reproduction: Lessons from Mammalian Studies', *Frontiers in Endocrinology,* 7.

Quennell, J. H., et al. (2009), 'Leptin Indirectly Regulates Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Function', *Endocrinology,* 150 (6), 2805-12.

Rance, N. E. and Young, W. S. (1991), 'Hypertrophy and Increased Gene-Expression of Neurons Containing Neurokinin-B and Substance-P Messenger Ribonucleic-Acids in the Hypothalami of Postmenopausal Women', *Endocrinology,* 128 (5), 2239-47.

Rance, N. E., et al. (1990), 'Postmenopausal Hypertrophy of Neurons Expressing the Estrogen-Receptor Gene in the Human Hypothalamus', *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* 71 (1), 79-85.

Roa, J. and Tena-Sempere, M. (2014), 'Connecting metabolism and reproduction: Roles of central energy sensors and key molecular mediators', *Molecular and Cellular Endocrinology,* 397 (1-2), 4-14.

Rodgers, Erin, et al. (1998), 'A Leptin Dose-Response Study in Obese (ob/ob) and Lean (+/?) Mice', *Endocrinology,* 139 (1), 8-19.

Rometo, A. M., et al. (2007), 'Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys', *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* 92 (7), 2744-50.

Sakmann, B. and Neher, E. (2009), *Single-Channel Recording* (2a edn.: Springer).

Sanchez-Garrido, M. A. and Tena-Sempere, M. (2013), 'Metabolic control of puberty: Roles of leptin and kisspeptins', *Hormones and Behavior,* 64 (2), 187-94.

Saper, C. B. and Lowell, B. B. (2014), 'The hypothalamus', *Current Biology,* 24 (23), R1111-R16.

Schwarz, J. M., et al. (2008), 'Estradiol induces hypothalamic dendritic spines by enhancing glutamate release: A mechanism for organizational sex differences', *Neuron,* 58 (4), 584-98.

Scott, M. M., et al. (2009), 'Leptin Targets in the Mouse Brain', *Journal of Comparative Neurology,* 514 (5), 518-32.

Seminara, S. B., et al. (2003), 'The GPR54 gene as a regulator of puberty', *New England Journal of Medicine,* 349 (17), 1614-U8.

Silveira, M. A., et al. (2017), 'STAT5 signaling in kisspeptin cells regulates the timing of puberty', *Molecular and Cellular Endocrinology,* 448 (C), 55-65.

Simerly, R. B., et al. (1990), 'Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study', *Journal of Comparative Neurology,* 294 (1), 76-95.

Sisk, C. L. and Foster, D. L. (2004), 'The neural basis of puberty and adolescence', *Nature Neuroscience,* 7 (10), 1040-47.

Solorzano, C. M. B. and McCartney, C. R. (2010), 'Obesity and the pubertal transition in girls and boys', *Reproduction,* 140 (3), 399-410.

Styne, D. M. (1994), 'Physiology of Puberty', *Hormone Research,* 41, 3-6.

Udagawa, Jun, et al. (2007), 'Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development', *Congenital Anomalies,* 47 (3), 77-83.

Welt, C. K., et al. (2004), 'Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea', *N Engl J Med,* 351 (10), 987-97.

Wojcik-Gladysz, A., et al. (2009), 'Effect of intracerebroventricular infusion of leptin on the secretory activity of the GnRH/LH axis in fasted prepubertal lambs', *Animal Reproduction Science,* 114 (4), 370-83.

Yaghmaie, Farzin, et al. (2005), *Caloric restriction reduces cell loss and maintains estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the pre-optic hypothalamus of female B6D2F1 mice* (26) 197-203.

Zhang, Y. Y., et al. (1994a), 'Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homolog', *Nature,* 372 (6505), 425-32.

Zhang, Yiying, et al. (1994b), 'Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue', *Nature,* 372 (6505), 425-32.

Zuure, W. A., Quennell, J. H., and Anderson, G. M. (2016), 'Leptin Responsive and GABAergic Projections to the Rostral Preoptic Area in Mice', *Journal of Neuroendocrinology,* 28 (3), 12357.