



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELA CRISTINA GARNICA SIQUEIRA

**PAPEL DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL
SOBRE OS EFEITOS DO PEPTÍDEO INTESTINAL
VASOATIVO NO CONTROLE DA HOMEOSTASE
ENERGÉTICA**



Sociedade Brasileira de Fisiologia
SBFis



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

MARCELA CRISTINA GARNICA SIQUEIRA

PAPEL DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL SOBRE
OS EFEITOS DO PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO NO
CONTROLE DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA

Londrina
2019

MARCELA CRISTINA GARNICA SIQUEIRA

**PAPEL DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL SOBRE
OS EFEITOS DO PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO NO
CONTROLE DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutorado.

Orientadora: Profa. Dra. Cássia Thaís B. V. Zaia

Co-orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa

Londrina
2019

MARCELA CRISTINA GARNICA SIQUEIRA

**PAPEL DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL
SOBRE OS EFEITOS DO PEPTÍDEO INTESTINAL
VASOATIVO NO CONTROLE DA HOMEOSTASE
ENERGÉTICA**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutorado.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cássia Thaïs B. V. Zaia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Maria Fernanda R. Graciano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dr. Rodrigo César Rorato
Universidade de Ribeirão Preto

Londrina, 05 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof^a Dra^a Thaïs Zaia e Prof^o Dr^o Ernane Torres Uchôa, pelo carinho, dedicação e paciência demonstrados todos os dias através da constante presença e orientação em cada fase deste trabalho, exemplos para meu crescimento profissional e pessoal. E seus cônjuges, Prof^o Dr^o Dimas Zaia, e Prof^a Dra^a Cristiane Mota Leite, pela disposição em auxiliar e contribuir para que este trabalho pudesse ser o melhor possível.

À minha família, que nesses quatro anos cresceu e trouxe ainda mais felicidade. Meu esposo, Jeferson, e meu filho, Luca, presentes do céu que trouxeram propósito pra minha vida e tornaram minha caminhada mais leve. Meus pais, Vera e Francisco, por sempre estarem dispostos a atender meus pedidos de ajuda, pela compreensão, carinho e torcida. Ao proporcionarem as melhores condições para meu crescimento permitiram que eu pudesse chegar até aqui. Ao Léo, Jack e Vitor, agradeço pelos conselhos, pela torcida e pelo carinho sempre demonstrado em forma de palavras e gestos.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório durante todo este trajeto, em especial, à Andressa, sempre presente, disposta e animada!!! Obrigada por ser minha mão direita (e esquerda quando eu não podia estar presente), você fez toda a diferença, e merece muito sucesso!! Obrigada pelo comprometimento aos experimentos, pela compreensão nos momentos de estresse e pelas risadas, sempre fundamentais.

Aos laboratórios, técnicos e alunos que nos auxiliaram no uso dos aparelhos essenciais para a conclusão deste trabalho.

Aos docentes, discentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, no auxílio e compreensão durante todo tempo de convivência.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado.

A tantas outras pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, com a minha formação e na concretização deste trabalho.

“Se quer ir rápido, vá sozinho. Se quer ir longe, vá acompanhado”.

Provérbio Africano

GARNICA-SIQUEIRA, Marcela Cristina. **Papel do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal sobre os efeitos do peptídeo intestinal vasoativo no controle da homeostase energética.** 2019. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) Londrina, 2019.

RESUMO

O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) é um neuropeptídeo anorexigênico e, além de inibir a ingestão alimentar, sua microinjeção intracerebroventricular (ICV) promove aumento plasmático do hormônio adrenocorticotrófico e de corticosterona, indicando que o VIP ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), eixo este que desempenha importante papel na homeostase energética. O objetivo deste trabalho foi investigar o papel do eixo HPA sobre os efeitos da microinjeção ICV de VIP na ingestão alimentar e parâmetros metabólicos plasmáticos. Para isto, foram avaliados os efeitos de VIP, em animais adrenalectomizados (ADX) com ou sem reposição de corticosterona, sobre a ingestão alimentar, parâmetros plasmáticos e a expressão de RNAm do receptor de VIP tipo 2 (VPAC2) em núcleos hipotalâmicos. Em animais intactos, foram avaliadas a ativação neuronal e a expressão de RNAm de fator liberador de corticotrofina (CRF) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) induzidas pelo VIP e o efeito do pré-tratamento com antagonistas do receptor de CRF tipo 1 (CRFR1), a antalarmina (ANT), e do receptor de CRF tipo 2 (CRFR2), a antisauvagina-30 (AS30), em resposta à administração de VIP sobre ingestão alimentar e parâmetros plasmáticos. O VIP promoveu hipofagia, hipercorticosteronemia, hiperglicemia e redução de ácidos graxos livres plasmáticos. A ADX atenuou estas respostas e reduziu a expressão de RNAm de VPAC2 no ARC e LHA, mas não no PVN. O VIP também aumentou o número de neurônios imunorreativos aos antígenos relacionados ao *Fos* (FRA) e a expressão de RNAm de CRF no PVN. ANT e AS30 atenuaram a inibição da ingestão alimentar promovida pelo VIP, sendo o efeito da ANT mais pronunciado. ANT e AS30 atenuaram o aumento da concentração plasmática de corticosterona e a diminuição da concentração plasmática de ácidos graxos livres, mas apenas a AS30 atenuou a hiperglicemia induzida pelo VIP. Estes resultados indicam que a ADX abole a hipofagia e as alterações metabólicas plasmáticas do VIP, sendo estes efeitos relacionados com a redução da expressão de VPAC2 no hipotálamo de animais ADX, e que o CRF é um mediador dos efeitos de VIP no balanço energético, sendo CRFR1 e CRFR2 participantes dessas respostas. Em resumo, o eixo HPA é de grande importância para os efeitos do VIP na homeostase energética, sendo o CRF um importante mediador hipotalâmico dessas respostas.

Palavras-chave: Núcleo paraventricular do hipotálamo. Fator liberador de corticotrofina. Ingestão alimentar. Corticosterona. Receptor de VIP tipo 2. Antalarmina. Antisauvagina-30.

GARNICA-SIQUEIRA, Marcela Cristina. **Role of hypothalamic-hypophysis-adrenal axis on the effects of vasoactive intestinal peptide in the control of energy homeostasis.** 2019. 77 p. Thesis (PhD in Physiological Sciences) Londrina, 2019.

ABSTRACT

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a neuropeptide that acts as an anorectic signal by inhibiting food intake, and its intracerebroventricular (ICV) microinjection promotes increase of adrenocorticotrophic hormone and corticosterone plasma levels, indicating that VIP activates hypothalamic-hypophysis-adrenal (HPA) axis. In addition, it is known that HPA axis plays important role in energy homeostasis. Thus, the aim of this study was to investigate the role of the HPA axis on the effects of ICV microinjection of VIP on food intake and plasma metabolic parameters. For this, it was evaluated VIP effects in adrenalectomized (ADX) animals, with or without replacement of corticosterone, on food intake and plasma parameters, as well as the expression of VIP type 2 receptor (VPAC2) mRNA in hypothalamic nuclei. In intact animals, it was evaluated the effects of ICV administration of VIP on the activity of neurons and corticotrophin-releasing factor (CRF) mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), as well as the effect of pretreatment with CRF type 1 receptor (CRFR1) antagonist, antalarmin (ANT) and CRF type 2 receptor (CRFR2) antagonist, antisauvagine-30 (AS30), on VIP-induced changes on food intake and plasma parameters. VIP promoted hypophagia, hyperglycemia, hypercorticosteronemia, and reduction of plasma free fatty acids. ADX attenuated these effects, and reduced mRNA expression of VPAC2 in lateral hypothalamic area and arcuate nucleus, but not in PVN. In addition, VIP increased the number of *Fos-related antigens* (FRA)-immunoreactive neurons and CRF mRNA levels in the PVN. Both ANT and AS30 treatment attenuated the inhibition of food intake promoted by VIP, ANT showed a more pronounced effect. ANT and AS30 attenuated the increase in plasma corticosterone levels and reduction of free fatty acids plasma levels, and only AS30 was able to attenuate the hyperglycemia induced by VIP. These results indicate that ADX abolishes VIP-induced hypophagia and plasma metabolic changes, being these effects associated with reduction of VPAC2 expression in the hypothalamus in ADX animals, as well as that CRF is a mediator of VIP effects on energy balance, both CRFR1 e CRFR2 participating in these responses. In summary, HPA axis is crucial for VIP effects on energy homeostasis, and CRF is an important hypothalamic mediator of this responses.

Key words: Paraventricular nucleus of the hypothalamus. Corticotrophin-releasing factor. Food intake. Corticosterone. VIP receptor type 2. Antalarmin. Antisauvagine-30.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ingestão alimentar (g/100 g peso corpóreo) por 120 min dos grupos *Sham*, ADX e ADX+CORT, após microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μ L) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μ L). Valores expressos como média \pm EPM (n= 9-13 ratos/grupo). *p<0,001 vs. respectivo grupo Salina. #p=0,04 vs. grupo *Sham*/Salina.....27
- Figura 2.** Concentração plasmática de: (A) corticosterona (μ g/dL), (B) glicose (mg/dL) e (C) ácidos graxos livres (μ moles/dL) dos grupos *Sham*, ADX e ADX+CORT, após microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μ L) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μ L). Valores expressos como média \pm EPM (n= 8-13 ratos/grupo). *p<0,001 vs. respectivo grupo Salina. #p<0,05 vs. respectivo *Sham*. +p<0,001 vs. respectivo ADX+CORT.29
- Figura 3.** Expressão relativa de RNAm do receptor do tipo 2 de VIP (VPAC2) em: (A) área hipotalâmica lateral (LHA), (B) núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), (C) núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), dos grupos *Sham*, ADX e ADX+CORT tratados com microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μ L). Valores expressos como média \pm EPM (n= 9-13 ratos/grupo). *p<0,05 vs. grupo *Sham*. **p=0,008 vs. grupo *Sham*.....30
- Figura 4.** Número de neurônios imunorreativos aos antígenos relacionados ao *Fos* (FRA) nas subdivisões parvocelular medial (PaMP - 5000 mm²), parvocelular ventral (PaV - 3000 mm²) e parvocelular posterior (PaPo - 8000 mm²) do núcleo para ventricular do hipotálamo (PVN) de animais tratados com microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μ L) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μ L). Valores expressos como média \pm EPM (n= 11-12 ratos/grupo). *p<0,05 vs. grupo Salina.....31

Figura 5.	Fotomicrografias representativas (ampliação de 40x) de cortes coronais mostrando imunorreatividade ao FRA, nas subdivisões do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de animais tratados com microinjeção ICV de Salina (NaCl 0,9%, 6 μ L) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μ L). (A): região parvocelular medial (PaMP) e parvocelular ventral (PaV) do PVN; (B): região parvocelular posterior (PaPo) do PVN. Cada imagem menor apresenta a área em que a fotomicrografia foi tirada com ampliação de 10x.	32
Figura 6.	Expressão relativa de RNAm de CRF no PVN de animais tratados com microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μ L) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μ L). Valores expressos como média \pm EPM (n= 8-10 ratos/grupo). *p<0,05 vs. grupo Salina.	33
Figura 7.	Ingestão alimentar (g/100 g peso corpóreo) por 120 min após microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μ L) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μ L) em animais pré-tratados com microinjeção ICV de: (A) veículo ou antalarmina (ANT; 0,25 μ g em 5 μ L), (B) veículo ou antisauvagina-30 (AS30; 5 μ g em 5 μ L). Valores expressos como média \pm EPM (n= 10-16 ratos/grupo). *p<0,05 vs. respectivo grupo Salina. #p<0,05 vs. grupo Veículo/VIP.	34
Figura 8.	Concentração plasmática de: (A e B) corticosterona (μ g/dL), (C e D) glicose (md/dL), e (E e F) ácidos graxos livres (μ moles/dL), de animais após microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μ L) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μ L) em animais pré-tratados com microinjeção ICV de veículo ou antalarmina (ANT; 0,25 μ g em 5 μ L) ou antisauvagina-30 (AS30; 5 μ g em 5 μ L). Valores expressos como média \pm EPM (n= 10-16 ratos/grupo). *p<0,05 vs. respectivo grupo Salina. #p<0,05 vs. grupo Veículo/VIP.....	35
Figura 9.	Desenho esquemático da interação de VIP com outros neuropeptídeos no hipotálamo. Modificado de Schwartz e colaboradores (2000).	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADX	Adrenalectomia
AgRP	Proteína relacionada ao gene Agouti
ANT	Antalarmina
AS30	Antisauvagina-30
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CRF	Fator liberador de corticotrofina
CRFR1	Receptor de CRF tipo 1
CRFR2	Receptor de CRF tipo 2
DMH	Núcleo dorsomedial do hipotálamo
FRA	neurônios imunorreativos aos antígenos relacionados ao <i>Fos</i> (<i>Fos-related antigens</i>)
ICV	Intracerebroventricular
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
LHA	Área hipotalâmica lateral
K+X	Cetamina + xilazina
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário
PaMP	Região parvocelular medial do PVN
PaPo	Região parvocelular posterior do PVN
PaV	Região paraventricular ventral do PVN
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POMC	Pró-opiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
OT	Ocitocina
SCN	Núcleo hipotalâmico supraquiasmático
SNC	Sistema nervoso central
TP	Tampão fosfato
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
VMH	Núcleo ventromedial do hipotálamo
VPAC1	Receptor de VIP tipo 1
VPAC2	Receptor de VIP tipo 2
α -MSH	Hormônio estimulante de α -melanócitos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	JUSTIFICATIVA	17
3	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivos gerais	18
3.2	Objetivos específicos	18
4	METODOLOGIA	19
4.1	Animais	19
4.2	Drogas utilizadas	19
4.3	Protocolos experimentais	20
4.3.1	<i>Experimento 1: efeitos da microinjeção de VIP na ingestão alimentar em animais Sham, ADX e ADX+CORT</i>	20
4.3.2	<i>Experimento 2: efeitos da microinjeção de VIP nos parâmetros plasmáticos de animais Sham, ADX e ADX+CORT</i>	20
4.3.3	<i>Experimento 3: efeitos da ADX e reposição de glicocorticoide na expressão de RNAm de VPAC2 no LHA, PVN e ARC</i>	21
4.3.4	<i>Experimento 4: efeitos da microinjeção de VIP na ativação neuronal do PVN</i>	21
4.3.5	<i>Experimento 5: efeitos da microinjeção de VIP na expressão de RNAm de CRF no PVN</i>	21
4.3.6	<i>Experimento 6: efeitos do pré-tratamento com antagonista de CRFR1 e CRFR2 na ingestão alimentar em resposta à microinjeção de VIP</i>	21
4.3.7	<i>Experimento 7: efeitos do pré-tratamento com antagonista de CRFR1 e CRFR2 nos parâmetros plasmáticos em resposta à microinjeção de VIP</i>	21
4.4	Adrenalectomia bilateral	22
4.5	Cirurgia intracerebroventricular	23
4.6	Microinjeção	23
4.7	Perfusão e preparação do tecido	24

4.8	Microdissecção, isolamento do RNA total e PCR em tempo real quantitativa	24
4.9	Imuno-histoquímica	25
4.10	Ingestão alimentar e peso corpóreo	25
4.11	Dosagens plasmáticas	25
4.12	Análise estatística	26
5	RESULTADOS	27
5.1	Parte I – Experimentos 1, 2 e 3	27
5.1.1	<i>Experimento 1: efeitos da microinjeção de VIP na ingestão alimentar em animais Sham, ADX e ADX+CORT</i>	27
5.1.2	<i>Experimento 2: efeitos da microinjeção de VIP nos parâmetros plasmáticos de animais Sham, ADX e ADX+CORT</i>	28
5.1.3	<i>Experimento 3: efeitos da ADX e reposição de glicocorticoide na expressão de RNAm de VPAC2 no LHA, PVN e ARC</i>	28
5.2	Parte II – Experimentos 4, 5, 6 e 7	31
5.2.1	<i>Experimento 4: efeitos da microinjeção de VIP na ativação neuronal do PVN</i>	31
5.2.2	<i>Experimento 5: efeitos da microinjeção de VIP na expressão de RNAm de CRF no PVN</i>	32
5.2.3	<i>Experimento 6: efeitos do pré-tratamento com antagonista de CRFR1 e CRFR2 na ingestão alimentar em resposta à microinjeção de VIP</i>	33
5.2.4	<i>Experimento 7: efeitos do pré-tratamento com antagonista de CRFR1 e CRFR2 nos parâmetros plasmáticos em resposta à microinjeção de VIP</i>	34
6	DISCUSSÃO	37
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
8	CONCLUSÃO	46
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

10	ANEXOS	57
	Anexo A: Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL	57
	Anexo B: Artigo da Tese submetido para publicação	60
	Anexo C: Artigo da Tese Publicado	73

1 INTRODUÇÃO

A homeostase energética trata-se de um processo regulatório ativo entre o consumo e o gasto energético, o qual provê estabilidade em relação aos estoques de energia corporal em forma de tecido adiposo (SCHWARTZ et al., 2000). O controle da homeostase energética tem sido objeto de investigação para se compreender os mecanismos envolvidos no controle da ingestão alimentar. A integração de sinais, provenientes da periferia do organismo com sinais elaborados no sistema nervoso central (SNC), é responsável pela regulação do comportamento alimentar e do gasto energético (HAVEL, 2001).

O hipotálamo tem posição de destaque neste controle, pois coordena e integra sinais centrais e periféricos para elaborar respostas neuroquímicas e neuroendócrinas apropriadas. Alguns núcleos hipotalâmicos participam ativamente no controle da ingestão de alimentos e balanço energético (ZAIA et al., 1997; WILLIAMS et al., 2001). O núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), por estar localizado adjacente ao terceiro ventrículo e à eminência mediana, possui neurônios com receptores que respondem as concentrações circulantes de insulina e leptina (SCHWARTZ et al., 1992a, 1992b; FRIEDMAN; HALAAS, 1998; BRUIJNZEEL et al., 2011; RIEDIGER, 2012). Esses hormônios agem nas subpopulações neuronais do ARC, onde alteram a expressão de diferentes neuropeptídeos envolvidos no controle da ingestão alimentar. Esses neurônios do ARC se projetam para alguns núcleos hipotalâmicos, entre eles, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), evidenciando assim o papel do ARC na integração de sinais para a homeostase energética (HALFORD et al., 2003; BOURET, 2004).

O PVN exerce papel central no controle da homeostase energética, é ativado após a ingestão alimentar (SINGRU et al., 2007), está envolvido nas respostas de saciedade por receber projeções do ARC e do núcleo do trato solitário (NTS), e expressar peptídeos orexigênicos e anorexigênicos (SCHWARTZ et al., 2000). A região parvocelular medial do PVN (PaMP) é responsável por produzir mediadores que projetam-se para a eminência mediana. As regiões paraventricular ventral (PaV) e parvocelular posterior (PaPo) possuem neurônios que se projetam para áreas de controle autonômico, como o NTS. E as áreas magnocelular lateral e magnocelular medial do PVN possuem neurônios produtores de vasopressina e ocitocina (OT) que enviam suas projeções axonais para a neuro-hipófise (ARMSTRONG et al., 1980).

Outros núcleos envolvidos no controle da ingestão de alimentos são o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), o núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) e a área hipotalâmica lateral (LHA). O VMH tem papel importante na inibição da ingestão alimentar, por possuir receptores para a leptina que atua como um mediador anorexígeno, e lesão bilateral do VMH gera hiperfagia e obesidade em ratos (ZAIA et al., 1987; SATOH et al., 1997a). A destruição bilateral do DMH, assim como do VMH, resulta em hiperfagia e obesidade (BELLINGER; BERNARDIS, 2002), ambos os núcleos são sensíveis a alterações circulantes periféricas (glicose, ácidos graxos, hormônios), ativando outros núcleos para determinar maior ou menor ingestão de alimentos, demonstrando como sua principal função a integração e o processamento de informações entre núcleos hipotalâmicos (ELMQUIST et al., 1998; BELLINGER; BERNARDIS, 2002; JEONG; LEE; JO, 2017). Por outro lado, sabe-se que o LHA recebe projeções do ARC e produz neuropeptídeos orexigênicos (SIMPSON; MARTIN; BLOOM, 2009) e destruição bilateral desse núcleo gera inibição da ingestão alimentar (WELKENHUYSEN et al., 2008).

Estes núcleos hipotalâmicos possuem projeções e conexões intrínsecas, e também expandem projeções que alcançam outras regiões encefálicas, como o tronco encefálico, onde o NTS tem papel crucial em direcionar os sinais hipotalâmicos para o sistema autonômico pela ativação ou inibição de vias neuronais descendentes (SCHWARTZ, 2010).

Neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos são produzidos por neurônios envolvidos neste complexo controle. Neurônios do ARC expressam peptídeos relacionados à ingestão alimentar, dentre os peptídeos orexígenos têm-se o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao Agouti (AgRP) (MORLEY et al., 1987; AKABAYASHI et al., 1994; EBHARA et al., 1999). No controle dos sinais anorexígenos participam o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) (SIMPSON; MARTIN; BLOOM, 2009), o fator liberador de corticotrofina (CRF) (UEHARA et al., 1998), o hormônio estimulante de α -melanócitos (α -MSH) (WOODS et al., 1998), a OT (ARLETTI; BENELLI; BERTOLINI, 1989), e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (ALMEIDA et al., 2002), entre outros.

O VIP é um peptídeo de 28 aminoácidos, da família do glucagon-secretina, descoberto no duodeno de porcos como um hormônio do trato gastrointestinal, capaz de induzir vasodilatação e hipotensão (SAID; MUTT, 1970). Demonstrou-se posteriormente que o VIP está presente no sistema nervoso central e periférico (SCHUTZBERG et al.,

1980), sendo reconhecido como um neuropeptídeo com propriedades neuromodulatórias. Neurônios que expressam o VIP estão distribuídos em diversas áreas do SNC, como córtex, hipocampo, núcleo amigdalóide, tálamo e hipotálamo. O núcleo hipotalâmico supraquiasmático (SCN) apresenta grande concentração de neurônios VIPérgicos e está normalmente co-localizado com neurônios GABAérgicos. Os receptores de VIP, VPAC1 e VPAC2, acoplados à proteína G, estão distribuídos no SNC, e estimulam preferencialmente a enzima adenilato ciclase e o aumento intracelular de AMPc. VPAC1 é expresso principalmente no hipocampo e córtex cerebral e em menor quantidade no hipotálamo (JOO et al., 2004). VPAC2 é expresso no tálamo, hipotálamo, tronco encefálico e amígdala (SHEWARD; LUTZ; HARMAR, 1995). No hipotálamo, VPAC2 é encontrado nos núcleos supraóptico, SCN, ARC e preferencialmente na região parvocelular do PVN, assim como, na hipófise anterior (GERHOLD; HORVATH; FREEMAN, 2001), onde controla a atividade e secreção de hormônios como prolactina e OT, sendo que a expressão do receptor VPAC2 está presente em áreas associadas às funções neuroendócrinas no SNC (USDIN; BONNER; MEZEY, 1994). As fibras nervosas VIPérgicas provavelmente alcançam a eminência mediana e terminam próximas aos capilares do sistema portal hipotálamo-hipófise (NUSSDORFER; MALENDOWICZ, 1998). Interessantemente, o VIP atua como um forte sinal anorexígeno ao inibir a ingestão alimentar (ALMEIDA et al., 2002; GHOURAB et al., 2011) e estudos demonstram a ação do VIP em inibir a ingestão alimentar em galináceos (TACHIBANA et al., 2003), peixes (MATSUDA et al., 2005) e ratos (MARTINS et al., 2018). Microinjeção intracerebroventricular (ICV) de VIP em ratos resulta em aumento plasmático da concentração de glicose com diminuição da ingestão alimentar (GHOURAB et al., 2011), assim como, aumento de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona plasmática de maneira dose dependente, por estimular neurônios CRF e agir na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (ALEXANDER; SANDER, 1994; WANG et al., 1998). Entretanto, animais *knockout* para VIP (VIP -/-) apresentaram diminuição de peso corpóreo e massa adiposa, aumento de ingestão alimentar no período claro, e no jejum observou-se diminuição das concentrações plasmáticas de grelina e adiponectina, e aumento das concentrações plasmáticas de leptina, peptídeo semelhante ao glucagon-1 e o peptídeo YY, demonstrando que o VIP tem papel regulador chave no controle dos hormônios anorexígenos e orexígenos (VU et al., 2015).

Entre os sinais periféricos que participam do controle da ingestão alimentar estão a insulina, a leptina e os glicocorticoides (SAINSBURY; COONEY; HERZOG, 2002). Os glicocorticoides são produzidos na adrenal, controlados pelo eixo HPA, e atuam no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, assim como, na resposta adaptativa ao estresse e ao promover o aumento do apetite e do peso corpóreo em humanos e roedores (ZAKRZEWSKA et al., 1999a). Kumar e Leibowitz (1988) demonstraram que a adrenalectomia (ADX) bilateral diminui a ingestão alimentar e o peso corpóreo, e a reposição de corticosterona estimula a ingestão alimentar, revertendo a anorexia induzida pela ADX nos animais, associada à menor expressão de NPY (STRACK et al., 1995).

A ADX bilateral tem sido amplamente utilizada para o estudo do eixo HPA e da ação dos glicocorticoides, que promovem a retroalimentação negativa na adeno-hipófise e no hipotálamo, inibindo a síntese e liberação de ACTH e CRF, respectivamente; ao passo que a reposição de corticosterona em animais adrenalectomizados atenua o aumento da secreção de ACTH e da expressão de CRF no PVN induzidos pela ADX (AKABAYASHI et al., 1994; DALLMAN et al., 1987; BEYER; MATTA; SHARP, 1988).

A retirada dos glicocorticoides, por remoção das glândulas adrenais promove alteração na expressão dos neuropeptídeos relacionados ao controle da ingestão alimentar e homeostase energética (MAKIMURA et al., 2003). Dessa forma, estudos verificaram a presença de receptores para glicocorticoides nos neurônios hipotalâmicos que expressam NPY e AgRP (HISANO et al., 1988; CINTRA et al., 1991), e que os glicocorticoides têm o potencial de estimular, no ARC, a produção e liberação de AgRP e NPY para atuarem no PVN (LEON-MERCADO et al., 2017). Sabe-se também que a expressão de NPY no hipotálamo é aumentada pela administração de glicocorticoides (ZAKRZEWSKA et al., 1999b), e ADX diminui a expressão de NPY e AgRP no ARC (UCHOA et al., 2012).

Como já mencionado, além do NPY e AgRP, a expressão de CRF no PVN também é alterada pelos glicocorticoides (AKABAYASHI et al., 1994; DALLMAN et al., 1987; BEYER; MATTA; SHARP, 1988). O CRF, liberado do PVN, atua por meio de receptores específicos acoplados à proteína G, denominados CRFR1 e CRFR2. O CRFR1 possui grande distribuição no SNC, com expressão significativa no cerebelo, estruturas límbicas, núcleos da rafe dorsal e medial, PVN e hipófise anterior e *intermedia* (CHALMERS; LOVENBERG; DE SOUZA, 1995; VAN PETT et al., 2000), e está relacionado à ativação do eixo HPA, pela sua presença nos corticotrofos (GUTMAN et

al., 2003). O CRFR2 é expresso no bulbo olfatório, amígdala, hipocampo, núcleos da rafe, e no hipotálamo, no núcleo supraóptico, VMH e PVN (LOVENBERG et al., 1995; VAN PETT et al., 2000), áreas hipotalâmicas relacionadas ao controle da ingestão alimentar, sendo responsável pelos efeitos anoréxicos do CRF (VAUGHAN et al., 1995).

A administração central de CRF diminui a ingestão alimentar em ratos, sugerindo que o aumento de secreção de CRF endógeno, em resposta à ausência da contra regulação dos glicocorticoides pode contribuir para a diminuição da ingestão alimentar após ADX (ARASE et al., 1988). Makino e colaboradores (1998) observaram diminuição da expressão de CRFR2 no VMH, após ADX, e aumento da expressão de CRF no PVN, demonstrando a importância do PVN na hipofagia induzida pela ADX.

Para elucidar as ações relacionadas a cada receptor, antagonistas do receptor de CRF têm sido utilizados. A antalarmina, antagonista de alta afinidade do receptor CRFR1, promoveu redução dos valores basais de ACTH e corticosterona, demonstrando sua participação na regulação do eixo HPA (WONG et al., 1999). Uchoa e colaboradores (2009a) demonstraram que ADX promove hipofagia e aumenta a ativação de neurônios do NTS em resposta à alimentação, entretanto, tratamento com antagonista do receptor de CRFR2, antisauvagina-30, reverteu os dois parâmetros (UCHOA et al., 2010), evidenciando o papel deste receptor na redução da ingestão alimentar e na ativação das vias de saciedade relacionadas ao tronco cerebral após a ADX. Chotiawat e Harris (2008) observaram a participação de CRFR1 e CRFR2 nos efeitos do estresse na ingestão alimentar e peso corpóreo, sendo que a antalarmina reduziu as concentrações plasmáticas de corticosterona em ratos durante o estresse por imobilização (DE LA TREMBLAYE et al., 2014).

A interação entre o eixo HPA e o VIP é evidenciada por Ceccatelli e colaboradores (1989) que reconheceram co-localização de VIP e CRF em neurônios parvocelulares do PVN de ratos; e na pituitária observou-se aumento da expressão de VIP após ADX, e o tratamento com dexametasona aboliu este efeito (JONES et al., 1990; LAM; SRIVASTAVA; TAM, 1992). Além disso, o VIP foi eficaz em estimular a liberação de ACTH e corticosterona em ratos (PRALONG; CORDER; GAILLARD, 1991), e de cortisol e ACTH em humanos com síndrome de Cushing (WATANOBE; TAMURA, 1994), sendo que a administração de dexametasona inibe esta resposta (WATANOBE; TAMURA, 1997). Em galináceos, injeção ICV de VIP promoveu aumento da concentração plasmática de corticosterona e diminuição da expressão de CRF no diencéfalo, assim como de urocortina-3 e CRFR2 (KHAN et al., 2013).

Considerando a importância do VIP e do eixo HPA na regulação da homeostase energética, torna-se relevante o estudo da interação entre esses dois componentes no controle da ingestão alimentar. Dessa forma, o presente estudo avaliou os efeitos da ADX e dos receptores de CRF nas respostas induzidas pelo VIP na homeostase energética.

2 JUSTIFICATIVA

O VIP é um importante sinal anorexígeno no controle da homeostase energética. Sabe-se que o VIP promove diminuição da ingestão alimentar e aumento da glicemia e de corticosterona plasmática, parâmetros controlados pelo eixo HPA. É de grande relevância compreender os mecanismos envolvidos com a atuação de VIP pois permitirá elucidar e expandir a visão do complexo controle da homeostase energética.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o papel do eixo HPA sobre os efeitos da microinjeção ICV de VIP sobre parâmetros plasmáticos e ingestão alimentar de ratos.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho constituem em avaliar:

- 1) Em animais adrenalectomizados, com ou sem reposição de corticosterona:
 - a. Os efeitos da administração de VIP sobre a ingestão alimentar e parâmetros plasmáticos (glicose, ácidos graxos livres e corticosterona);
 - b. A expressão de RNAm de VPAC2 no LHA, PVN e ARC.

- 2) Em animais intactos, a resposta à administração central de VIP sobre:
 - a. A ativação neuronal no PVN;
 - b. A expressão de RNAm de CRF no PVN.

- 3) Em animais intactos, o efeito do pré-tratamento com antagonistas de receptores de CRF do tipo 1 ou do tipo 2, em resposta à administração central de VIP sobre a ingestão alimentar e parâmetros plasmáticos (glicose, ácidos graxos livres e corticosterona).

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar ($n = 354$; 260-280 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF), com ambiente de luz (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (23 ± 2 °C) controladas, e água e alimentação à vontade. Os animais passaram por um período de aclimação de no mínimo 48 h anterior ao início dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo (LaFiNeM) do CIF/UEL entre 7 h e 12 h, para minimizar qualquer influência do ritmo circadiano. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), processos nº 4929.2015.80 (OF. Nº 135/2015) e nº 14371.2017.44 (OF. Nº 08/2018) (Anexo A).

4.2 Drogas utilizadas

As drogas microinjetadas foram:

- VIP (Sigma Co., CA) na dose de 40 ng/g de peso corpóreo em 6 μ L e salina estéril (NaCl 0,9%, 6 μ L) como veículo. A dose escolhida para a microinjeção de VIP foi baseada em diferentes trabalhos da literatura (ALEXANDER; SANDER, 1994; GHOURAB et al., 2011; MARTINS et al., 2018; TACHIBANA et al., 2003);
- corticosterona (Sigma Co., CA), na dose de 25 mg/L diluída em etanol 0,5% (UCHOA et al., 2010), ofertada como única fonte de líquido aos animais ADX;
- antalarmina (ANT, Sigma Co., CA), antagonista de CRFR1, na dose de 0,25 μ g em 5 μ L (CHOTIWAT; HARRIS, 2008; ZORRILLA et al., 2002) ou veículo (NaCl 0,9%/álcool absoluto/SDS/DMSO, 5 μ L);

- antisauvagina-30 (antisauvagine-30, AS30, Peninsula/Bachem), antagonista de CRFR2, na dose de 5 µg em 5 µL (UCHOA et al., 2010) ou veículo (NaCl 0,9%, 5 µL).

4.3 Protocolos experimentais

Todos os animais foram submetidos à estereotaxia. Nos protocolos 1, 2, 3 a seguir, os animais também foram submetidos à cirurgia de adrenalectomia bilateral (ADX) ou cirurgia fictícia (*Sham*), e após foram mantidos em caixas individuais constituindo os seguintes grupos experimentais:

- Grupo Sham: ratos mantidos com acesso livre à água contendo etanol 0,5%, como única fonte de líquido;
- Grupo ADX: ratos adrenalectomizados bilateralmente (ADX) e mantidos com acesso à solução de NaCl 0,9% contendo etanol 0,5%, como única fonte de líquido;
- Grupo ADX+CORT: ratos adrenalectomizados (ADX) bilateralmente e mantidos com acesso à solução de NaCl 0,9%, contendo corticosterona (CORT, 25 mg/L) diluída em etanol 0,5%, como única fonte de líquido.

Após 6 dias de recuperação dos procedimentos cirúrgicos, a ração foi retirada, sempre às 16 horas, e, no dia seguinte, foram realizados os testes experimentais.

4.3.1 Experimento 1: efeitos da microinjeção de VIP na ingestão alimentar em animais Sham, ADX e ADX+CORT

Os animais receberam microinjeção ICV de VIP ou salina; após 15 min, tiveram acesso à ração (50 g), sendo a ingestão alimentar quantificada (g/100 g de peso corpóreo) após 120 min.

4.3.2 Experimento 2: efeitos da microinjeção de VIP nos parâmetros plasmáticos de animais Sham, ADX e ADX+CORT

Os animais receberam microinjeção ICV de VIP ou salina. Após 15 min, foram eutanasiados, por decapitação e o sangue coletado em tubos heparinizados e centrifugado por 20 min a 14.000 x g. O plasma obtido foi armazenado a -20 °C e utilizado para dosagens bioquímicas de glicose, corticosterona e ácidos graxos livres.

4.3.3 Experimento 3: efeitos da ADX e reposição de glicocorticoide na expressão de RNAm de VPAC2 no LHA, PVN e ARC

Os animais receberam microinjeção ICV de salina. Após 15 min, os animais foram eutanasiados por decapitação e os cérebros, sob condições que evitassem contaminação, foram rapidamente coletados e imediatamente congelados em gelo seco e armazenados em freezer -80 °C para determinação da concentração de RNAm de VPAC2 no LHA, ARC e PVN por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (UCHOA et al., 2012).

4.3.4 Experimento 4: efeitos da microinjeção de VIP na ativação neuronal do PVN

Os animais receberam microinjeção ICV de VIP ou salina e, após 90 min, foram perfundidos para obtenção do tecido neural e posterior realização dos procedimentos imuno-histoquímicos (HOFFMANN; SMITH; VERBALIS, 1993).

4.3.5 Experimento 5: efeitos da microinjeção de VIP na expressão de RNAm de CRF no PVN

Os animais receberam microinjeção ICV de VIP ou salina. Após 60 min, os animais foram eutanasiados por decapitação e os cérebros, sob condições que evitassem contaminação, foram rapidamente coletados e imediatamente congelados em gelo seco e armazenados em freezer -80 °C para determinação da concentração de RNAm de CRF no PVN por PCR em tempo real (BREDOW et al., 1994).

4.3.6 Experimento 6: efeitos do pré-tratamento com antagonista de CRFR1 e CRFR2 na ingestão alimentar em resposta à microinjeção de VIP

Os animais foram organizados em dois grupos: o primeiro recebeu microinjeção ICV do antagonista de CRFR1, ANT ou veículo, e o segundo recebeu microinjeção ICV do antagonista de CRFR2, AS30 ou veículo. Após 15 min, os animais de ambos os grupos receberam microinjeção ICV de VIP ou salina. Após 15 min da segunda microinjeção, todos os animais tiveram acesso à ração (50 g) e a ingestão alimentar foi quantificada (g/100 g de peso corpóreo) após 120 min.

4.3.7 Experimento 7: efeitos do pré-tratamento com antagonista de CRFR1 e CRFR2 nos parâmetros plasmáticos em resposta à microinjeção de VIP

Os animais foram organizados em dois grupos: o primeiro recebeu microinjeção ICV do antagonista de CRFR1, ANT ou veículo, e o segundo recebeu microinjeção ICV

do antagonista de CRFR2, AS30 ou veículo. Após 15 min, os animais de ambos os grupos receberam microinjeção ICV de VIP ou salina. Após 15 min da segunda microinjeção, todos os animais foram eutanasiados por decapitação e o sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugado por 20 min a 14000 x g. O plasma obtido foi armazenado a -20 °C e utilizado para dosagens bioquímicas de glicose, corticosterona e ácidos graxos livres.

4.4 Adrenalectomia bilateral

Os animais, anestesiados com injeção de K+X (K, ketamina 10%; 100 mg/kg, Agener União + X, hidrocloreto de xylazina 2%; 20 mg/kg, Anasedan®, Vertbrands, Jacareí, Brasil), via intraperitoneal, foram submetidos à tricotomia da região dorsal, para a realização da adrenalectomia bilateral (ADX) ou adrenalectomia fictícia (*Sham*). Foi realizada uma incisão dorsal na linha mediana da pele, tendo como referência o ângulo entre a última costela e a coluna vertebral. Após visualização, os músculos paravertebrais foram seccionados e os órgãos abdominais identificados. No grupo de animais adrenalectomizados, com o auxílio de uma pinça, a gordura perirrenal foi exteriorizada e seccionada juntamente com a adrenal. O mesmo procedimento foi realizado para a glândula adrenal contra-lateral. Após a sutura, os animais receberam uma dose profilática de antibiótico (50.000 unidades de penicilina G; 0,1 mL por 100 g de peso corpóreo, por via intramuscular) e paracetamol (200 mg/mL; dose de 200 mg/kg de peso corpóreo, por via oral). Durante todo o período experimental posterior à cirurgia, os animais ADX receberam salina 0,9% com etanol 0,5%, sem glicocorticoide (ADX) ou com glicocorticoide (corticosterona, Sigma Co., CA) na concentração de 25 mg/dL (ADX+CORT). O grupo *Sham* foi submetido a procedimento cirúrgico similar, porém as glândulas adrenais não foram removidas, apenas foi introduzida pinça não cortante na cavidade e, em seguida, a incisão cirúrgica foi suturada. Esse grupo recebeu, para beber, água de torneira com etanol 0,5%. Para garantir a efetividade da cirurgia e da reposição de glicocorticoide, a concentração plasmática de corticosterona foi determinada pelo método fluorimétrico de Guillemin e colaboradores (1959).

4.5 Cirurgia intracerebroventricular

Após período de adaptação, de ao menos 48 h no Biotério Setorial do CIF, os animais foram anestesiados com uma associação de K+X. Por estereotaxia unilateral (David Kopf Instruments, modelo 900), foi implantada uma cânula-guia de aço inoxidável (0,7 mm diâmetro externo, 0,4 mm diâmetro interno e 10 mm comprimento) no ventrículo lateral direito (AP = - 0,8 mm; H = 3,6 mm; L = 1,5 mm; utilizando-se como referências o Bregma, a calota craniana e a sutura sagital, respectivamente), segundo coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (1997). Para fixação da cânula na posição adequada, foi utilizado acrílico autopolimerizável (Simplex[®]) sobre a calota craniana, na qual foram fixados dois parafusos metálicos para assegurar a adesão do polímero ao osso. O critério para a verificação da posição da cânula no ventrículo lateral foi o influxo de salina (NaCl 0,9%) por meio de uma coluna de salina, durante a cirurgia de implantação da cânula. Após o procedimento cirúrgico, foi mantido um mandril de aço dentro da cânula implantada, para evitar a obstrução de sua luz por detritos, exceto durante as microinjeções. Ao término da cirurgia, os animais receberam uma dose profilática de antibiótico (50.000 unidades de penicilina G; 0,1 mL por 100 g de peso corpóreo, por via intramuscular) e paracetamol (200 mg/mL; dose de 200 mg/kg de peso corpóreo, por via oral). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com no máximo três animais, para melhor recuperação do procedimento cirúrgico. Três dias antes do experimento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, para adaptação, e com livre acesso à ingestão de fluidos e alimentação. O posicionamento da cânula foi confirmado por meio de secções do cérebro em criostato (Leica) ao final do experimento em todos os grupos, sendo somente considerados os animais cuja implantação foi na área desejada.

4.6 Microinjeção

As drogas microinjetadas foram preparadas imediatamente antes da microinjeção. A microinjeção ICV foi realizada com o auxílio de microseringa Hamilton de 10 µL, acoplada à microagulha que foi introduzida na cânula-guia.

4.7 Perfusão e preparação do tecido

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de K+X e, após o desaparecimento dos reflexos raqui-medulares, foram submetidos à perfusão do SNC. A perfusão transcardíaca iniciou-se com a infusão de 200 mL de solução salina isotônica (NaCl 0,15 M) com heparina (diluição 1:80) seguida pela infusão de 400 mL de paraformoldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (TP, pH 7,4), utilizando bomba peristáltica (Razel Syringe Pump) com velocidade de infusão de 10 mL/min. O cérebro foi removido e pós-fixado em paraformoldeído 4% por 1 h, e então estocado em solução de sacarose 30% com TP 0,1M a 4 °C para a realização dos procedimentos imuno-histoquímicos.

4.8 Microdissecção, isolamento do RNA total e PCR em tempo real quantitativa

Os cérebros foram removidos e estocados em freezer -80 °C até a microdissecção dos núcleos de interesse, pela técnica de Palkovits (1973). Após obter secções coronais de 1200 µm em criostato (Leica), segundo as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (1997), sendo de -0,92 a -2,12 para o PVN e de -2,12 a -3,32 para LHA e ARC, em relação ao bregma, amostras dos tecidos de LHA, ARC e PVN foram obtidas usando uma agulha de aço, com 1,5 mm de diâmetro, para “punch” (microdissecção). O RNA total foi extraído de cada amostra, relativa à área hipotalâmica microdissecada, utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen®, Nova Zelândia). A concentração de RNA em cada amostra foi determinada utilizando um leitor de microplaca de multi-deteção (Synergy HT, BioTek), e 500 ng de RNA foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA) por kit comercial (High-Capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems, USA). O cDNA obtido foi utilizado para as reações de PCR em tempo real quantitativa (Applied Biosystems 7500, USA). Foram utilizadas sondas para a expressão do gene de VPAC2 (Rn 00568267_m1) e de CRF (Rn 01462137_m1). As reações foram realizadas em volume de 12 µL (4 µL de cDNA), utilizando reagentes TaqMan® (Applied Biosystems, USA). Cada reação de PCR foi realizada em duplicata, sendo a água o controle negativo. A beta-actina foi utilizada como gene de referência (controle endógeno), o qual ocorreu com cada amostra de cDNA. A determinação das concentrações de genes transcritos em cada amostra foi obtida pelo método $\Delta\Delta CT$. Para cada amostra, o ciclo limiar (Ct) foi determinado e normalizado com a média do gene de referência ($\Delta Ct = Ct_{amostra} - Ct_{genedereferência}$). A variação da expressão de RNAm nas

amostras em relação ao grupo controle foi calculada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra} - \Delta Ct_{controle}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O resultado obtido representa a expressão relativa de RNAm do gene de interesse.

4.9 Imuno-histoquímica

Os tecidos cerebrais foram seccionados em cortes de 30 μ m de espessura utilizando-se um criostato (Leica), colocados em TP e armazenados em solução crioprotetora a -20 °C. Os cortes foram processados para imunoreatividade ao FRA (*Fos-related antigens*). Primeiramente, os cortes foram colocados em solução H₂O₂ (0,3%) para bloqueio da peroxidase endógena, e albumina bovina 5% para bloqueio das ligações inespecíficas. Após, os cortes foram incubados por 48 h a 4 °C com anticorpo anti-FRA (K25, Santa Cruz) com diluição 1:2000 em TP 0,1 M contendo soro normal de cabra 1,5% e Triton 0,3%. Os cortes foram lavados com TP 0,01 M e incubados com marcador biotilado imunoglobulina anti-coelho (Vector Inc., Ca, USA, diluição 1:200 em TP e soro de cabra 1,5%) e após com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain, 1:200 em TP), por 1 h cada em temperatura ambiente. Posteriormente, para visualização da expressão de FRA, foi utilizado diaminobenzidina (DAB, Sigma CO., Ca, USA, 0,01%) e intensificado com cloreto de níquel 1% como cromógenos, cuja reação confere ao núcleo das células uma coloração de violeta escuro a preto. Em seguida, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e deixadas para secar por uma noite, desidratadas em xilol e colocada lamínula com Ethelan (New Jersey, USA).

4.10 Ingestão alimentar e peso corpóreo

O peso corpóreo dos animais foi avaliado no dia do experimento e expresso em gramas. Os animais receberam ração para roedores (50 g, Nuvilab CR1, Nuvital®) e as sobras foram determinadas após 120 min da oferta, para cálculo da ingestão alimentar, expressa em g/100 g de peso corpóreo.

4.11 Dosagens plasmáticas

Espectrofotometria foi utilizada para as determinações das concentrações plasmáticas de glicose, baseada na reação da peroxidase (TRINDER, 1969), usando kit

comercial de glicose (BioLiquid Laborclin, PR, Brazil), e de ácidos graxos livres pelo método modificado de Falholt e colaboradores (1973) e fluorimetria para determinação da concentração de corticosterona plasmática pelo método modificado de Guillemin e colaboradores (1959).

4.12 Análise estatística

Para análise estatística, os dados foram testados quanto à distribuição normal e homogeneidade de variância. Foi utilizado teste *t* de Student, para comparação entre dois grupos, e análise de variância (ANOVA) *one-way* Anova, para análise dos experimentos com uma variável e *two-way* Anova, para análise dos experimentos com duas variáveis, seguido de teste de Student Newman-Keuls (SNK). Os dados foram expressos como média \pm EPM, considerando-se como nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Parte I – Experimentos 1, 2 e 3

5.1.1 Experimento 1: efeitos da microinjeção de VIP na ingestão alimentar em animais Sham, ADX e ADX+CORT

No grupo *Sham*, o tratamento com VIP promoveu uma redução ($F(5,62) = 15,08$; $p < 0,001$) de aproximadamente 60% na ingestão alimentar, quando comparado com o tratamento com Salina, a ingestão alimentar dos animais tratados com VIP não foi diferente do tratamento com Salina nos grupos ADX e ADX+CORT. Avaliando os animais tratados com Salina, o grupo ADX apresentou redução ($F(5,62) = 3,60$; $p = 0,04$) na ingestão alimentar, quando comparado com o grupo *Sham*, enquanto a ingestão alimentar do grupo ADX+CORT não diferiu em relação aos grupos *Sham* e ADX (figura 1). Em animais tratados com o VIP, não houve diferença entre os três grupos experimentais.

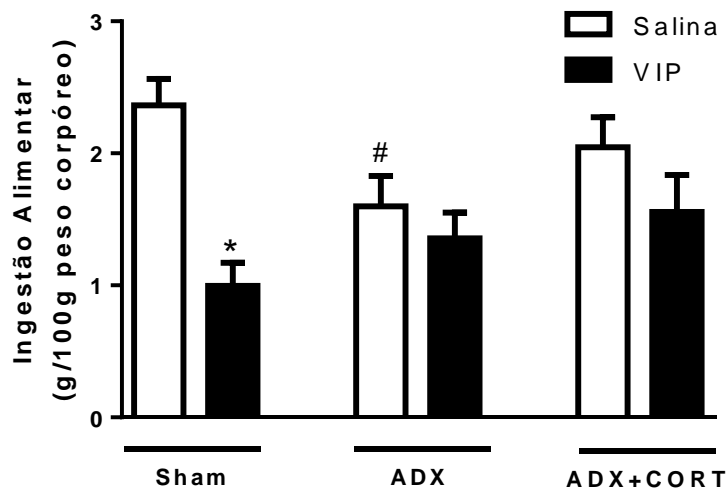


Figura 1. Ingestão alimentar (g/100 g peso corpóreo) por 120 min dos grupos *Sham*, ADX e ADX+CORT, após microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μ L) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μ L). Valores expressos como média \pm EPM ($n = 9-13$ ratos/grupo). * $p < 0,001$ vs. respectivo grupo Salina. # $p = 0,04$ vs. grupo *Sham*/Salina.

5.1.2 Experimento 2: efeitos da microinjeção de VIP nos parâmetros plasmáticos de animais Sham, ADX e ADX+CORT

O tratamento com VIP aumentou ($F(5,56) = 85,78$; $p < 0,001$) as concentrações plasmáticas de corticosterona no grupo *Sham*, quando comparado com seu respectivo grupo Salina. Entretanto, no grupo ADX+CORT, o VIP diminuiu as concentrações plasmáticas de corticosterona. Nos animais tratados com Salina ou VIP, as concentrações plasmáticas de corticosterona foram maiores no grupo *Sham* do que no grupo ADX+CORT. O grupo ADX não apresentou concentrações detectáveis de corticosterona plasmática (figura 2A), confirmando a eficácia da cirurgia.

A microinjeção de VIP induziu aumento ($F(5,56) = 30,20$; $p < 0,001$) nas concentrações plasmáticas de glicose (figura 2B) no grupo *Sham*, quando comparado com a microinjeção de Salina, ao passo que o tratamento com o VIP não promoveu nenhuma alteração nos grupos ADX e ADX+CORT. Nos grupos ADX, os animais tratados com Salina ou VIP apresentaram concentrações plasmáticas de glicose menores ($p < 0,001$) do que o grupo ADX+CORT, e ambos os grupos ADX e ADX+CORT microinjetados com VIP tiveram redução ($p < 0,05$) da glicemia, quando comparados com o grupo *Sham*.

As concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (figura 2C) diminuíram ($F(5,56) = 6,31$; $p = 0,004$) com a microinjeção de VIP no grupo *Sham*. Porém, nos grupos ADX e ADX+CORT, não houve diferença entre os tratamentos com Salina e VIP. A ADX reduziu ($F(5,56) = 3,22$; $p < 0,05$) a concentração de ácidos graxos livres no plasma dos animais microinjetados com Salina, não sendo observada diferença entre os animais microinjetados com VIP nos grupos *Sham*, ADX e ADX+CORT.

5.1.3 Experimento 3: efeitos da ADX e reposição de glicocorticoide na expressão de RNAm de VPAC2 no LHA, PVN e ARC

Os grupos ADX e ADX+CORT apresentaram redução na expressão de RNAm de VPAC2 no LHA ($F(2,31) = 7,8$; $p = 0,002$) e ARC ($F(2,31) = 5,6$; $p = 0,008$) quando comparado com o grupo *Sham* (figura 3A e 3B, respectivamente). No PVN, não houve diferença entre os grupos *Sham*, ADX e ADX+CORT (figura 3C).

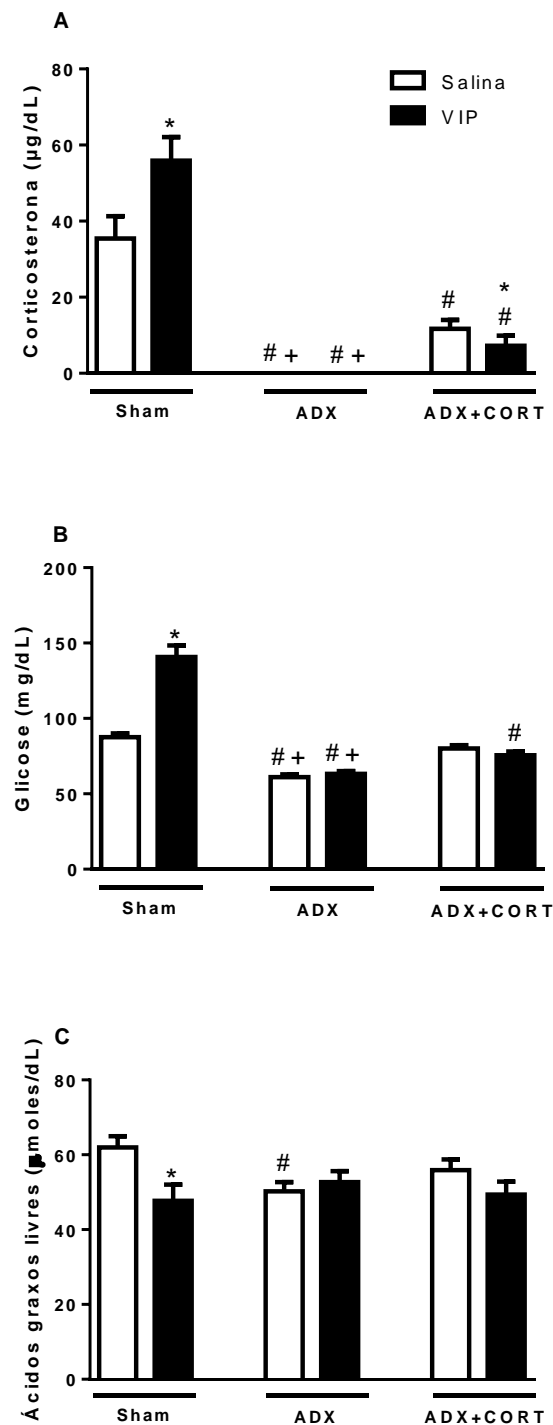


Figura 2. Concentração plasmática de: **(A)** corticosterona ($\mu\text{g/dL}$), **(B)** glicose (mg/dL) e **(C)** ácidos graxos livres ($\mu\text{moles/dL}$) dos grupos *Sham*, *ADX* e *ADX+CORT*, após microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μL) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μL). Valores expressos como média \pm EPM ($n = 8-13$ ratos/grupo). * $p < 0,001$ vs. respectivo grupo Salina. # $p < 0,05$ vs. respectivo *Sham*. + $p < 0,001$ vs. respectivo *ADX+CORT*.

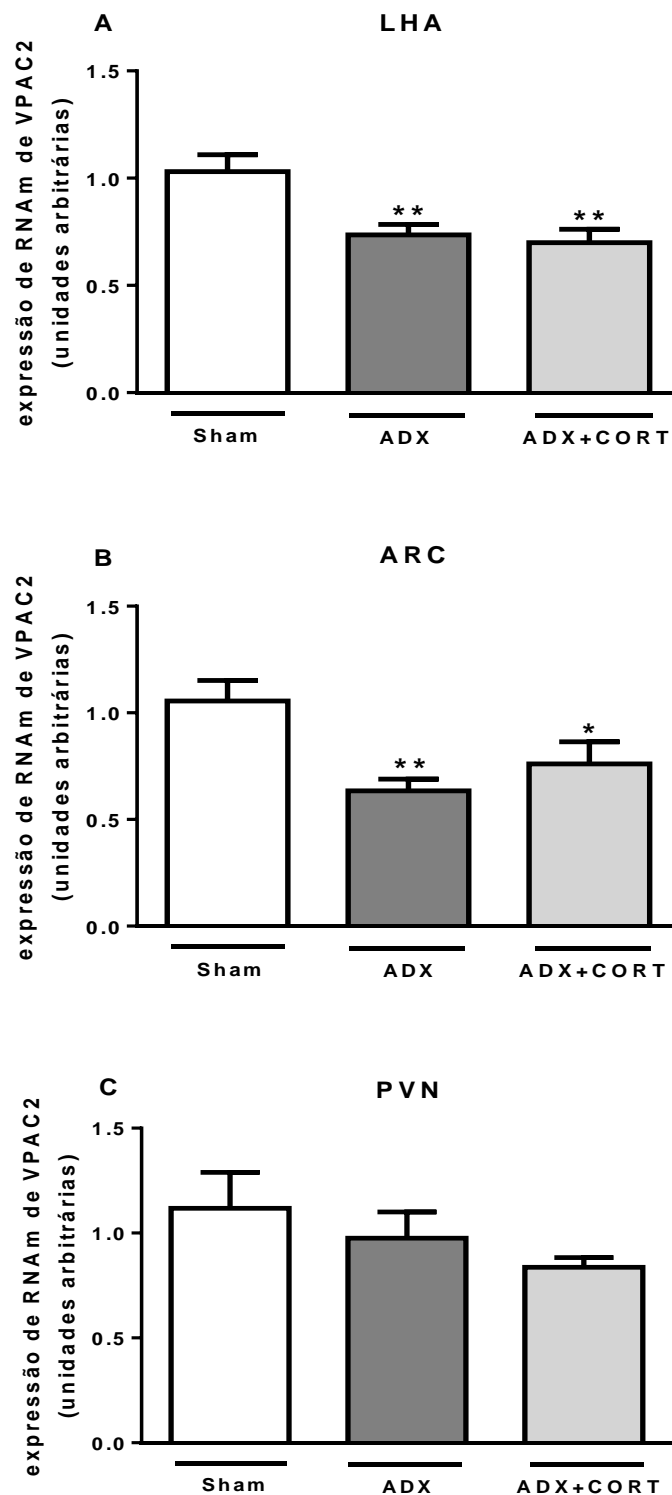


Figura 3. Expressão relativa de RNAm do receptor do tipo 2 de VIP (VPAC2) em: **(A)** área hipotalâmica lateral (LHA), **(B)** núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), **(C)** núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), dos grupos *Sham*, ADX e ADX+CORT tratados com microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μ L). Valores expressos como média \pm EPM ($n= 9-13$ ratos/grupo). * $p < 0,05$ vs. grupo *Sham*. ** $p=0,008$ vs. grupo *Sham*.

5.2 Parte II – Experimentos 4, 5, 6 e 7

5.2.1 Experimento 4: efeitos da microinjeção de VIP na ativação neuronal do PVN

A microinjeção de VIP promoveu aumento ($p < 0,05$) no número de neurônios imunorreativos ao FRA, em todas as áreas do PVN, quando comparados com o grupo Salina; sendo esse aumento de 130% no PamP, 205% no PaV e 136% no PaPo (figura 4). Fotomicrografias representativas da expressão de FRA no PVN são mostradas na figura 5.

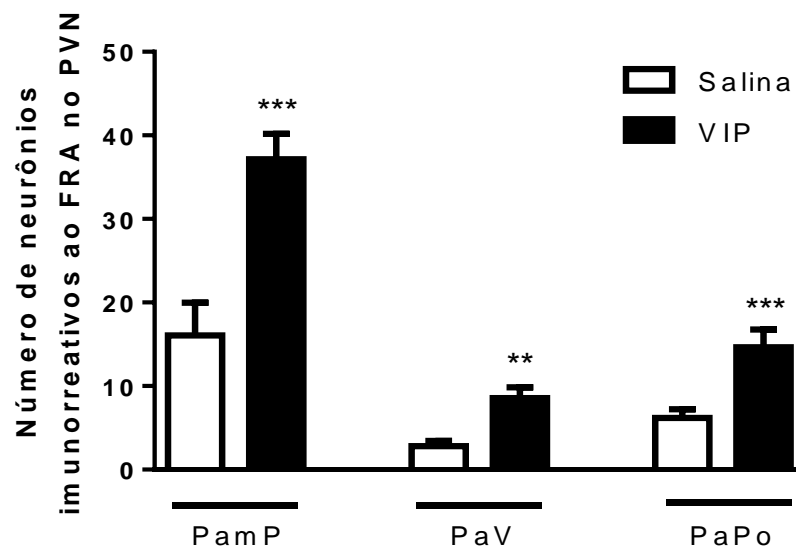


Figura 4. Número de neurônios imunorreativos aos antígenos relacionados ao Fos (FRA) nas subdivisões parvocelular medial (PaMP - 5000 mm²), parvocelular ventral (PaV - 3000 mm²) e parvocelular posterior (PaPo - 8000 mm²) do núcleo para ventricular do hipotálamo (PVN) de animais tratados com microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μL) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μL). Valores expressos como média ± EPM (n= 11-12 ratos/grupo). * $p < 0,05$ vs. grupo Salina.

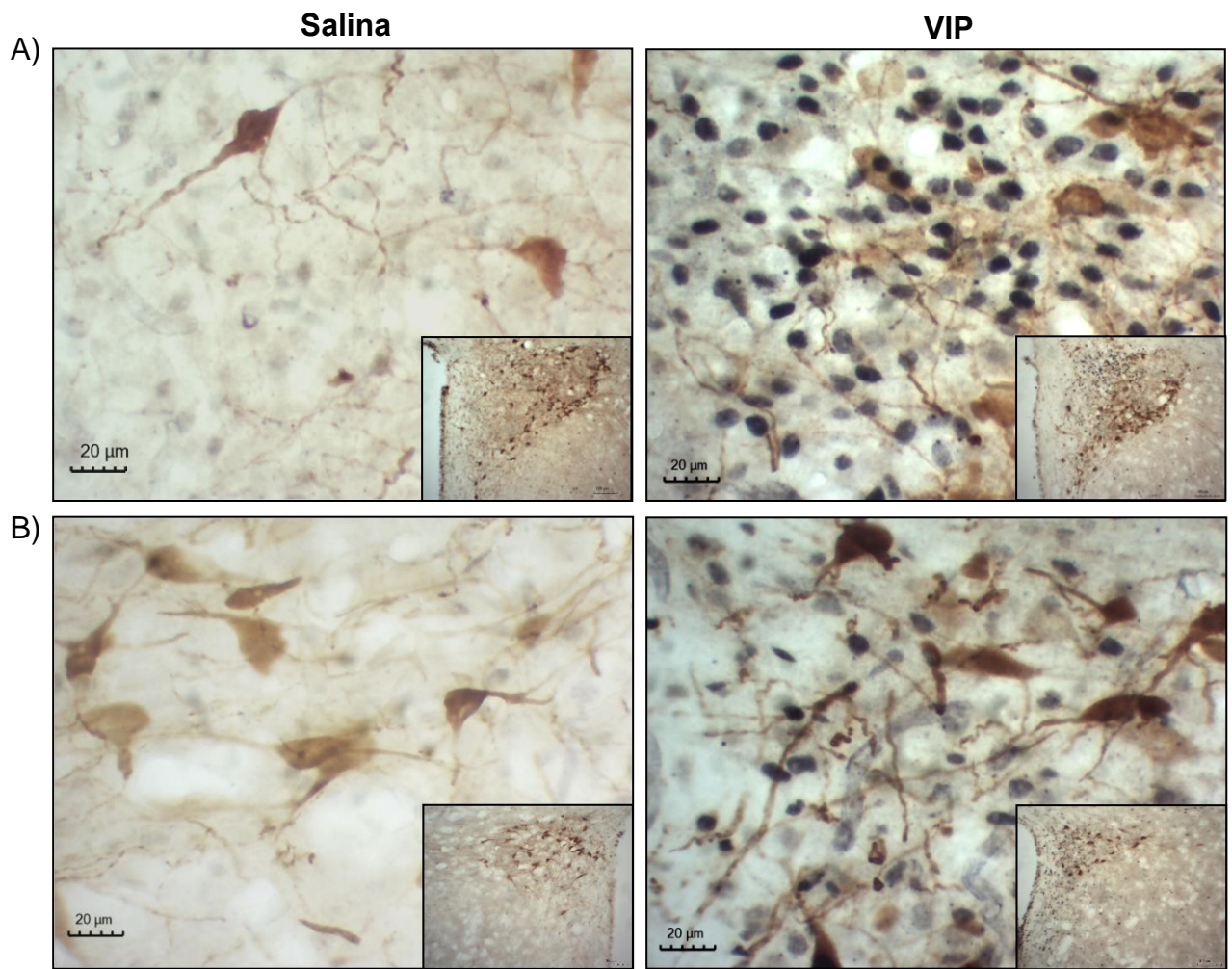


Figura 5. Fotomicrografias representativas (ampliação de 40x) de cortes coronais mostrando imunorreatividade ao FRA, nas subdivisões do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de animais tratados com microinjeção ICV de Salina (NaCl 0,9%, 6 μ L) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μ L). **(A):** região parvocelular medial (PaMP) e parvocelular ventral (PaV) do PVN; **(B):** região parvocelular posterior (PaPo) do PVN. Cada imagem menor apresenta a área em que a fotomicrografia foi tirada com ampliação de 10x.

5.2.2 Experimento 5: efeitos da microinjeção de VIP na expressão de RNAm de CRF no PVN

Os animais tratados com VIP mostraram aumento ($p < 0,05$) de 44% na expressão de RNAm de CRF no PVN quando comparados com o grupo Salina (figura 6).

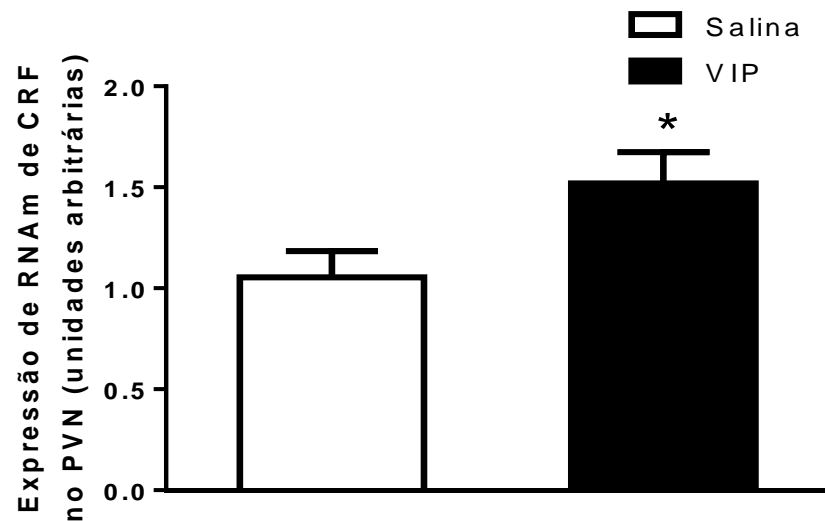


Figura 6. Expressão relativa de RNAm de CRF no PVN de animais tratados com microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μ L) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μ L). Valores expressos como média \pm EPM (n= 8-10 ratos/grupo). *p<0,05 vs. grupo Salina.

5.2.3 Experimento 6: efeitos do pré-tratamento com antagonista de CRFR1 e CRFR2 na ingestão alimentar em resposta à microinjeção de VIP

Os animais Veículo microinjetados com VIP apresentaram redução ($F(3,50) = 32,65$; $p < 0,001$) de aproximadamente 50% na ingestão alimentar, em comparação com o grupo microinjetado com Salina (figura 7A). Por outro lado, após a microinjeção de ANT (antagonista de CRFR1), a ingestão alimentar dos animais tratados com VIP não diferiu da do grupo Salina, e foi maior ($F(3,50) = 9,1$; $p = 0,004$) que a do grupo Veículo microinjetado com VIP, notando-se atenuação de 59% na inibição da ingestão alimentar induzida pelo VIP.

Diferentemente, nos animais pré-tratados com AS30 microinjetados com VIP, observou-se diminuição ($F(3,45) = 7,54$; $p = 0,009$) da ingestão alimentar em relação aos animais AS30 microinjetados com Salina, porém maior ingestão alimentar ($p < 0,05$) do que no grupo Veículo microinjetado com VIP. AS30 atenuou em 52% a inibição da ingestão alimentar induzida pelo VIP (figura 7B).

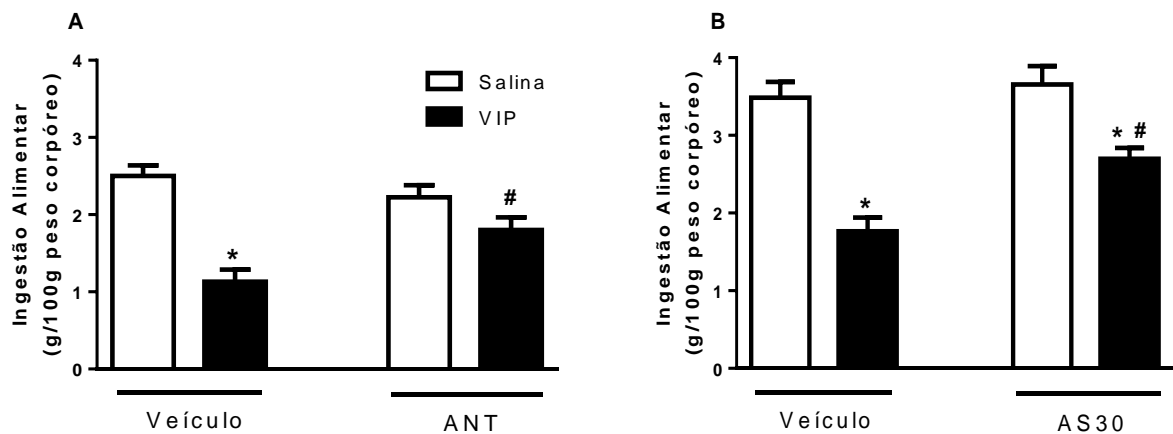


Figura 7. Ingestão alimentar (g/100 g peso corpóreo) por 120 min após microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μ L) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μ L) em animais pré-tratados com microinjeção ICV de: **(A)** veículo ou antalarmina (ANT; 0,25 μ g em 5 μ L), **(B)** veículo ou antisauvagina-30 (AS30; 5 μ g em 5 μ L). Valores expressos como média \pm EPM (n= 10-16 ratos/grupo). *p<0,05 vs. respectivo grupo Salina. #p<0,05 vs. grupo Veículo/VIP.

5.2.4 Experimento 7: efeitos do pré-tratamento com antagonista de CRFR1 e CRFR2 nos parâmetros plasmáticos em resposta à microinjeção de VIP

Em animais pré-tratados com Veículo, as concentrações plasmáticas de corticosterona apresentaram aumento ($F(3,41) = 7,47$; $p=0,01$), após a microinjeção de VIP quando comparada com a microinjeção de Salina. Entretanto, no pré-tratamento com ANT, não houve diferença nas concentrações de corticosterona entre os grupos microinjetados com Salina e VIP, e não houve diferença entre os grupos ANT e Veículo microinjetados com VIP. Em relação ao pré-tratamento com AS30, de maneira similar, não houve diferença entre as concentrações plasmáticas de corticosterona entre os grupos Salina e VIP, porém o pré-tratamento com AS30 reduziu ($F(3,41) = 7,47$; $p<0,05$) este parâmetro nos animais tratados com VIP quando comparados com o grupo Veículo microinjetados com VIP (figuras 8A e 8B).

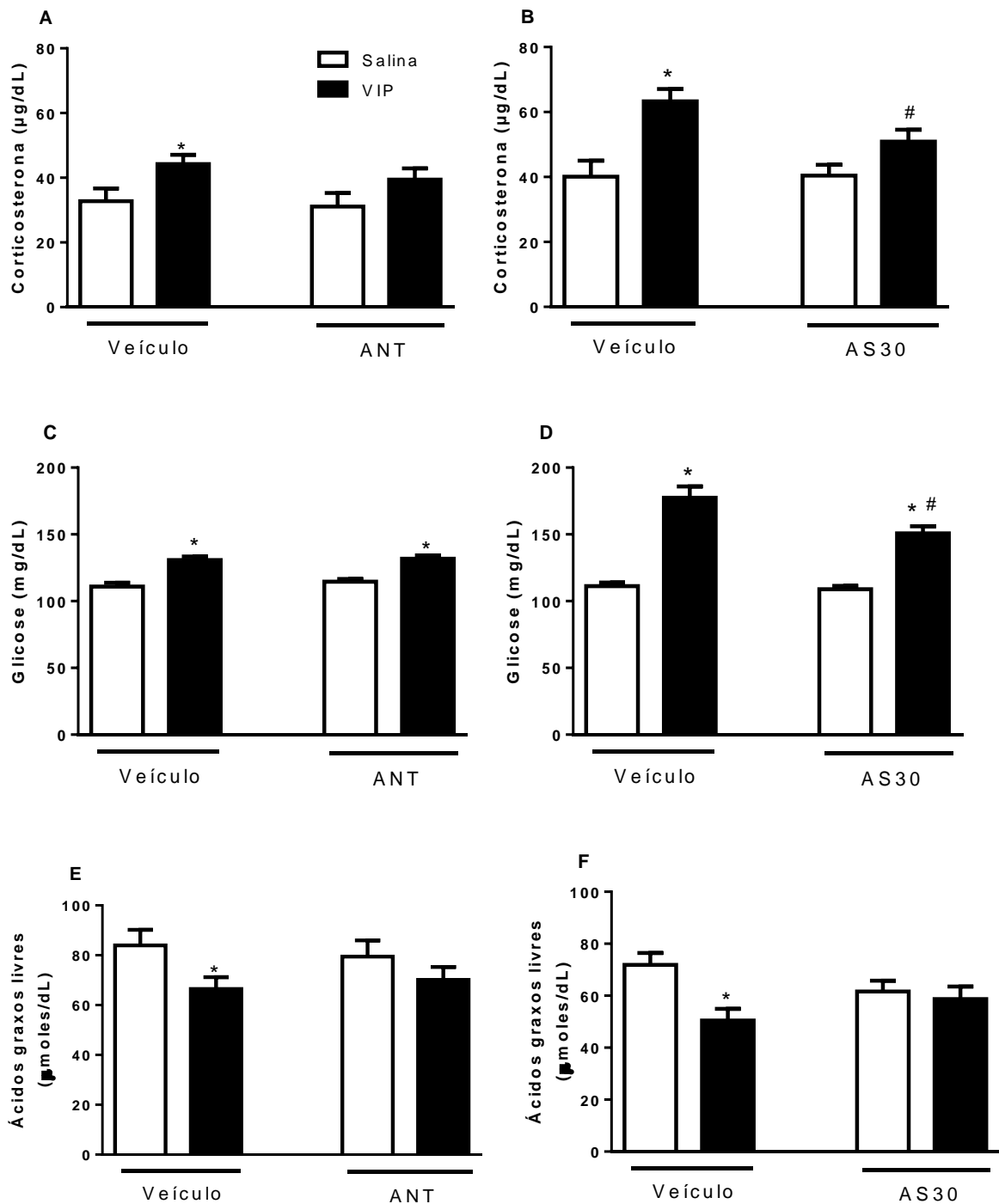


Figura 8. Concentração plasmática de: **(A e B)** corticosterona ($\mu\text{g/dL}$), **(C e D)** glicose (mg/dL), e **(E e F)** ácidos graxos livres ($\mu\text{moles/dL}$), de animais após microinjeção ICV de salina (NaCl 0,9%, 6 μL) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 40 ng/g peso corpóreo, 6 μL) em animais pré-tratados com microinjeção ICV de veículo ou antalarmina (ANT; 0,25 μg em 5 μL) ou antisauvagina-30 (AS30; 5 μg em 5 μL). Valores expressos como média \pm EPM (n= 10-16 ratos/grupo). * $p < 0,05$ vs. respectivo grupo Salina. # $p < 0,05$ vs. grupo Veículo/VIP.

Os animais que receberam a microinjeção de VIP e foram pré-tratados com Veículo apresentaram aumento ($F(3,41) = 53,0$; $p < 0,001$) nas concentrações plasmáticas de glicose (figura 8C e 8D), quando comparados com o tratamento com Salina. Da mesma maneira, após o pré-tratamento com a ANT, a microinjeção de VIP promoveu elevação ($p < 0,001$) nas concentrações plasmáticas de glicose não diferindo do grupo Veículo microinjetado com VIP. No pré-tratamento com AS30, os animais tratados com VIP também apresentaram aumento ($F(3,43) = 129,3$; $p < 0,001$) nas concentrações plasmáticas de glicose, quando comparados com o tratamento com Salina. Contudo, AS30 reduziu ($F(3,43) = 6,8$; $p = 0,012$) a glicose plasmática, em comparação com a do Veículo nos grupos tratados com o VIP.

Nos grupos pré-tratados com Veículo, a microinjeção de VIP diminuiu ($F(3,41) = 5,62$; $p < 0,02$) as concentrações de ácidos graxos livres (figura 8E e 8F) quando comparado com o grupo Salina. Porém, em animais pré-tratados com ANT e AS30 não houve diferença nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres entre os tratamentos Salina e VIP. Também não foi observada diferença em relação ao Veículo e ANT ou AS30 nos grupos tratados com VIP.

6 DISCUSSÃO

Este estudo procurou compreender os mecanismos envolvidos com os efeitos do VIP sobre a homeostase energética. O VIP é reconhecido por ser um importante sinal anorexígeno, o qual inibe a ingestão alimentar em diferentes espécies (ALMEIDA et al., 2002; TACHIBANA et al., 2003; MATSUDA et al., 2005; GHOURAB et al., 2011; MARTINS et al., 2018). Sabe-se que a microinjeção ICV de VIP promove aumento nas concentrações plasmáticas de glicose (GHOURAB et al., 2011), ACTH e corticosterona plasmática (ALEXANDER; SANDER, 1994). Estes efeitos são decorrentes da estimulação de neurônios CRF pelo VIP e de sua ação no eixo HPA (WANG et al., 1998).

Para elucidar a participação do VIP na regulação do eixo HPA, primeiramente, foram avaliados os efeitos da remoção dos glicocorticoides nas alterações induzidas pelo VIP, sendo utilizados animais adrenalectomizados com e sem reposição de corticosterona. A hipofagia promovida pelo VIP, após microinjeção no ventrículo lateral de animais do grupo *Sham*, confirma o seu efeito anorexígeno (MARTINS et al., 2018). Entretanto, nos grupos ADX e ADX+CORT, o tratamento com VIP não promoveu qualquer efeito na ingestão alimentar. A redução da ingestão alimentar após a ADX em animais tratados com salina confirma o conhecido efeito da ADX em diminuir a ingestão alimentar e o peso corpóreo (UCHOA et al., 2009a, 2010), efeito mediado pelo aumento da expressão de RNAm de CRF no PVN, devido à ausência de retroalimentação negativa dos glicocorticoides neste núcleo hipotalâmico, assim como, pelo aumento da expressão de RNAm de OT no PVN (BEYER; MATTA; SHARP, 1988; UCHOA et al., 2009b, UCHOA et al., 2010). A ADX também está associada com a redução da expressão de NPY e AgRP no ARC (UCHOA et al., 2012). Além disso, Alexander e Sander (1995a) observaram que a microinjeção de VIP no PVN estimula a secreção de ACTH e corticosterona e o pré-tratamento com antagonista inespecífico de CRF inibe estas respostas. A hipofagia induzida pelo VIP ainda pode ser mediada pela estimulação da melanocortina hipotalâmica (GHOURAB et al., 2011), enquanto o efeito anorexigênico da ADX não está associado a aumento da pró-opiomelanocortina (POMC) no ARC. Foi demonstrado que ADX reduz a expressão de RNAm de POMC (SAVONTAUS; CONWELL; WARDLAW, 2002; UCHOA et al., 2012). Dessa maneira, sugere-se que a falta da resposta anorexigênica de VIP, após a ADX, pode ser devido a estes efeitos opostos do VIP e ADX em neurônios POMC no ARC, considerando que

VIP deveria recrutar o sistema de melanocortinas, o qual está reduzido em consequência da ADX.

A reposição com glicocorticoides foi efetiva para restaurar a ingestão alimentar em animais ADX a valores semelhantes aos animais *Sham*, entretanto, o tratamento com VIP não reduziu a ingestão alimentar em animais ADX com reposição de glicocorticoides, demonstrando que suas ações dependem da presença das glândulas adrenais intactas e não apenas da presença dos glicocorticoides. Na verdade, os mineralocorticoides, outra classe de hormônios produzidos e secretados pelas glândulas adrenais, também podem ser necessários para as respostas de VIP, pois a reposição com aldosterona + corticosterona em ratos ADX foi mais efetiva em aumentar a ingestão alimentar e peso corpóreo do que apenas a reposição com corticosterona (DEVENPORT; TORRES; MURRAY, 1983; DEVENPORT; HOPKINS, 1985).

Em relação aos parâmetros plasmáticos, em animais *Sham*, foi observado aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona após a microinjeção ICV de VIP, o que corrobora dados obtidos por Alexander e Sander (1994), que demonstraram aumento da corticosterona plasmática após microinjeção de VIP no PVN de ratos. Em galináceos, a microinjeção de VIP no ventrículo lateral também promoveu aumento significativo nas concentrações plasmáticas de corticosterona (KHAN et al., 2013). Além disso, também foi observado que a microinjeção central de VIP promoveu aumento de corticosterona sugerindo que a ação do VIP seja central, por meio de neurônios CRF, pois injeção intraperitoneal de VIP não promoveu aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona (ITOH; HIROTA; KATSUURA, 1982; NAGAI et al., 1994). Em ratos adrenalectomizados, com e sem reposição de corticosterona, observou-se que os animais ADX com reposição de glicocorticoides apresentaram concentrações plasmáticas de corticosterona maiores que do grupo ADX, porém valores menores de corticosterona circulante do que os animais *Sham*. As concentrações plasmáticas de corticosterona possuem uma variação circadiana, e a reposição na água para beber faz com que haja um aumento na corticosterona plasmática no período noturno, após as luzes desligarem, fase que corresponde ao período de alimentação, o que pode ser benéfico no controle da atividade do eixo HPA (UCHOA et al., 2009b; UCHOA et al., 2010). Por outro lado, devido ao jejum anterior ao experimento e à provável diminuição na ingestão de fluidos durante este período, observou-se uma redução na concentração de corticosterona plasmática nos animais com reposição de glicocorticoide, em relação aos animais *Sham*.

A microinjeção de VIP aumentou as concentrações de glicose plasmática no grupo *Sham*, um efeito reconhecido em estudos prévios (NAGAI et al., 1994; MARTINS et al., 2018). Porém, a adrenalectomia foi capaz de prevenir o aumento da glicemia induzido pelo VIP. Inclusive, menor concentração plasmática de glicose após a ADX demonstra a importância das glândulas adrenais no controle da glicemia (KAWAI; KUZUYA, 1977; KUO et al., 2015). Martins e colaboradores (2018) demonstraram que o pré-tratamento com o antagonista do receptor de OT reduziu o aumento das concentrações plasmáticas de glicose induzido pelo VIP, sugerindo que os efeitos de VIP também podem estar relacionados a uma ativação simpática mediada por vias do PVN, onde o controle do eixo hipófise-adrenal e de neurônios ocitocinérgicos pelo PVN contribuem com a regulação da atividade simpática (YEE et al., 2016; NUNN et al., 2011). Dessa maneira, a falta de ação do VIP em aumentar a glicemia após a ADX reforça que os glicocorticoides e a ativação simpática são necessários na regulação desse parâmetro (KADEKARO; ITO; GROSS, 1988; PAQUOT et al., 1995).

A microinjeção de VIP também promoveu diminuição da concentração plasmática de ácidos graxos livres, corroborando resultados de Martins e colaboradores (2018), mas não de Richter e colaboradores (1989), que verificaram aumento da liberação de ácidos graxos livres pelo VIP, porém em experimento com tecido adiposo humano *in vitro*. A ADX atenuou a diminuição de ácidos graxos livres plasmáticos induzida pelo VIP, pois a microinjeção de VIP não alterou este parâmetro em animais ADX com ou sem reposição de corticosterona. Redução das concentrações circulantes de ácidos graxos livres após a ADX está em acordo com estudos prévios da literatura, que mostraram a importância dos glicocorticoides para a mobilização desse substrato energético (HO; MENG, 1964; KIBENGE; CHAN, 2001). Assim, a ausência de redução na concentração de ácidos graxos livres plasmáticos, induzida pelo VIP em ratos ADX, pode ser porque a microinjeção de VIP não foi capaz de potencializar a redução nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres induzidas pela ADX.

O presente estudo mostra que a ADX promove diminuição da expressão de RNAm de VPAC2 no ARC e no LHA. O receptor VPAC2 possui alta afinidade pelo VIP e pelo polipeptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária e está extensivamente distribuído no hipotálamo e expresso em diferentes núcleos (MASUO et al., 1992; SARRIEAU et al., 1994; VAUDRY et al., 2009). Foi demonstrado que o RNAm de VPAC2 é expresso em neurônios NPY (MOUNIEN et al., 2006a) e POMC (MOUNIEN et al., 2006b) do ARC. A modulação dos glicocorticoides na expressão de VPAC2 observada

neste estudo corrobora o trabalho de Wiik (1991), o qual demonstrou aumento no número de sítios de ligação para VIP em leucócitos após a exposição *in vitro* a glicocorticoides. Dessa forma, um possível mecanismo para a diminuição da hipofagia e alterações na concentração plasmática de glicose e ácidos graxos livres induzidas pelo VIP em animais ADX seja devido a menor expressão do RNAm de VPAC2 no hipotálamo após a ADX.

A condução dos experimentos deste trabalho permitiu observar a importância do eixo HPA nos efeitos de VIP e, na busca por compreender mais amplamente os mecanismos centrais envolvidos nessa sinalização, foi realizado estudo do PVN, núcleo hipotalâmico que contém os neurônios CRF. Dessa maneira, este trabalho foi o primeiro a demonstrar que a microinjeção de VIP no ventrículo lateral promove aumento na expressão do RNAm de CRF, no PVN, e também na atividade dos neurônios parvocelulares do PVN, em subdivisões com alta expressão de neurônios CRF. Esses resultados vão ao encontro dos estudos de Alexander e Sander (1995a), que observaram que a microinjeção de VIP no PVN estimula a secreção de ACTH e corticosterona e o pré-tratamento com antagonista de CRF inibe estas respostas, sugerindo que o VIP, por suas ações em neurônios CRF, medeia a ativação do eixo HPA. Por outro lado, em galináceos, a injeção ICV de VIP diminuiu a expressão de RNAm de CRF no diencéfalo, embora a injeção de VIP tenha aumentado a corticosterona plasmática, provavelmente devido à retroalimentação negativa (KHAN et al., 2013).

O aumento da expressão de RNAm de CRF e da atividade neuronal do PVN, após a microinjeção de VIP, sugerem que o CRF é um mediador central dos efeitos de VIP na homeostase energética. Por ser altamente expresso nas subdivisões do PVN avaliadas, acredita-se que a maioria dos neurônios imunorreativos a FRA sejam neurônios CRF (SAWCHENKO; SWANSON; VALE, 1984; IMAKI; VALE; SAWCHENKO, 1992; RORATO et al., 2008). Além disso, embora a expressão de RNAm possa não estar associada à síntese proteica, o aumento induzido por VIP na expressão de RNAm de CRF no PVN reforça a hipótese de que pelo menos parte desses neurônios ativados são neurônios CRF estimulados por VIP.

O CRF é reconhecido por seu importante papel no controle endócrino, autonômico e nas respostas comportamentais ao estresse (HENCKENS; DEUSSING; CHEN, 2016), sendo seus efeitos mediados por seus dois subtipos de receptores, CRFR1 e CRFR2,

os quais apresentam diferentes papéis. Para tanto, fez-se necessário compreender a participação de cada receptor nas respostas evocadas pelo VIP.

A microinjeção de VIP no ventrículo lateral promoveu hipofagia e os antagonistas do receptor de CRF, ANT e AS30, diminuíram os efeitos anorexígenos induzidos pelo VIP. Estudos sugerem que a inibição da ingestão alimentar induzida por CRF é mediada apenas por CRFR2, pois CRF inibiu igualmente a ingestão alimentar em camundongos deficientes de CRFR1 e selvagens (CONTARINO et al., 2000), e a inibição da ingestão alimentar induzida por CRF foi bloqueada por um antagonista seletivo de CRFR2, mas não pelo NBI127914, um antagonista de CRFR1 (PELLEYMOUNTER et al., 2000). Entretanto, Sekino e colaboradores (2004) demonstraram que a microinjeção ICV do antagonista de CRFR2, AS30, apenas atenuou a inibição da ingestão alimentar, e o antagonista de CRFR1, CRA1000, reduziu quase completamente a inibição da ingestão alimentar induzida pelo estresse. Injeção periférica do antagonista de CRFR1 também reduziu a hipofagia induzida pelo estresse (HOTTA et al., 1999), e camundongos *knockout* para CRFR1 não apresentaram a resposta de hipofagia e perda de peso, induzidas por urocortina, após a privação de alimentos (BRADBURY et al., 2000). Análise de tecido central e periférico para a expressão de RNAm dos receptores de CRF observou que CRFR1 é expresso na adeno-hipófise e ilhotas pancreáticas, mas sua expressão é predominante no cérebro. Por outro lado, RNAm de CRFR2 é expresso no cérebro, músculo esquelético, tecido adiposo marrom e fígado (SAKAMOTO et al., 2013). Estes dados confirmam o envolvimento de CRFR1 e CRFR2 no eixo HPA e sugerem seu envolvimento no controle da homeostase energética, central e periférica, assim como, demonstra a diversidade funcional entre esses receptores (CHOTIWAT; HARRIS, 2008). O presente estudo corrobora esses dados, pois os antagonistas dos receptores de CRFR1 e CRFR2 diminuíram a hipofagia induzida pelo VIP, sendo que o antagonista de CRFR1, ANT, demonstrou um efeito mais pronunciado. AS30 e ANT não alteraram significativamente a ingestão alimentar em ratos controle, como observado em outros estudos (HOTTA et al., 1999; SEKINO et al., 2004).

O aumento da expressão de RNAm de CRF no PVN e a ativação de ambos os receptores de CRF contribuem para a hipofagia induzida pelo VIP, indicando que o efeito anorexigênico do VIP é mediado por sua ação com auxílio de neurônios CRF no eixo HPA. Estes dados também sugerem que a falta do efeito hipofágico do VIP em ratos ADX seja porque a microinjeção de VIP não é capaz de aumentar a expressão de CRF

no PVN induzida pela ADX e, conseqüentemente, potencializar essa resposta anorexigênica.

Em relação aos parâmetros plasmáticos de animais com pré-tratamento de antagonistas de CRF, o aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona, após a microinjeção ICV de VIP no grupo Veículo, corrobora dados prévios encontrados na literatura (ALEXANDER; SANDER, 1994; KHAN et al., 2013; MARTINS et al., 2018). Estudos prévios também demonstraram que camundongos *knockout* para o receptor CRFR1 apresentaram redução de corticosterona plasmática (BRADBURY et al., 2000; SAKAMOTO et al., 2013) e o pré-tratamento com antagonista inespecífico de CRF seguido de microinjeção de VIP no PVN reduziu o aumento de ACTH e corticosterona induzido por VIP (ALEXANDER; SANDER, 1995b). Este estudo está de acordo com esta hipótese, pois o VIP não promoveu aumento da corticosterona plasmática em animais pré-tratados com os antagonistas dos receptores CRFR1 e CRFR2, sugerindo que ambos os receptores estão envolvidos com a ativação do eixo HPA pelo VIP.

A microinjeção de VIP promoveu hiperglicemia, um efeito observado em estudos anteriores (NAGAI et al., 1994; MARTINS et al., 2018). Entretanto, pré-tratamento com AS30 foi capaz de reduzir o aumento de glicose plasmática induzida pelo VIP, enquanto a ANT não alterou a hiperglicemia promovida pelo VIP. Esses efeitos indicam a participação do CRF na hiperglicemia induzida pelo VIP, especialmente através do CRFR2, conhecido por participar nos efeitos anoréxicos de CRF (VAUGHAN et al., 1995). Considerando estas ações, foi observado na região parvocelular medial do PVN alta expressão de RNAm de CRFR2, uma subdivisão que é altamente ativada em resposta ao VIP neste estudo, assim como no núcleo do trato solitário e no núcleo ventromedial do hipotálamo (CHALMERS; LOVENBERG; DE SOUZA, 1995; VAN PETT et al., 2000), enquanto a expressão do RNAm de CRFR1 é menor nessas regiões. Além disso, a microinjeção de VIP diminuiu as concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, resultado observado em trabalho prévio (MARTINS et al., 2018). Pré-tratamento com ANT ou AS30 foi capaz de atenuar os efeitos de VIP nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, pois a microinjeção de VIP não alterou este parâmetro após o pré-tratamento com estes antagonistas.

Por fim, o hipotálamo atua como um importante centro de controle da ingestão alimentar e peso corpóreo e seus diferentes núcleos estão relacionados a diferentes vias neuronais que geram respostas integradas (SCHWARTZ et al., 2000b; WOODS et al., 1998). O núcleo arqueado do hipotálamo está localizado adjacente à base do terceiro

ventrículo, o qual recebe sinalização periférica, por meio da insulina e leptina (SATO et al., 1997b). Populações neuronais distintas são responsáveis por iniciar circuitos altamente especializados no controle da homeostase energética. O NPY e o AgRP estão co-localizados em neurônios do núcleo ARC e compreendem uma via anabólica, enquanto a POMC e o CART estão co-localizados em outro conjunto adjacente de neurônios do núcleo arqueado, e iniciam uma via catabólica (ELIAS et al., 1998; HAHN et al., 1998). Neurônios CRF do PVN são inervados pelo α -MSH, um produto pós-transcricional de POMC, e CRF foi demonstrado ser um mediador anorexigênico de α -MSH (LU et al., 2003). Além disso, Ghourab e colaboradores (2011) observaram reversão da hipofagia induzida pelo VIP no pré-tratamento com antagonista de α -MSH e incubação de tecido hipotalâmico com VIP promoveu aumento na liberação de α -MSH. Também foi demonstrada a ação da OT como um mediador das respostas anorexigênicas induzidas pelo α -MSH e CRF (OLSON et al., 1991; YOSTEN; SAMSON, 2010). Como observado neste estudo, o CRF se mostra mediar diferentes efeitos de VIP em ratos, pois o bloqueio de CRFR1 e CRFR2 atenuou a hipofagia e alterou os parâmetros plasmáticos, em resposta ao VIP, sendo que, em trabalho prévio do laboratório, o pré-tratamento com o antagonista do receptor de OT (MARTINS et al., 2018) atenuou a anorexia induzida pelo VIP, sugerindo a modulação do VIP pela via α -MSH-CRF-OT.

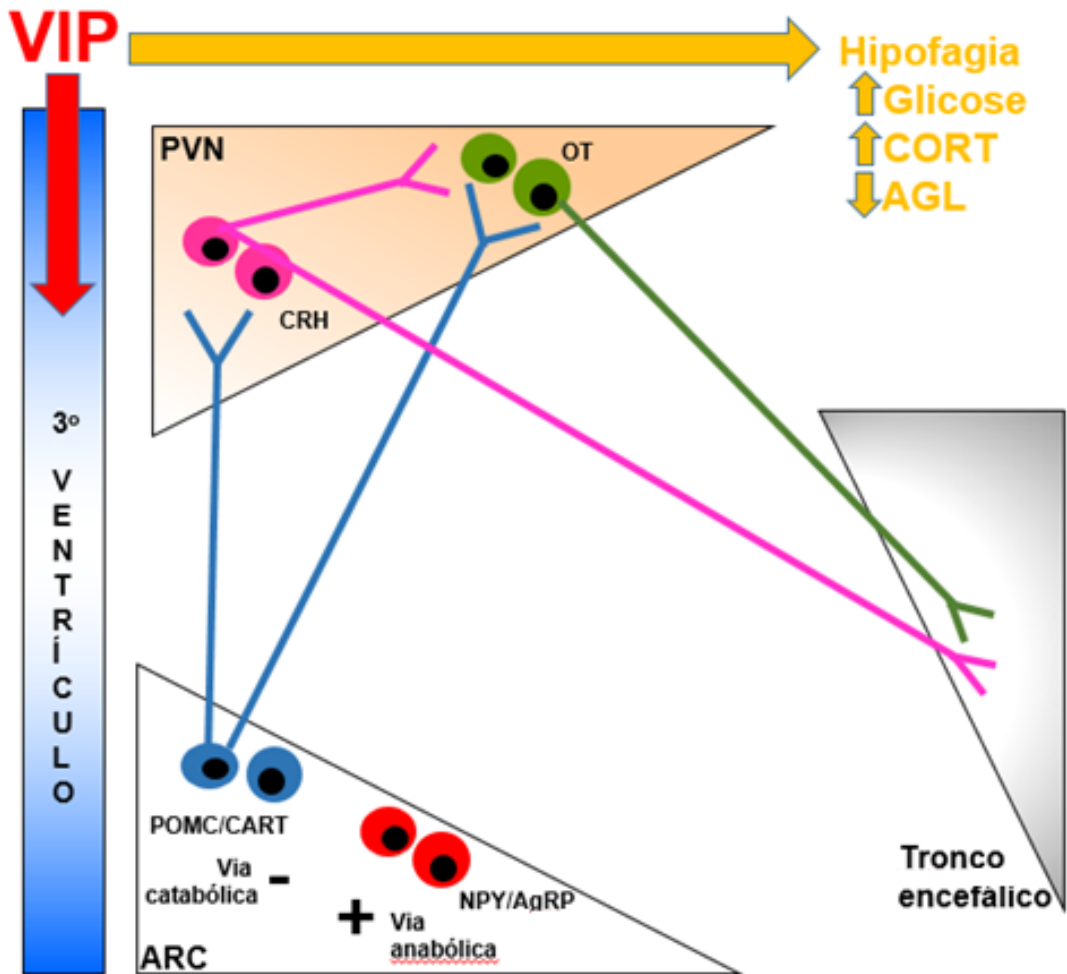


Figura 9. Desenho esquemático da interação de VIP com outros neuropeptídeos no hipotálamo. Os efeitos de VIP na homeostase energética são mediados por neurônios que expressam pró-opiomelancortina (POMC), hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e ocitocina (OT), neuropeptídeos anorexígenos. Como o CRF foi demonstrado ser um mediador dos efeitos hipofágicos do hormônio estimulante de α -melanócitos (α -MSH), um produto pós-transcricional de neurônios POMC, e a OT trata-se de um mediador das respostas anorexigênicas induzidas por α -MSH e CRF, sugere-se que o VIP modula a via α -MSH-CRF-ocitocina para reduzir a ingestão alimentar e promover alterações metabólicas plasmáticas. Modificado de Schwartz e colaboradores (2000).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, o VIP promoveu hipofagia, hiperglicemia, elevação da concentração plasmática de corticosterona e redução de ácidos graxos livres plasmáticos. A adrenalectomia atenuou a hipofagia, hiperglicemia e a redução da concentração de ácidos graxos livres plasmáticos induzidas pelo VIP, e esses efeitos estão associados a redução na expressão de RNAm de VPAC2 no ARC e LHA induzidas pela adrenalectomia.

Esses dados sugerem que as glândulas adrenais são necessárias para as alterações na ingestão alimentar e em parâmetros plasmáticos induzidas pelo VIP, e estas respostas são, pelo menos em parte, devidas à modulação dos glicocorticoides na expressão de VPAC2 no hipotálamo.

Além disso, este estudo observou que o VIP aumenta a atividade neuronal nas subdivisões parvocelular medial, ventral e posterior do PVN, assim como, a expressão de RNAm de CRF no PVN.

Foi observada a contribuição específica de cada receptor de CRF nos efeitos induzidos pelo VIP. Pré-tratamento com os antagonistas dos receptores de CRFR1 e CRFR2 foi capaz de atenuar a inibição da ingestão alimentar promovida pelo VIP, e o antagonista do receptor do tipo 1 de CRF demonstrou um efeito mais pronunciado. Ambos os antagonistas atenuaram as alterações induzidas pelo VIP nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres e corticosterona, e apenas o antagonista do receptor do tipo 2 de CRF atenuou a hiperglicemia. Esses dados mostram que o CRF é um importante mediador das respostas de VIP no balanço energético e CRFR1 e CRFR2 participam desses efeitos.

Este trabalho é o primeiro da literatura a demonstrar que a adrenalectomia promove diminuição na expressão de RNAm de VPAC2 no ARC e no LHA e a microinjeção de VIP no ventrículo lateral promove aumento na expressão do RNAm de CRF, no PVN, e na atividade dos neurônios parvocelulares do PVN.

8 CONCLUSÃO

Os efeitos induzidos pelo VIP sobre a ingestão alimentar e parâmetros plasmáticos são mediados pelo eixo HPA, sendo o CRF um importante mediador hipotalâmico dessas respostas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKABAYASHI, A.; ZAIA, C. T. B. V.; GABRIEL, S. M.; SILVA, I.; CHEUNG, W. K.; LEIBOWITZ, S. F. Intracerebroventricular Injection of dibutyryl cyclic adenosine-3',5'-monophosphate increases hypothalamic levels of neuropeptide Y. **Brain Research**, v. 660, p. 323–328, 1994.
- ALEXANDER, L. D.; SANDER, L. D. Vasoactive intestinal peptide stimulates ACTH and corticosterone release after injection into the PVN. **Regulatory Peptides**, v. 51, n. 3, p. 221–227, 1994.
- ALEXANDER, L. D.; SANDER, L. D. VIP antagonist demonstrates differences in VIP- and PHI-mediated stimulation and inhibition of ACTH and corticosterone secretion in rats. **Regulatory Peptides**, v. 59, n. 3, p. 321–333, 1995a.
- ALEXANDER, L. D.; SANDER, L. D. Involvement of vasopressin and corticotropin-releasing hormone in VIP- and PHI-induced secretion of ACTH and corticosterone. **Neuropeptides**, v. 28, n. 3, p. 167–173, 1995b.
- ALMEIDA, S. S.; DUNTAS, L. H.; DYE, L.; NUNES, M. L.; PRASAD, C.; ROCHA, J. B. T.; WAINWRIGHT, P.; ZAIA, C. T. B. V.; GUEDES, R. C. A. Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 311–320, 2002.
- ARASE, K.; YORK, D. A.; SHIMIZU, H.; SHARGILL, N.; BRAY, G. A. Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. **The American Journal of Physiology**, v. 255, n. 3 Pt 1, p. E255–E259, 1 set. 1988.
- ARLETTI, R.; BENELLI, A.; BERTOLINI, A. Influence of Oxytocin on Feeding Behavior in the Rat. **Peptides**, v. 70, p. 89–93, 1989.
- ARMSTRONG, W. E.; WARACH, S.; HATTON, G. L.; MCNEILL, T. H. Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. **Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 1931–1958, 1980.
- BELLINGER, L. L.; BERNARDIS, L. L. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies **Physiology and Behavior**, v. 76, p. 431–442, 2002.
- BEYER, H. S.; MATTA, S. G.; SHARP, B. M. Regulation of the messenger ribonucleic acid for corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and other brain sites of the rat. **Endocrinology**, v. 123, n. 4, p. 2117–2123, 1988.
- BOURET, S. G. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 2797–2805, 2004.
- BRADBURY, M. J.; MCBURNIE, M. I.; DENTON, D. A.; LEE, K.; VALE, W. W. Modulation of urocortin-induced hypophagia and weight loss by corticotropin-releasing factor receptor 1 deficiency in mice. **Endocrinology**, v. 141, n. 8, p. 2715–2724, 2000.
- BREDOW, S.; KACSÓH, B.; OBÁIL, JR. F.; FANG, J.; KRUEGER, J. M. Increase of prolactin mRNA in the rat hypothalamus after intracerebroventricular injection of VIP or

PACAP. **Brain Research**, v. 660, n. 2, p. 301–308, 1994.

BRUIJNZEEL, A. W.; CORRIE, L. W.; ROGERS, J. A.; YAMADA, H. Effects of insulin and leptin in the ventral tegmental area and arcuate hypothalamic nucleus on food intake and brain reward function in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 219, n. 2, p. 254–264, 2011.

CECCATELLI, S.; ERIKSSON, M.; HÖKFELT, T. Distribution and coexistence of corticotropin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus. **Neuroendocrinology**, v. 49, p. 309–323, 1989.

CHALMERS, D. T.; LOVENBERG, T. W.; DE SOUZA, E. B. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of The Society for Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 6340–6350, 1995.

CHOTIWAT, C.; HARRIS, R. B. S. Antagonism of specific corticotropin-releasing factor receptor subtypes selectively modifies weight loss in restrained rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 6, p. R1762–1773, 2008.

CINTRA, A.; FUXE, K.; SOLFRINI, V.; AGNATI, L. F.; TINNER, B.; WIKSTRÖM, A. C.; STAINES, W.; OKRET, S.; GUSTAFSSON, J. A. Central peptidergic neurons as targets for glucocorticoids action. evidence for the presence of glucocorticoid receptor immunoreactivity in various types of classes of peptidergic neurons. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 93–103, 1991.

CONTARINO, A.; DELLU, F.; KOOB, G. F.; SMITH, G. W.; LEE, K.; VALE, W. W.; GOLD, L. H. Dissociation of locomotor activation and suppression of food intake induced by CRF in CRFR1-deficient mice. **Endocrinology**, v. 141, n. 7, p. 2698–2702, 2000.

DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; JACOBSON, L. LEVIN, N.; CASCIO, C. S.; SHINSAKO, J. Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 512, n. 1, p. 402–414, 1987.

DE LA TREMBLAYE, P. B.; RAYMOND, J.; MIOLT, M. R.; MERALI, Z.; PLAMONDON, H. Evidence of lasting dysregulation of neuroendocrine and HPA axis function following global cerebral ischemia in male rats and the effect of Antalarmin on plasma corticosterone level. **Hormones and Behavior**, v. 65, n. 3, p. 273–284, 2014.

DEVENPORT, L. D.; G., G. K.; HOPKINS, P. M. Continuous infusion of aldosterone : correlates of body weight gain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 22, p. 707–709, 1985.

DEVENPORT, L. D.; TORRES, A.; MURRAY, C. G. Effects of aldosterone and deoxycorticosterone on food intake and body weight. **Behavioral Neuroscience**, v. 97, n. 4, p. 667–669, 1983.

EBIHARA, K.; OGAWA, Y.; KATSUURA, G.; NUMATA, Y.; MASUZAKI, H.; SATOH, N.; TAMAKI, M.; YOSHIOKA, T.; HAYASE, M.; MATSUOKA, N.; AIZAWA-ABE, M.;

YOSHIMASA, Y.; NAKAO, K. Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action. **Diabetes**, v. 48, p. 2028–2033, 1999.

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

ELMQUIST, J. K.; AHIMA, R. S.; ELIAS, C. F.; FLIER, J. S.; SAPER, C. B. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 741–746, 1998.

FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 46, p. 105–111, 1973.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763–770, 1998.

GERHOLD, L. M.; HORVATH, T. L.; FREEMAN, M. E. Vasoactive intestinal peptide fibers innervate neuroendocrine dopaminergic neurons. **Brain Research**, v. 919, n. 1, p. 48–56, 2001.

GHOUREB, S.; BEALE, K. E.; SEMJONOUS, N. M.; SIMPSON, K. A.; MARTIN, N. M.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R.; SMITH, K. L. Intracerebroventricular administration of vasoactive intestinal peptide inhibits food intake. **Regulatory Peptides**, v. 172, n. 1–3, p. 8–15, 2011.

GUILLEMIN, R.; CLAYTON, G. W.; LIPSCOMB, H. S.; SMITH, J. D. Fluorometric measurement of rat plasma and adrenal corticosterone concentration; a note on technical details. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 53, n. 5, p. 830–832, 1959.

GUTMAN, D. A.; OWENS, M. J.; SKELTON, K. H.; THRIVIKRAMAN, K. V.; NEMEROFF, C. B. The corticotropin-releasing factor 1 receptor antagonist R121919 attenuates the behavioral and endocrine responses to stress. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 2, p. 874–880, 2003.

HAHN, T. M.; BREININGER, J. F.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. **Nature Neuroscience**, v. 1, n. 4, p. 271–272, 1998.

HALFORD, J. C. G.; COOPER, G. D.; DOVEY, T. M.; ISHII, Y.; RODGERS, J.; BLUNDELL, J. E. The Psychopharmacology of appetite: targets for potential anti-obesity agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 283–310, 2003.

HAVEL, P. J. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 11, p. 963–977, 2001.

HENCKENS, M. J. A. G.; DEUSSING, J. M.; CHEN, A. Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor–urocortin system in stress. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 636–651, 2016.

HISANO, S.; KAGOTANI, Y.; TSURUO, Y.; DAIKOKU, S.; CHIHARA, K.; WHITNALL,

- M. H. Localization of glucocorticoid receptor in neuropeptide Y-containing neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. **Neuroscience Letters**, v. 95, n. 1–3, p. 13–18, 1988.
- HO, R. J.; MENG, H. C. The extracortical action of adrenocorticotrophic hormone on the elevation of plasma free fatty acids. **Metabolism**, v. 13, n. 4, p. 361–364, 1964.
- HOFFMAN, G. E.; SMITH, M. S.; VERBALIS, J. G. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 14, n. 3, p. 173–213, 1993.
- HOTTA, M.; SHIBASAKI, T.; ARAI, K.; DEMURA, H. Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates emotional stress-induced inhibition of food intake and behavioral changes in rats. **Brain Research**, v. 823, n. 1–2, p. 221–225, 1999.
- IMAKI, T.; VALE, W.; SAWCHENKO, P. E. Regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in neuroendocrine and autonomic neurons by osmotic stimulation and volume loading. **Neuroendocrinology**, v. 56, n. 5, p. 633–640, 1992.
- ITOH, S.; HIROTA, R.; KATSUURA, G. Effect of cholecystokinin octapeptide and vasoactive intestinal polypeptide on adrenocortical secretion in the rat. **Japanese Journal of Physiology**, v. 32, p. 553–560, 1982.
- JEONG, J. H.; LEE, D. K.; JO, Y. Cholinergic neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate food intake. **Molecular Metabolism**, v. 6, p. 306–312, 2017.
- JONES, P. M.; O'HALLORAN, D. J.; GHATEI, M. A.; DOMIN, J.; BLOOM, S. R. The influence of adrenal hormone status on neuroendocrine peptides in the rat anterior pituitary gland. **Journal of Endocrinology**, v. 127, p. 437–444, 1990.
- JOO, K. M.; CHUNG, Y. H.; KIM, M. K.; NAM, R. H.; LEE, B. L.; LEE, K. H.; CHA, C. I. Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 476, n. 4, p. 388–413, 2004.
- KADEKARO, M.; ITO, M.; GROSS, P. M. Local cerebral glucose utilization is increased in acutely adrenalectomized rats. **Neuroendocrinology**, v. 47, p. 329–334, 1988.
- KAWAI, A.; KUZUYA, N. On the role of glucocorticoid in glucose-induced insulin secretion. **Hormone and Metabolic Research**, v. 9, n. 5, p. 361–365, 1977.
- KHAN, M. S. I.; CLINE, M. A.; ARAMAKI, T.; UEDA, H.; TACHIBANA, T. Feeding response following central administration of chicken vasoactive intestinal peptide in chicks. **General and Comparative Endocrinology**, v. 184, p. 61–66, 2013.
- KIBENGE, M. T.; CHAN, C. B. Interactions between effects of adrenalectomy and diet on insulin secretion in fa/fa Zucker rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 79, n. 1, p. 1–7, 2001.
- KUMAR, B. A.; LEIBOWITZ, S. F. Impact of acute corticosterone administration on feeding and macronutrient self-selection patterns. **The American Journal of Physiology**, v. 254, n. 2 Pt 2, p. R222–R228, 1988.
- KUO, T.; MCQUEEN, A.; CHEN, T.; WANG, J. Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 872, p. 99–126, 2015.

LAM, K. S. L.; SRIVASTAVA, G.; TAM, S. Divergent effects of glucocorticoid on the gene expression of vasoactive intestinal peptide in the rat cerebral cortex and pituitary. **Neuroendocrinology**, v. 56, p. 32–37, 1992.

LEON-MERCADO, L.; CHAO, D. H. M.; BASUALDO, M. C.; KAWATA, M.; ESCOBAR, C.; BUIJS, R. The arcuate nucleus: a site of fast negative feedback for corticosterone secretion in male rats. **Eneuro**, v. 4, n. 1, p. e0350-16.2017 1-14, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOVENBERG, T. W.; LIAW, C. W.; GRIGORIADIS, D. E.; CLEVINGER, W.; CHALMERS, D. T.; DE SOUZA, E. B.; OLTERS DORF, T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 92, n. 3, p. 836–840, 1995.

LU, X.; BARSH, G. S.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. **The Journal of Neuroscience : The Official Journal of The Society for Neuroscience**, v. 23, n. 21, p. 7863–7872, 2003.

MAKIMURA, H.; MIZUNO, T. M.; ISODA, F.; BEASLEY, J.; SILVERSTEIN, J. H.; MOBBS, C. V. Role of glucocorticoids in mediating effects of fasting and diabetes on hypothalamic gene expression. **BMC physiology**, v. 3, p. 5, 2003.

MAKINO, S.; NISHIYAMA, M.; ASABA, K.; GOLD, P. W.; HASHIMOTO, K. Altered expression of type 2 CRH receptor mRNA in the VMH by glucocorticoids and starvation. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 4 Pt 2, p. R1138–R1145, 1998.

MARTINS, A. B., GARNICA-SIQUEIRA, M. C., ZAIA, D. A. M., ZAIA, C. T. B. V., UCHÔA, E. T. Oxytocin participates on the effects of vasoactive intestinal peptide on food intake and plasma parameters. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 437, p. 177–183, 2018.

MASUO, Y.; OHTAKI, T.; MASUDA, Y.; TSUDA, M.; FUJINO, M. Binding sites for pituitary adenyloate cyclase activating polypeptide (PACAP) commparison with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) binding site localization in rat brain sections. **Brain Research**, v. 575, p. 113–123, 1992.

MATSUDA, K.; MARUYAMA, K.; NAKAMACHI, T.; MIURA, T.; UCHIYAMA, M.; SHIODA, S. Inhibitory effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*. **Peptides**, v. 26, n. 9, p. 1611–1616, 2005.

MORLEY, J. E.; LEVINE, A. S.; GOSNELL, B. A.; KNEIP, J.; GRACE, M. Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. **American Journal of Physiology**, v. 252, p. R599–R609, 1987.

MOUNIEN, L.; BIZET, P.; BOUTELET, I.; GOURCEROL, G.; BASILLE, M.; GONZALEZ, B.; VAUDRY, H.; JEGÓU, S. Expression of PACAP receptor mRNAs by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1070, p. 457–461, 2006a.

- MOUNIEN, L.; BIZET, P.; BOUTELET, I.; GOURCEROL, G.; FOURNIER, A.; VAUDRY, H.; JÉGOU, S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide directly modulates the activity of proopiomelanocortin neurons in the rat arcuate nucleus. **Neuroscience**, v. 143, p. 155–163, 2006b.
- NAGAI, N.; KAJIKAWA, H.; SASAKI, T.; NAGAI, K.; NAKAGAWA, H. Hyperglycemic response to intracranial injection of vasoactive intestinal peptide. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 17, p. 29–34, 1994.
- NUNN, N.; WOMACK, M.; DART, C.; BARRET-JOLLEY, R. Function and pharmacology of spinally-projecting sympathetic pre-autonomic neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Current Neuropharmacology**, v. 9, n. 2, p. 262–277, 2011.
- NUSSDORFER, G. G.; MALENDOWICZ, L. K. Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Peptides**, v. 19, n. 8, p. 1443–1467, 1998.
- OLSON, B. R.; DRUTAROSKY, M. D.; STRICKER, E. M.; VERBALIS, J. G. Brain oxytocin receptors mediate corticotropin-releasing hormone-induced anorexia. **American Journal of Physiology**, v. 260, n. 2, p. 448–452, 1991.
- PALKOVITS, M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. **Brain Research**, v. 59, p. 449–450, 1973.
- PAQUOT, N.; SCHNEITER, PH.; JÉQUIER, E.; TAPPY, L. Effects of glucocorticoids and sympathomimetic agents on basal and insulin-stimulated glucose metabolism. **Clinical Physiology**, v. 15, n. 3, p. 231–240, 1995.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press, 1997.
- PELLEYMOUNTER, M. A.; JOPPA, M.; CARMOUCHE, M.; CULLEN, M. J.; BROWN, B.; MURPHY, B.; GRIGORIADIS, D. E.; LING, N.; FOSTER, A. C. Role of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in the anorexic syndrome induced by CRF. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 293, n. 3, p. 799–806, 2000.
- PRALONG, F. P.; CORDER, R.; GAILLARD, R. C. Responses of the rat pituitary-adrenal axis to hypotensive infusions of corticotropin-releasing factor, vasoactive intestinal peptide and other depressor agents. **Regulatory Peptides**, v. 32, n. 2, p. 217–226, 1991.
- RICHTER, W. O.; ROBL, H.; SCHWANDT, P. Human glucagon and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) stimulate free fatty acid release from human adipose tissue in vitro. **Peptides**, v. 10, n. 2, p. 333–5, 1989.
- RIEDIGER, T. The receptive function of hypothalamic and brainstem centres to hormonal and nutrient signals affecting energy balance. **Proceedings of The Nutrition Society**, v. 71, n. 04, p. 463–477, 2012.
- RORATO, R.; CASTRO, M.; BORGES, B. C.; BENEDETTI, M.; GERMANO, C. M. R.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. K. Adrenalectomy enhances endotoxemia-induced hypophagia: higher activation of corticotrophin-releasing-factor and proopiomelanocortin hypothalamic neurons. **Hormones and Behavior**, v. 54, n. 1, p.

134–142, 2008.

SAID, S. I.; MUTT, V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. **Science**, v. 169, p. 1217–1218, 1970.

SAINSBURY, A.; COONEY, G. J.; HERZOG, H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 16, n. 4, p. 623–637, 2002.

SAKAMOTO, R.; MATSUBARA, E.; NOMURA, M.; WANG, L.; KAWAHARA, Y.; YANASE, T.; NAWATA, H.; TAKAYANAGI, R. Roles for corticotropin-releasing factor receptor type 1 in energy homeostasis in mice. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 62, n. 12, p. 1739–1748, 2013.

SARRIEAU, A.; NAJIMI, M.; CHIGR, F.; KOPP, N.; JORDAN, D.; ROSTENE, W. Localization and developmental pattern of vasoactive intestinal polypeptide binding sites in the human hypothalamus. **Synapse**, v. 17, p. 129–140, 1994.

SATOH, N.; OGAWA, Y.; KATSUURA, G.; TSUJI, T.; MASUZAKI, H.; HIRAOKA, J.; OKAZAKI, T.; TAMAKI, M.; HAYASE, M.; YOSHIMASA, Y.; NISHI, S.; HOSODA, K.; NAKAO, K. Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH) lesioned rats: Evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 947–954, 1997a.

SATOH, N.; OGAWA, Y.; KATSUURA, G.; HAYASE, M.; TSUJI, T.; IMAGAWA, K.; YOSHIMASA, Y.; NISHI, S.; HOSODA, K.; NAKAO, K. The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. **Neuroscience Letters**, v. 224, n. 3, p. 149–152, 1997b.

SAVONTAUS, E.; CONWELL, I. M.; WARDLAW, S. L. Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. **Brain Research**, v. 958, n. 1, p. 130–138, 2002.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W.; VALE, W. W. Corticotropin-releasing factor: co-expression within distinct subsets of oxytocin-, vasopressin-, and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat. **Journal of Neuroscience**, v. 4, n. 4, p. 1118–1129, 1984.

SCHUTZBERG, M.; HOKFELT, T.; LUNDBERG, J. M.; FUXE, K.; MUTT, V.; SAID, S. Distribution of VIP neurons in the peripheral and central nervous system. **Endocrinologia Japonica**, n. 1, p. 23–30, 1980.

SCHWARTZ, G. J. Brainstem integrative function in the central nervous system control of food intake. **Forum of Nutrition**, v. 63, p. 141–151, 2010.

SCHWARTZ, M. W.; SIPOLS, A. J.; MARKS, J. L.; SANACORA, G.; WHITE, J. D.; SCHEURINK, A.; KAHN, S. E.; BASKIN, D. G.; WOODS, S. C.; FIGLEWICZ, D. P.; PORTE JR., D. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. **Endocrinology**, v. 130, n. 6, p. 3608–3616, 1992a.

SCHWARTZ, M. W.; FIGLEWICZ, D. P.; BASKIN, D. G.; WOODS, S. C.; PORTE JR., D. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. **Endocrine Reviews**, v. 13, n. 3, p. 387–414, 1992b.

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

- SEKINO, A.; OHATA, H.; MANO-OTAGIRI, A.; ARAI, K.; SHIBASAKI, T. Both corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 are involved in stress-induced inhibition of food intake in rats. **Psychopharmacology**, v. 176, n. 1, p. 30–38, 2004.
- SHEWARD, W. J.; LUTZ, E. M.; HARMAR, A. J. The distribution of vasoactive intestinal peptide₂ receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization. **Neuroscience**, v. 67, n. 2, p. 409–418, 1995.
- SIMPSON, K. A.; MARTIN, N. M.; BLOOM, S. R. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 2, p. 120–128, 2009.
- SINGRU, P. S.; SÁNCHEZ, E.; FEKETE, C.; LECHAN, R. M. Importance of melanocortin signaling in refeeding-induced neuronal activation and satiety. **Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 638–646, 2007.
- STRACK, A. M.; SEBASTIAN, R. J.; SCHWARTZ, M. W.; DALLMAN, M. F. Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. **The American Journal of Physiology**, v. 268, n. 1 Pt 2, p. R142–R149, 1995.
- TACHIBANA, T.; SAITO, S.; TOMONAGA, S.; TAKAGI, T.; SAITO, E.; BOSWELL, T.; FURUSE, M. Intracerebroventricular injection of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits feeding in chicks. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 3, p. 203–206, 2003.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v.6, p.24, 1969.
- UCHOA, E. T.; SABINO, H. A. C.; RUGINSK, S. G.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; Hypophagia induced by glucocorticoid deficiency is associated with an increased activation of satiety-related responses. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 2, p. 596–604, 2009a.
- UCHOA, E. T.; SILVA, L. E. C. M.; CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. K. Hypothalamic oxytocin neurons modulate hypophagic effect induced by adrenalectomy. **Hormones and Behavior**, v. 56, n. 5, p. 532–538, 2009b.
- UCHOA, E. T.; SILVA, L. E. C. M.; CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. K. Corticotrophin-releasing factor mediates hypophagia after adrenalectomy, increasing meal-related satiety responses. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 5, p. 714–719, 2010.
- UCHOA, E. T.; SILVA, L. E. C. M.; CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. K. Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. **Neuropeptides**, v. 46, n. 3, p. 119–124, 2012.
- UEHARA, Y.; SHIMIZU, H.; OHTANI, K.; SATO, N.; MORI, M. Hypothalamic corticotropin-releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin. **Diabetes**, v. 47, n. 6, p. 890–893, 1998.
- USDIN, T. E. D. B.; BONNER, T. O. M. I.; MEZEY, R. V. A. Two receptors for vasoactive intestinal with similar and complementary. **Endocrinology**, v. 135, n. 6, p. 2662–2680, 1994.

- VAN PETT, K.; VIAU, V.; BITTENCOURT, J. C.; CHAN, R. K. W.; LI, H.; ARIAS, C.; PRINS, G. S.; PERRIN, M.; VALE, W.; SAWCHENKO, P. E. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of bat and mouse. **Journal of Comparative Neurology**, v. 428, n. 2, p. 191–212, 2000.
- VAUDRY, D.; FALLUEL-MOREL, A.; BOURGAULT, S.; BASILLE, M.; BUREL, D.; WURTZ, O.; FOURNIER, A.; SHOW, B. K. C.; HASHIMOTO, H.; GALAS, L.; VAUDRY, H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors : 20 years after the discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 3, p. 283–357, 2009.
- VAUGHAN, J.; DONALDSON, C.; BITTENCOURT, J.; PERRIN, M. H.; LEWIS, K.; SUTTON, S.; CHAN, R.; TURNBULL, A. V.; LOVEJOY, D.; RIVIER, C.; RIVIER, J.; SAWCHENKO, P. E.; VALE, W. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. **Nature**, v. 378, p. 287–292, 1995.
- VU, J. P.; LARAUCHE, M.; FLORES, M.; LUONG, L.; NORRIS, J.; OH, S.; LIANG, L.; WASCHEK, J.; PISEGNA, J. R.; GERMANO, P. M. Regulation of appetite, body composition, and metabolic hormones by vasoactive intestinal polypeptide (VIP). **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 56, n. 2, p. 377–387, 2015.
- WANG, J.; AKABAYASHI, A.; DOURMASHKIN, J.; YU, H. J.; ALEXANDER, J. T.; CHAE, H. J.; LEIBOWITZ, S. F. Neuropeptide Y in relation to carbohydrate intake, corticosterone and dietary obesity. **Brain Research**, v. 802, n. 1–2, p. 75–88, 1998.
- WATANOBE, H.; TAMURA, T. A suppressive effect of dexamethasone (DEX) on adrenocorticotropin (ACTH) response to vasoactive intestinal peptide (VIP) in Cushing's disease: A parallel modulation by DEX of ACTH responses to VIP and corticotropin-releasing hormone. **Neuropeptides**, v. 31, n. 1, p. 35–40, 1997.
- WATANOBE, H.; TAMURA, T. Stimulation by peptide histidine methionine (PHM) of adrenocorticotropin secretion in patients with Cushing's disease: a comparison with the effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) and a study on the effect of combined administration of corticotropin-releasing hormone with PHM or VIP. **The Journal of Clinical. Endocrinology & Metabolism**, v. 78, n. 6, p. 1372–1377, 1994.
- WELKENHUYSEN, M.; KUYCK, K.; DAS, J.; SCIOT, R.; NUTTIN, B. Electrical stimulation in the lateral hypothalamus in rats in the activity-based anorexia model. **Neurosurgical focus**, v. 25, n. 1, p. E7, 2008.
- WIJK, P. Glucocorticoids upregulate the high affinity receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) human mononuclear leucocytes in vitro. **Regulatory Peptides**, v. 35, p. 19–30, 1991.
- WILLIAMS, G.; BING, C.; CAI, X. J.; HARROLD, J. A.; KING, P. J.; LIU, X. H. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: Different circuits, different purposes. **Physiology and Behavior**, v. 74, n. 4–5, p. 683–701, 2001.
- WONG, M. L.; WEBSTER, E. L.; SPOKES, H.; PHU, P.; EHRHART-BORNSTEIN, M.; BORNSTEIN, S.; PARK, C.; RICE, K. C.; CHROUSES, G. P.; LICINIO, J.; GOLD, P. W. Chronic administration of the non-peptide does not blunt hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to acute immobilization stress. **Pharmacology Letters**, v. 65, n. 4, p. 53–58, 1999.
- WOODS, S. C.; SEELEY, R. J.; PORTE JR., D.; SCHWARTZ, M. W. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. **Science**, v. 280, n. 5368, p. 1378–1383,

1998.

YEE, J. R.; KENKEL, W. M.; FRIJLING, J. L.; DODHIA, S.; ONISHI, K. G.; TOVAR, S.; SABER, M. J.; LEWIS, G. F.; LIU, W.; PORGES, S. W.; CARTER, C. S. Oxytocin promotes functional coupling between paraventricular nucleus and both sympathetic and parasympathetic cardio regulatory nuclei. **Hormones and Behavior**, v. 80, p. 82–91, 2016.

YOSTEN, G. L. C.; SAMSON, W. K. The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 6, p. 1642–1647, 2010.

ZAIA, C. T. B. V.; OLLER DO NASCIMENTO, C. M. P.; TIMO-IARIA, C.; DOLNIKOFF, M. S. Time course of insulin, corticosterone and metabolic changes in VMH lesion. **Physiology and Behavior**, v. 39, p. 707–714, 1987.

ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M.; DELATTRE, E.; DOLNIKOFF, M. S.; TIMO-IARIA, C. Effect of chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamic nucleus on blood plasma glucose, triglycerides and free fatty acids in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 42, p. 195–198, 1997.

ZAKRZEWSKA, K. E.; CUSIN, I.; STRICKER-KRONGRAD, A.; BOSS, O.; RICQUIER, D.; JEANRENAUD, B.; ROHNER-JEANRENAUD, F. Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. **Diabetes**, v. 48, n. 2, p. 365–370, 1999a.

ZAKRZEWSKA, K. E.; SAINSBURY, A.; CUSIN, I.; ROURU, J.; JEANRENAUD, B.; ROHNER-JEANRENAUD, F. Selective dependence of intracerebroventricular neuropeptide Y-elicited effects on central glucocorticoids. **Endocrinology**, v. 140, n. 7, p. 3183–3187, 1999b.

ZORRILLA, E. P.; SCHULTEIS, G.; ORMSBURY, A.; KLAASSEN, A.; LING, N.; MCCARTHY, J. R.; KOOB, G. F.; DE SOUZA, E. B. Urocortin shares the memory modulating effects of corticotropin-releasing factor (CRF): mediation by CRF 1 receptors. **Brain Research**, v. 952, p. 200–210, 2002.

10 ANEXOS

Anexo A: Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL

nº 4929.2015.80 (OF. Nº 135/2015)

nº 14371.2017.44 (OF. Nº 08/2018)



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 135/2015

Londrina, 03 de Julho de 2015.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 12 de Maio de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado “**Efeito do peptídeo intestinal vasoativo no controle da homeostase energéticas**”, registrado sob o processo CEUA nº4929.2015.80, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 420 ratos Wistar machos, pesando entre 230 e 270 g e provenientes do Biotério Central da UEL. O projeto tem como objetivo avaliar a influência do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) sobre os efeitos da microinjeção intracerebroventricular (ICV) de peptídeo intestinal vasoativo (VIP) sobre parâmetros plasmáticos, ingestão alimentar, conteúdo de NPY no hipotálamo e atividade neuronal de núcleos hipotalâmicos e núcleo do trato solitário (NTS) de ratos. Para tanto, o projeto será constituído por um total de 5 protocolos e os animais serão divididos em grupos e submetidos à estereotaxia e adrenalectomia bilateral (ADX) ou cirurgia *sham*. Após isso, serão mantidos em caixas individuais para a realização do teste dose-resposta da concentração de dexametasona para reversão dos efeitos de adrenalectomia. Os animais *sham*, ADX e ADX+DEXA receberão injeção ICV de VIP ou veículo e será avaliado o efeito da administração central de VIP sobre: parâmetros plasmáticos; ingestão alimentar; ativação neuronal no ARC, VMH e NTS; conteúdo de NPY no ARC e PVN. Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 36 meses.

Cumprе orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

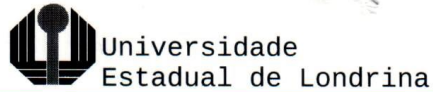
Waldiceu Aparecido Verri Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Cassia Thais Bussamra Vieira Zaia

Coordenadora do Projeto
Departamento de Ciências Fisiológicas
Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 08/2018

Londrina, 23 de janeiro de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: **"Participação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal nos efeitos do peptídeo intestinal vasoativo sobre o controle da ingestão alimentar e metabolismo energético"** protocolo nº 14371.2017.44, sob a responsabilidade de **Cássia Thais Bussamra Vieira Zaia**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **22/01/2018**.

O objetivo: avaliar o papel do eixo hipotálamo pituitária-adrenal (HPA) sobre efeitos da microinjeção intracerebroventricular (ICV) de peptídeo intestinal vasoativo (VIP) sobre parâmetros plasmáticos, ingestão alimentar e atividade neuronal de núcleos hipotalâmicos e Núcleo do trato solitário (NTS) de ratos. Grau de invasividade=3

Vigência do Projeto	31/01/2018 a 30/08/2020
Espécie/linhagem	Rato heterogêneo - Wistar
Nº de animais	420
Peso/Idade	240-280 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue e cérebro

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição, para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
Prof.ª. D.ª. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Cássia Thais Bussamra Vieira Zaia
Responsável pelo projeto
Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para o Biotério/CCB
C/C para a Chefia do Depto Ciências de Fisiológicas/CCB
C/C para a Direção de Centro/ CCB

Anexo B: Artigo da Tese aceito para publicação


Adrenalectomy impairs vasoactive intestinal peptide-induced changes
in food intake and plasma parameters

Marcela Cristina Garnica-Siqueira, Andressa Bussetti Martins,
Larissa Rugila dos Santos Stopa, Camila Franciele de Souza,
Dimas Augusto Morozin Zaia, Cristiane Mota Leite,
Cássia Thaïs Bussamra Vieira Zaia*, Ernane Torres Uchôa*

Endocrine, aceito, julho de 2019.



Adrenalectomy impairs vasoactive intestinal peptide-induced changes in food intake and plasma parameters

Marcela Cristina Garnica-Siqueira¹ · Andressa Bussetti Martins¹ · Larissa Rugila dos Stopa¹ · Camila Franciele de Souza¹ · Dimas Augusto Morozin Zaia² · Cristiane Mota Leite³ · Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia¹  · Ernane Torres Uchôa¹

Received: 23 May 2019 / Accepted: 9 July 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Purpose The aim of this study is to evaluate the effects of adrenalectomy (ADX) and glucocorticoid in the changes induced by intracerebroventricular (ICV) administration of vasoactive intestinal peptide (VIP) on food intake and plasma parameters, as well as VIP receptor subtype 2 (VPAC2) mRNA expression in different hypothalamic nuclei of male rats.

Methods Male Wistar rats (260–280 g) were subjected to ADX or sham surgery, 7 days before the experiments. Half of ADX animals received corticosterone (ADX + CORT) in the drinking water. Animals with 16 h of fasting received ICV microinjection of VIP or saline (0.9% NaCl). After 15 min: (1) animals were fed, and the amount of food ingested was quantified for 120 min; or (2) animals were euthanized and blood was collected for biochemical measurements. Determination of VPAC2 mRNA levels in LHA, ARC, and PVN was performed from animals with microinjection of saline.

Results VIP treatment promoted the anorexigenic effect, which was not observed in ADX animals. Microinjection of VIP also induced an increase in blood plasma glucose and corticosterone levels, and a reduction in free fatty acid plasma levels, but adrenalectomy abolished these effects. In addition, adrenalectomy reduced mRNA expression of VPAC2 in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus, but not in the paraventricular nucleus.

Conclusions These results suggest that adrenal glands are required for VIP-induced changes in food intake and plasma parameters, and these responses are associated with reduction in the expression of VPAC2 in the hypothalamus after adrenalectomy.

Keywords VIP · Glycemia · Corticosterone · Free fatty acids · Arcuate nucleus of the hypothalamus · VPAC2 receptor expression

Introduction

The vasoactive intestinal peptide (VIP) is a 28-amino acid neuropeptide widely expressed in the nervous system and belongs to the family of regulatory peptides, glucagon–secretin. Neurons expressing VIP are distributed in the central nervous system (CNS), such as the cortex, hippocampus, amygdaloid nucleus, thalamus, and hypothalamus [1]. VIP actions are mediated by specific receptors that are coupled to adenylyl cyclase to increase intracellular cAMP [1, 2]. There are two VIP receptor subtypes, VPAC1, widely distributed in the CNS, most abundantly expressed in the hippocampus and cortex, and to a lesser extent in the hypothalamus [3], and VPAC2, expressed in the thalamus, hypothalamus, brainstem, and amygdala [4]. In the hypothalamus, VPAC2 is found in the supraoptic nucleus, supraoptic nucleus, arcuate nucleus (ARC), parvocellular region of the

* Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia
ctbvzaia@uel.br

* Ernane Torres Uchôa
ernane_uchoa@yahoo.com.br
euchoa@uel.br

¹ Laboratory of Neuroendocrine Physiology and Metabolism, Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

² Department of Chemistry, Laboratory of Prebiotic Chemistry, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

³ Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR, Brazil

paraventricular nucleus (PVN), lateral hypothalamic area (LHA), and anterior pituitary [3–6], areas associated with neuroendocrine functions in the CNS [7].

Intracerebroventricular (ICV) microinjection of VIP in rats promotes an increase in glucose plasma concentrations and a decrease in food intake [8, 9], as well as increased in plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone in a dose-dependent manner, indicating that VIP regulates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA) [10, 11].

Bilateral adrenalectomy (ADX) decreases food intake and body weight, whereas CORT replacement was demonstrated to stimulate food intake [12–14] and to attenuate increases in ACTH secretion and corticotrophin-releasing factor (CRF) expression in the PVN [15, 16], where glucocorticoid receptors are highly expressed [17]. Ceccatelli et al. [18] recognized co-localization of VIP and CRF in PVN parvocellular neurons of rats, and an increase in VIP expression was observed in the pituitary gland after ADX, while treatment with dexamethasone abolished this effect [19, 20].

As both VIP and glucocorticoids are involved in the control of food intake, VIP activates the HPA axis and glucocorticoids are known to induce hyperglycemia; the present study was designed to evaluate the effects of the presence or absence of glucocorticoids on ICV administration of VIP-induced changes on food intake, glucose, free fatty acids (FFA), and corticosterone plasma levels, as well as the VPAC2 mRNA expression in different hypothalamic nuclei after ADX.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats weighing 260–280 g (total number of animals = 130), from the Central Animal Care Facility of the State University of Londrina (UEL), were housed in cages in a temperature-controlled room at 22 ± 2 °C, and kept on a 12:12-h light–dark cycle with lights on at 6:00 a. m. Animals had ad libitum access to pelleted rat chow and water, unless otherwise specified. To improve adaptation to the laboratory environment, rats were handled daily before experiments. All experimental procedures were conducted between 7:00 a.m. and 12:00 p.m. and were approved by local Ethics Commission on the Use of Animals of UEL (protocol number 14371201744).

Bilateral ADX and sham surgeries were performed with an association of ketamine (K, 100 mg/kg, Agener União, 10%) and xylazine hydrochloride (X, 20 mg/kg, Anasedan®, Vetbrands, Jacareí, Brazil, 2%) intraperitoneally, via single dorsal midline incision on the skin and a bilateral small cut through the muscle layer. After the surgery and during all the experimental periods, ADX animals were given 0.9%

saline with 0.5% ethanol, without glucocorticoid (ADX) or with glucocorticoid (corticosterone, Sigma Co., CA) at the concentration of 25 mg/L (ADX + CORT). Sham-operated animals underwent similar surgical procedures without removal of adrenal glands and were given tap water with 0.5% ethanol to drink. To ensure completeness of ADX surgery and adequacy of glucocorticoid replacement, corticosterone plasma level was determined by a fluorometric method of Guillemín et al. [21].

Intracerebroventricular (ICV) surgery

Animals were anesthetized with an intraperitoneal K + X injection, placed in a stereotaxic instrument (David Kopf Instruments, model 900) with bregma and lambda in the same horizontal plane. A stainless-steel guide cannula (0.7 mm external diameter, 0.4 mm internal diameter, and 10 mm length) was implanted in the right lateral ventricle, according to Paxinos and Watson's [22] atlas coordinates: 0.8 mm caudal to bregma, 3.6 mm below the skullcap, and Microdissections of LHA, ARC, and PVN were obtained using a stainless punch needle 1.5 mm in diameter from coronal sections (1200 μ m), in a cryostat according to coordinates from -0.92 to -2.12 for PVN and -2.12 to -3.32 for LHA and ARC, from bregma. Total RNA was isolated from each micropunched hypothalamic tissue sample using Trizol reagent (Invitrogen®, New Zealand) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration in each sample was determined using Multi-detection micro plate reader (Synergy HT, BioTek), and 500 ng of RNA was used for cDNA synthesis using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Quantitative real-time PCR was performed using Applied Biosystems 7500 real-time PCR system. The TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) used in this study was Rn 00568267_m1 (VPAC2). Each

1.5 mm lateral to the sagittal suture. A cannula was fixed to the cranium, using dental acrylic resin and two jeweller's screws. Within the implanted cannula, a 30-gauge metal obturator filled the cannula, except during the injections. After surgery, rats received a prophylactic dose of antibiotic (50,000 units of penicillin G: 0.1 mL per 100 g of body weight, intramuscularly) and paracetamol (200 mg/kg, orally). Animals were kept in collective cages containing a maximum of three animals, for better surgery recovery. Three days before the experiment, they were accommodated in individual cages for adaptation. Cannula placement was verified in all groups by sectioning the brain in a cryostat at the end of the experiment.

Microdissection, total RNA isolation, and quantitative real-time PCR

PCR reaction was performed in duplicate. Water (instead of cDNA) was used as negative control. Housekeeping gene, beta actin, was run for each cDNA sample. Determination of gene transcript levels in each sample was obtained by the CT method. For each sample, the threshold cycle (Ct) was determined and normalized to Ct of the housekeeping gene ($Ct = Ct_{Unknown} - Ct_{Housekeepinggene}$). Fold-change of mRNA expression in unknown sample relative to control group was calculated as 2^{-Ct} , where $Ct = Ct_{Unknown} - Ct_{Control}$ [23]. Data are shown as mRNA expression relative to control group (Sham).

Experimental protocols

All animals were subjected both to Sham or ADX surgery and ICV surgery. After 6 days of recovery, they were fasted for 16 h, and on seventh day after surgery, experimental tests were performed.

The drug ICV microinjected for experiments was VIP (Sigma Co., CA; dose of 40 ng/g body weight: 2.7–3.4 nmol of VIP for 220–280 g body weight) in 6 μ L microinjected in 1 min, and sterile saline (0.9% NaCl, 6 μ L in 1 min) was microinjected as a vehicle. The dose of VIP was chosen based on different works from literature [8–10, 24].

Experiment 1: effects of microinjection with VIP on food intake in Sham, ADX, and ADX + CORT animals

Animals received ICV microinjection of VIP or Saline. After 15 min, all animals had access to food (50 g) and food intake was quantified (g/100 g body weight) after 120 min.

Experiment 2: effects of microinjection with VIP on plasma parameters in Sham, ADX, and ADX + CORT animals

Animals received ICV microinjection of VIP or Saline. After 15 min, all animals were decapitated, and trunk blood was collected in heparinized tubes and centrifuged at $14,000 \times g$ for 20 min. Blood plasma was stored at $-20^\circ C$ and used for biochemical dosages of glucose by spectrophotometric determination based on peroxidase reaction [25] using the BioLiquid Glucose Commercial Kit (Laborclin, PR, Brazil), corticosterone (modified fluorometric method of Guillemain et al. [21]), and FFA (modified spectrophotometric method of Falholt et al. [26]).

Experiment 3: effects of ADX and glucocorticoid replacement on mRNA expression of VPAC2 in the LHA, PVN, and ARC

Fasted Sham, ADX, and ADX + CORT were decapitated 7 days after surgery, and brains were collected under RNase-free conditions, immediately frozen on dry ice, and

stored at $-80^\circ C$ for determination of VPAC2 mRNA levels in LHA, ARC, and PVN.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Normal distribution and homogeneity of data were tested. One-way ANOVA was performed to evaluate the differences among Sham, ADX, and ADX + CORT groups on VPAC2 mRNA expression in LHA, PVN, and ARC (experiment 3). Two-way ANOVA, followed by Student Newman–Keuls post hoc test, was performed to evaluate the interaction between the variable group (according to the presence or absence of glucocorticoids—Sham, ADX, or ADX + CORT) and the variable treatment (Saline or VIP) on food intake and plasma parameters (experiments 1 and 2). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Experiment 1: effects of microinjection with VIP on food intake in Sham, ADX, and ADX + CORT animals

In Sham groups, VIP treatment showed reduction ($P < 0.001$) of about 60% in food intake compared with Saline treatment, but food intake of VIP did not differ from Saline in ADX and ADX + CORT groups. In saline-treated animals, the ADX group showed reduced ($P = 0.04$) food intake compared with the Sham group, while food intake of the ADX + CORT group did not differ from Sham and ADX (Fig. 1). In VIP-treated animals, there was no difference among the three experimental groups. There was an

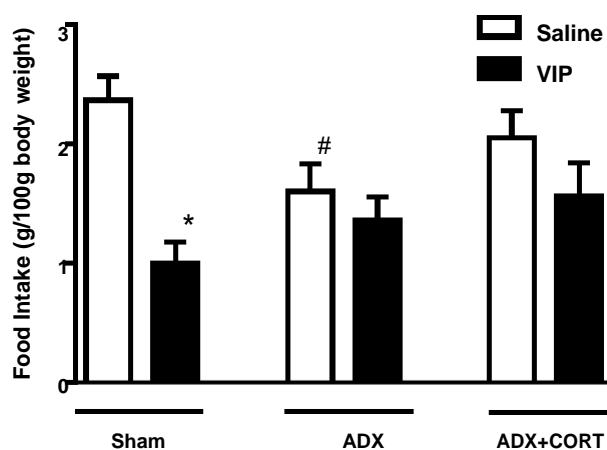


Fig. 1 Food intake (g/100 g of body weight) for 120 min of Sham, ADX, and ADX + CORT groups after ICV microinjection of saline (0.9% NaCl, 6 μ L in 1 min) or vasoactive intestinal peptide (VIP; 40 ng/g body weight, 6 μ L in 1 min). Data are shown as means \pm SEM ($n = 9$ –13 rats/group). * $P < 0.001$ vs. the respective Saline group. # $P = 0.04$ vs. Sham/Saline group

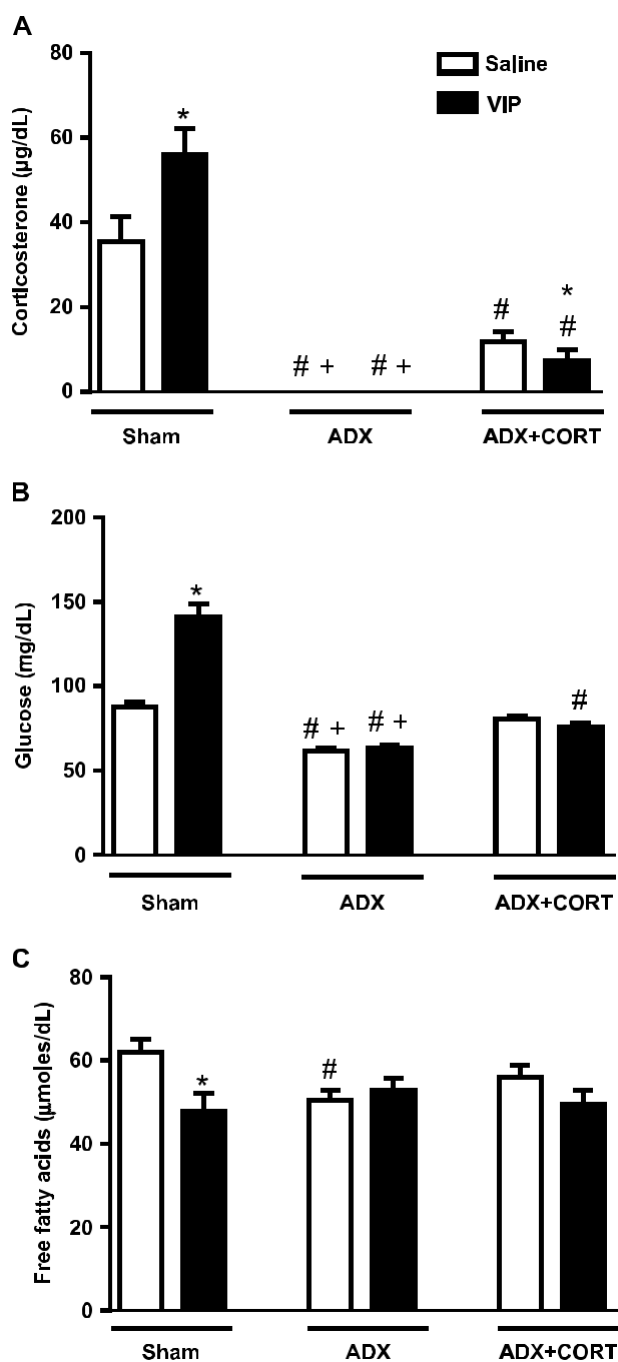


Fig. 2 Blood plasma concentration of corticosterone ($\mu\text{g/dL}$) (a), glucose (mg/dL) (b), and free fatty acids ($\mu\text{mole/dL}$) (c) of Sham, ADX, and ADX + CORT groups after ICV microinjection of saline (0.9% NaCl, 6 μL in 1 min) or vasoactive intestinal peptide (VIP; 40 ng/g body weight, 6 μL in 1 min). Data are shown as means \pm SEM ($n = 8\text{--}13$ rats/group). * $P < 0.001$ vs. the respective Saline group. # $P < 0.05$ vs. the respective Sham. + $P < 0.001$ vs. the respective ADX + CORT

interaction between group (Sham, ADX, or ADX + CORT) and treatment (Saline or VIP) on food intake [$F(5,63) = 3.6$, $P < 0.05$]. We observed no effect of group [$F(5,63) = 1.13$, $P = 0.33$] on food intake, with an effect of treatment [$F(5,63) = 15.08$, $P < 0.001$].

Experiment 2: effects of microinjection with VIP on plasma parameters in Sham, ADX, and ADX + CORT animals

In Sham group, VIP treatment induced an increase ($P < 0.001$) in corticosterone plasma levels compared to Saline, while in ADX + CORT group VIP reduced ($P < 0.05$) corticosterone plasma levels. In animals treated with both Saline and VIP, corticosterone plasma concentrations were higher in the Sham group than in ADX + CORT. The ADX group did not show detectable concentrations of plasma corticosterone (Fig. 2a), confirming the effectiveness of the surgery. There was an interaction between group (Sham, ADX, or ADX + CORT) and treatment (Saline or VIP) on corticosterone plasma levels [$F(5,63) = 6.5$, $P = 0.003$]. We observed an effect of group [$F(5,63) = 230.4$, $P < 0.001$] on corticosterone plasma levels, with no effect of treatment [$F(5,63) = 0.107$, $P = 0.75$].

VIP microinjection induced an increase ($P < 0.001$) in glucose plasma levels (Fig. 2b) in the Sham group when compared with Saline microinjection, while VIP treatment did not promote any change in ADX and ADX + CORT groups. In Saline-treated animals, ADX group had lower glucose plasma values ($P < 0.001$) than Sham and ADX + CORT groups, and in VIP-treated animals, ADX and ADX + CORT groups showed reduced glycemia ($P < 0.05$) compared with the Sham group. There was an interaction between group (Sham, ADX, or ADX + CORT) and treatment (Saline or VIP) on glucose plasma levels [$F(5,63) = 46.4$, $P < 0.001$]. We observed an effect of group [$F(5,63) = 132.2$, $P < 0.001$] and treatment [$F(3,63) = 41.6$, $P < 0.001$] on glucose plasma levels.

FFA plasma concentrations (Fig. 2c) were decreased ($P = 0.003$) by VIP microinjection in the Sham group. Nevertheless, in ADX and ADX + CORT groups, there was no difference between Saline and VIP treatments. In addition, ADX decreased ($P < 0.050$) FFA plasma concentrations in Saline-microinjected animals, and no difference was observed among Sham, ADX, and ADX + CORT groups in VIP-microinjected animals. There was an interaction between group (Sham, ADX, or ADX + CORT) and treatment (Saline or VIP) on FFA plasma levels [$F(5,63) = 6.5$, $P < 0.05$]. We observed no effect of group [$F(5,63) = 0.54$, $P = 0.588$] on FFA plasma levels, with an effect of treatment [$F(5,63) = 5.25$, $P = 0.03$].

Experiment 3: effects of ADX and glucocorticoid replacement on mRNA expression of VPAC2 in the LHA, ARC, and PVN

ADX and ADX + CORT groups showed a reduction in VPAC2 mRNA expression in the LHA [$F(2,31) = 7.8$, $P =$

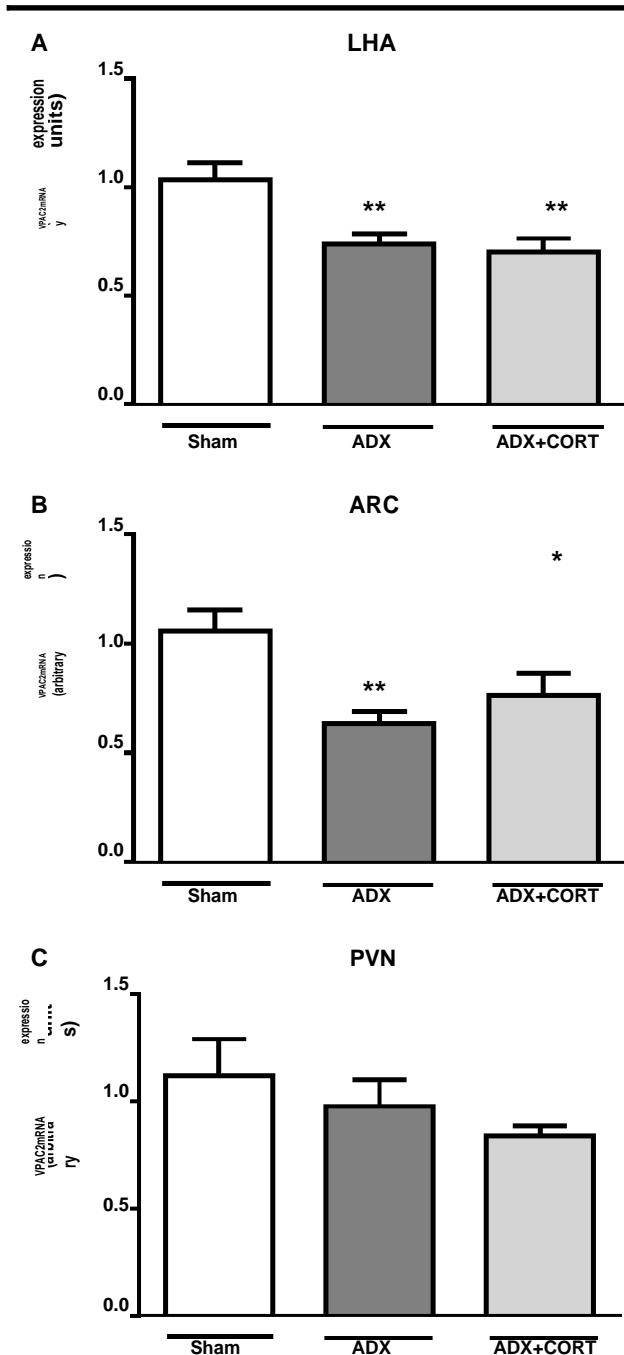


Fig. 3 Relative VIP receptor type 2 (VPAC2) mRNA expression in the lateral hypothalamic area (LHA; **a**), arcuate nucleus (ARC; **b**), and paraventricular nucleus (PVN; **c**) of Sham, ADX, and ADX + CORT groups treated with ICV microinjection of saline (0.9% NaCl, 6 μ L in 1 min). Data are shown as mean \pm SEM ($n = 9$ – 13 rats/group). * $P < 0.05$ vs. Sham group. ** $P = 0.008$ vs. Sham group

0.002] and ARC [$F(2,31) = 5.6$, $P = 0.008$] compared with the Sham group (Fig. 3a, b). In PVN, there was no difference in VPAC2 mRNA expression among Sham, ADX, and ADX + CORT groups (Fig. 3c).

Discussion

The present study investigated the effects of ADX and glucocorticoid replacement on VIP-induced changes on food intake and plasma parameters of rats. Further, VPAC2 mRNA expression in LHA, ARC, and PVN was also investigated in Sham, ADX, and ADX + CORT animals. VIP treatment reduced food intake and promoted changes in plasma parameters, but adrenalectomy was shown to abol-

adrenalectomized animals. In addition, adrenalectomy reduced mRNA expression of VPAC2 in LHA and ARC but not in PVN.

To evaluate the effect of glucocorticoid removal on VIP-induced changes, ADX rats with and without corticosterone replacement in drinking fluid were used. Corticosterone plasma levels have a circadian variation, and replacement in the drinking water results in increase of plasma corticosterone after lights off, corresponding to the feeding period, which could benefit the control of HPA axis activity [14, 27]. As expected, both groups showed higher values of plasma corticosterone than the ADX group, but a lower plasma concentration of corticosterone in the ADX + CORT group than the Sham group is probably because animals were fasted prior to the experiment and consequently ingested less fluid during this period [14]. In addition, increased corticosterone plasma levels after ICV microinjection of VIP in Sham animals corroborate the previous data in the literature [9, 28, 29], as well as Alexander and Sander [10], who observed an increase in plasma corticosterone after microinjection of VIP in PVN of rats.

Hypophagia promoted by microinjection of VIP in the lateral ventricle of Sham group corroborates the established anorexigenic effect of VIP, as observed by reduction of food intake after VIP microinjection in different species [8, 9, 24, 30, 31]. The reduction of food intake after ADX in Saline-treated animals is in accordance with the well-known effect of ADX to decrease food intake and body weight [14, 27], which is mediated by an increase of CRF mRNA expression in the PVN, due to the absence of negative feedback of glucocorticoids in this hypothalamic nucleus, as well as by enhancement of oxytocin mRNA expression in the PVN [27, 32, 33]. In addition, ADX is also associated with reduced expression of neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein in the ARC [34]. Besides that, Alexander and Sander [35] observed that microinjection of VIP in the PVN stimulates the secretion of ACTH and corticosterone, and pretreatment with CRF antagonist inhibits these responses. Previous work from our group showed that ICV microinjection of VIP promotes increase on CRF mRNA expression in PVN and that activation of both CRF receptors contribute to VIP-induced hypophagia [29],

indicating that the anorexigenic effect of VIP is mediated by its action through CRF neurons in the PVN. Overall, these data suggest that lack of VIP-induced reduction of food intake in ADX rats is likely because VIP microinjection may not be able to further increment CRF expression in the PVN induced by ADX and consequently potentiate this anorexigenic response. In addition to this, VIP-induced hypophagia seems to be mediated by stimulation of hypo-thalamic melanocortin, while anorexigenic effect of ADX is not associated with increases in proopiomelanocortin (POMC) in the ARC, where, in fact, ADX reduces POMC mRNA expression [34, 36]. Accordingly, it is possible that the absence of anorexigenic response of VIP after ADX may also be ascribed to these opposite effects of VIP and ADX on POMC neurons in ARC, since VIP would have to recruit melanocortin system downregulated by ADX. Though glucocorticoid replacement was effective in restoring food intake of ADX to similar values of Sham animals, the absence of VIP-induced reduction in food intake of ADX animals with glucocorticoid replacement suggests that VIP actions on food intake depends on the intact adrenal glands, not only the presence of glucocorticoids. Regarding plasma parameters, increased glucose plasma concentrations in the Sham group after microinjection of VIP is a well-known effect observed in previous studies [9, 29, 37]. In addition, lower values of glucose plasma levels after ADX demonstrate the importance of adrenal glands to control glucose levels [38, 39]. Accordingly, impairment of VIP to increase glycemia after ADX reinforces that glucocorticoids and sympathetic activation are required for the regulation of this parameter [40, 41]. Furthermore, reduced FFA plasma concentrations induced by VIP microinjection have also been observed in previous works [9, 29], and decreased values of circulating FFA after ADX are in accordance with previous works in the literature, which showed that glucocorticoids are important for mobilization of this energy substrate [42, 43]. As observed for food intake, the lack of effects of VIP on FFA may be due to the fact that VIP can not potentiate ADX-induced reduction on FFA plasma levels.

It is known that bilateral adrenalectomy in rodents is a well-established experimental model to investigate the mechanisms underlying classical symptoms observed in primary adrenal insufficiency in humans, such as hypophagia and loss of body weight [14, 33, 44, 45]. Concerning VIP, due to methodological limitations, human studies focus on the evaluation of VIP concentrations in the periphery than in the CNS after any challenge [46–51]. It should be noted that, as far as we know, there is no study in the literature that evaluated the interaction between adrenal glands and VIP effects, both in rodents and humans. Thus, the present study was the first to demonstrate that adrenalectomy promoted a decrease in mRNA expression of

VPAC2 in ARC and LHA. VPAC2, a receptor that has a high affinity for VIP and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, is extensively distributed in the hypothalamus and expressed in different nuclei [52–54]. It was demonstrated that VPAC2 mRNA is expressed in proopiomelanocortin (POMC) [55] and NPY [56] neurons of the ARC. In accordance with this, the modulation of glucocorticoids on VPAC2 expression obtained in the current study may be supported by the work of Wiik [57], which demonstrated an increase in the number of binding sites for VIP after in vitro exposure of leukocytes to glucocorticoids. Thus, impairment of VIP-induced hypophagia and changes in glucose and FFA plasma levels in ADX animals is associated with lower expression of VPAC2 mRNA in the hypothalamus after adrenalectomy.

In summary, it is noteworthy in the present study that adrenalectomy impairs VIP-induced hypophagia, hyperglycemia, and reduction of FFA plasma levels, and these effects are associated with the reduction of VPAC2 mRNA expression in ARC and LHA induced by adrenalectomy. These data suggest that adrenal glands are required for VIP-induced changes on food intake and plasma parameters, and this response seems to be, at least in part, due to the modulation of glucocorticoids in the expression of VPAC2 in the hypothalamus.

Funding We would like to thank the financial support of Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Brasil, for the grants (protocol numbers 23275, 8277, and 24732). MCGS thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for PhD fellowship.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the local Ethics Commission on the Use of Animals of UEL (protocol number 14371201744).

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

References

1. A.J. Harmar, J. Fahrenkrug, I. Gozes, M. Laburthe, V. May, J.R. Pisegna, D. Vaudry, H. Vaudry, J.A. Waschek, S.I. Said, Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR Review 1. *Br. J. Pharmacol.* 166, 4–17 (2012)
2. E.M. Lutz, S. Mendelson, K. West, R. Mitchell, A.J. Harmar, Molecular characterisation of novel receptors for PACAP and VIP. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 83S (1995)
3. K.M. Joo, Y.H. Chung, M.K. Kim, R.H. Nam, B.L. Lee, K.H. Lee, C.I. Cha, Distribution of vasoactive intestinal peptide and

- pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **476**, 388–413 (2004)
4. W.J. Sheward, E.M. Lutz, A.J. Harmar, The distribution of vasoactive intestinal peptide2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization. *Neuroscience* **67**, 409–418 (1995)
 5. L.M. Gerhold, T.L. Horvath, M.E. Freeman, Vasoactive intestinal peptide fibers innervate neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res.* **919**, 48–56 (2001)
 6. D. Vaudry, B.J. Gonzalez, M. Basille, L. Yon, A. Fournier, H. Vaudry, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* **52**, 269–324 (2000)
 7. T.B. Usdin, T.I. Bonner, E. Mezey, Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar and complementary distributions. *Endocrinology* **135**, 2662–2680 (1994)
 8. S. Ghourab, K.E. Beale, N.M. Semjonous, K.A. Simpson, N.M. Martin, M.A. Ghatei, S.R. Bloom, K.L. Smith, Intracerebroventricular administration of vasoactive intestinal peptide inhibits food intake. *Regul. Pept.* **172**, 8–15 (2011)
 9. A.B. Martins, M.C. Garnica-Siqueira, D.A.M. Zaia, C.T.B.V. Zaia, E.T. Uchoa, Oxytocin participates on the effects of vasoactive intestinal peptide on food intake and plasma parameters. *Mol. Cell. Biochem.* **437**, 177–183 (2018)
 10. L.D. Alexander, L.D. Sander, Vasoactive intestinal peptide stimulates ACTH and corticosterone release after injection into the PVN. *Regul. Pept.* **51**, 221–227 (1994)
 11. J. Wang, A. Akabayashi, J. Dourmashkin, H.J. Yu, J.T. Alexander, H.J. Chae, S.F. Leibowitz, Neuropeptide Y in relation to carbohydrate intake, corticosterone and dietary obesity. *Brain Res.* **802**, 75–88 (1998)
 12. B.A. Kumar, S.F. Leibowitz, Impact of acute corticosterone administration on feeding and macronutrient self-selection patterns. *Am. J. Physiol.* **254**, R222–R228 (1988)
 13. A.M. Strack, R.J. Sebastian, M.W. Schwartz, M.F. Dallman, Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am. J. Physiol.* **268**, R142–R149 (1995)
 14. E.T. Uchoa, H.A.C. Sabino, S.G. Ruginsk, J. Antunes-Rodrigues, L.L.K. Elias, Hypophagia induced by glucocorticoid deficiency is associated with an increased activation of satiety-related respon-ses. *J. Appl. Physiol.* **106**, 596–604 (2009)
 15. A. Akabayashi, C.T.B.V. Zaia, S.M. Gabriel, I. Silva, W.K. Cheung, S.F. Leibowitz, Intracerebroventricular Injection of dibutylryl cyclic adenosine-3',5'-monophosphate increases hypothalamic levels of neuropeptide Y. *Brain Res.* **660**, 323–328 (1994)
 16. M.F. Dallman, S.F. Akana, L. Jacobson, N. Levin, C.S. Cascio, J. Shinsako, Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **512**, 402–414 (1987)
 17. M. Aronsson, K. Fuxe, Y. Dong, L.F. Agnati, S. Okret, J.A. Gustafsson, Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 9331–9335 (1988)
 18. S. Ceccatelli, M. Eriksson, T. Hökfelt, Distribution and coexistence of corticotropin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* **49**, 309–323 (1989)
 19. P.M. Jones, D.J. O'Halloran, M.A. Ghatei, J. Domin, S.R. Bloom, The influence of adrenal hormone status on neuroendocrine peptides in the rat anterior pituitary gland. *J. Endocrinol.* **127**, 437–444 (1990)
 20. K.S.L. Lam, G. Srivastava, S.P. Tam, Divergent effects of glucocorticoid on the gene expression of vasoactive intestinal peptide in the rat cerebral cortex and pituitary. *Neuroendocrinology* **56**, 32–37 (1992)
 21. R. Guillemin, G.W. Clayton, H.S. Lipscomb, J.D. Smith, Fluorometric measurement of rat plasma and adrenal corticosterone concentration. A note on technical details. *J. Lab. Clin. Med.* **53**, 830–832 (1959)
 22. G. Paxinos, C. Watson., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Academic Press, San Diego, 2009)
 23. K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Ct} method. *Methods* **25**, 402–408 (2001)
 24. T. Tachibana, S. Tomonaga, D. Oikawa, S. Saito, T. Takagi, E.S. Saito, T. Boswell, M. Furuse, Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide inhibit feeding in the chick brain by different mechanisms. *Neurosci. Lett.* **348**, 25–28 (2003)
 25. P. Trinder, Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J. Clin. Pathol.* **22**, 158–161 (1969)
 26. K. Falholt, B. Lund, W. Falholt, An easy colorimetric micro-method for routine determination of free fatty acids in plasma. *Clin. Chim. Acta* **46**, 105–111 (1973)
 27. E.T. Uchoa, L.E.C.M. da Silva, M. de Castro, J. Antunes-Rodrigues, L.L.K. Elias, Corticotrophin-releasing factor mediates hypophagia after adrenalectomy, increasing meal-related satiety responses. *Horm. Behav.* **58**, 714–719 (2010)
 28. S.I. Khan, M.A. Cline, T. Aramaki, H. Ueda, T. Tachibana, Feeding response following central administration of chicken vasoactive intestinal peptide in chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* **184**, 61–66 (2013)
 29. M.C. Garnica-Siqueira, A.B. Martins, D.A.M. Zaia, C.M. Leite, E.T. Uchoa, C.T.B.V. Zaia, Corticotrophin-releasing factor mediates vasoactive intestinal peptide-induced hypophagia and changes in plasma parameters. *Horm. Behav.* **105**, 138–145 (2018)
 30. S.S. Almeida, L.H. Duntas, L. Dye, M.L. Nunes, C. Prasad, J.B.T. Rocha, P. Wainwright, C.T.B.V. Zaia, R.C.A. Guedes, Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. *Nutr. Neurosci.* **5**, 311–320 (2002)
 31. K. Matsuda, K. Maruyama, T. Nakamachi, T. Miura, M. Uchiyama, S. Shioda, Inhibitory effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides* **26**, 1611–1616 (2005)
 32. H.S. Beyer, S.G. Matta, B.M. Sharp, Regulation of the messenger ribonucleic acid for corticotropin-releasing factor in the para-ventricular nucleus and other brain sites of the rat. *Endocrinology* **123**, 2117–2123 (1988)
 33. E.T. Uchoa, L.E.C.M. Silva, M. de Castro, J. Antunes-Rodrigues, L.L.K. Elias, Hypothalamic oxytocin neurons modulate hypo-phagic effect induced by adrenalectomy. *Horm. Behav.* **56**, 532–538 (2009)
 34. E.T. Uchoa, L.E.C.M. Silva, M. de Castro, J. Antunes-Rodrigues, L.L.K. Elias, Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. *Neuropeptides* **46**, 119–124 (2012)
 35. L.D. Alexander, L.D. Sander, Involvement of vasopressin and corticotropin-releasing hormone in VIP- and PHI-induced secretion of ACTH and corticosterone. *Neuropeptides* **28**, 167–173 (1995)
 36. E. Savontaus, I.M. Conwell, S.L. Wardlaw, Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. *Brain Res.* **958**, 130–138 (2002)
 37. N. Nagai, H. Kajikawa, T. Sasaki, K. Nagai, H. Nakagawa, Hyperglycemic response to intracranial injection of vasoactive intestinal peptide. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **17**, 29–34 (1994)

38. T. Kuo, A. Mcqueen, T.-C. Chen, J.-C. Wang, Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* **872**, 99–126 (2015)
39. A. Kawai, N. Kuzuya, On the role of glucocorticoid in glucose-induced insulin secretion. *Horm. Metab. Res.* **9**, 361–365 (1977)
40. M. Kadekaro, M. Ito, P.M. Gross, Local cerebral glucose utilization is increased in acutely adrenaletomized rats. *Neuroendocrinology* **47**, 329–334 (1988)
41. N. Paquot, P. Schneiter, E. Jéquier, L. Tappy, Effects of glucocorticoids and sympathomimetic agents on basal and insulin-stimulated glucose metabolism. *Clin. Physiol.* **15**, 231–240 (1995)
42. R.J. Ho, H.C. Meng, The extracortical action of adrenocorticotrophic hormone on the elevation of plasma free fatty acids. *Metabolism* **13**, 361–364 (1964)
43. M.T. Kibenge, C.B. Chan, Interactions between effects of adrenalectomy and diet on insulin secretion in *fa/fa* Zucker rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**, 1–7 (2001)
44. M.R. Freedman, T.W. Castonguay, J.S. Stern, Effect of adrenalectomy and corticosterone replacement on meal patterns of Zucker rats. *Am. J. Physiol.* **249**, R584–R594 (1985)
45. W. Oelkers, Adrenal insufficiency. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1206–1212 (1996)
46. A.M. Ebeid, R.R. Attia, P. Sundaram, J.E. Fischer, Release of vasoactive intestinal peptide in the central nervous system in man. *Am. J. Surg.* **137**, 123–127 (1979)
47. J. Miskowiak, B. Andersen, F. Stadil, J. Fahrenkrug, Meal stimulated levels of pancreatic polypeptide (PP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in gastroplasty for morbid obesity. *Regul. Pept.* **12**, 231–236 (1985)
48. J.M. Kellum, J.F. Kummerle, T.M. O'Dorisio, P. Rayford, D. Martin, K. Engle, L. Wolf, H.J. Sugerman, Gastrointestinal hormone responses to meals before and after gastric bypass and vertical banded gastroplasty. *Ann. Surg.* **211**, 763–770 (1990)
49. R.F. Harty, P.H. Pearson, T.E. Solomon, J.E. McGuigan, Cholecystokinin, vasoactive intestinal peptide and peptide histidine methionine responses to feeding in anorexia nervosa. *Regul. Pept.* **36**, 141–150 (1991)
50. I. Dawidson, M. Blom, T. Lundeberg, E. Theodorsson, B. Angmar-Månsson, Neuropeptides in the saliva of healthy subjects. *Life Sci.* **60**, 269–278 (1997)
51. C.A. Burdon, P. Ruell, N. Johnson, P. Chapman, S. O'Brien, H.T. O'Connor, The effect of ice-slushy consumption on plasma vasoactive intestinal peptide during prolonged exercise in the heat. *J. Therm. Biol.* **47**, 59–62 (2015)
52. D. Vaudry, A. Falluel-morel, S. Bourgault, M. Basille, D. Burel, O. Wurtz, A. Fournier, B.K.C. Chow, H. Hashimoto, L. Galas, H. Vaudry, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* **61**, 283–357 (2009)
53. A. Sarrieau, M. Najimi, F. Chigr, N. Kopp, D. Jordan, W. Rostene, Localization and developmental pattern of vasoactive intestinal polypeptide binding sites in the human hypothalamus. *Sinapse* **17**, 129–140 (1994)
54. Y. Masuo, T. Ohtaki, Y. Masuda, M. Tsuda, M. Fujino, Binding sites for pituitary adenyloate cyclase activating polypeptide (PACAP) commparison with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) binding site localization in rat brain sections. *Brain Res.* **575**, 113–123 (1992)
55. L. Mounien, P. Bizet, I. Boutelet, G. Gourcerol, A. Fournier, H. Vaudry, S. Jégou, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide directly modulates the activity of proopiomelanocortin neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroscience* **143**, 155–163 (2006)
56. L. Mounien, P. Bizet, I. Boutelet, G. Gourcerol, M. Basille, B. Gonzalez, H. Vaudry, S. Jégou, Expression of PACAP receptor mRNAs by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1070**, 457–461 (2006)
57. P. Wiik, Glucocorticoids upregulate the high affinity receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) on human mononuclear leu-cocytes in vitro. *Regul. Pept.* **35**, 19–30 (1991)

Anexo C: Artigo da Tese Publicado

Corticotrophin-releasing factor mediates vasoactive intestinal peptide induced hypophagia and changes in plasma parameters.

Marcela Cristina Garnica-Siqueira, Andressa Buseti Martins,
Dimas Augusto Morozin Zaia, Cristiane Mota Leite,
Ernane Torres Uchôa*, Cássia Thaïs Bussamra Vieira Zaia*.

Hormones and Behavior, v. 105, p. 138-145, 2018.



Corticotrophin-releasing factor mediates vasoactive intestinal peptide-induced hypophagia and changes in plasma parameters

Marcela Cristina Garnica-Siqueira^a, Andressa Busetti Martins^a, Dimas Augusto Morozin Zaia^b, Cristiane Mota Leite^c, Ernane Torres Uchôa^a, Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia^a

^a Laboratory of Neuroendocrine Physiology and Metabolism, Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

^b Laboratory of Prebiotic Chemistry, Department of Chemistry, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

^c Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

VIP
PVN
Antalarmin
Anti-sauvagine 30
Glycemia
Corticosterone
Free fatty acids

ABSTRACT

Vasoactive intestinal peptide (VIP) and corticotrophin-releasing factor (CRF) are anorexigenic neuropeptides that act in the hypothalamus to regulate food intake. Intracerebroventricular (ICV) microinjection of VIP pro-motes increased plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone, indicating that VIP activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The aim of this study was to evaluate the interaction between VIP and CRF, by verifying the effects of ICV administration of VIP on the activity of neurons and CRF mRNA expression in paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN). In addition, it was evaluated the effects of pretreatment with CRF type 1 receptor (CRFR1) antagonist (Antalarmin, ANT) or CRF type 2 receptor (CRFR2) antagonist (Antisauvagine-30, AS30) on VIP-induced changes on food intake and plasma parameters of male rats. Compared to Saline group, VIP increased not only the number of Fos-related antigens (FRA)-immunoreactive neurons in the PVN but also CRF mRNA levels in this nucleus. Both ANT and AS30 treatment attenuated the inhibition of food intake promoted by VIP, ANT showing a more pronounced effect. Both antagonists also attenuated VIP-induced reduction and enhancement of free fatty acids and corticosterone plasma levels, respectively, and only AS30 was able to attenuate the hyperglycemia. These results suggest that CRF is an important mediator of VIP effects on energy balance, and CRFR1 and CRFR2 are involved in these responses.

1. Introduction

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a 28-amino acid neuropeptide widely distributed in the central nervous system (CNS) and it acts as neuromodulator (Schutzberg et al., 1980). Neurons expressing VIP are distributed in the CNS, such as the cortex, hippocampus, amygdaloid nucleus, thalamus and hypothalamus. VIP binds with high affinity to its receptors VPAC1, primarily expressed in the hippocampus and cortex, and in a lesser extent in the hypothalamus (Joo et al., 2004), and VPAC2, expressed in the thalamus, hypothalamus, brain stem and amygdala (Sheward et al., 1995). In the hypothalamus, VPAC2 is found in supraoptic nucleus (SON), suprachiasmatic nucleus, arcuate nucleus, parvocellular region of the paraventricular nucleus (PVN) and anterior pituitary (Gerhold et al., 2001), areas associated with neuroendocrine functions in the CNS (Uzdin et al., 1994).

It is known that VIP is released in the gastrointestinal tract in re-sponse to feeding (Miskowiak et al., 1985), suggesting that peripheral

VIP might influence feeding behavior, since VIP can cross brain-blood-barrier (Dogrukol-Ak et al., 2003; Dogrukol-Ak et al., 2004). According to this, peripheral injection of VIP was shown to reduce food intake in different species (Matsuda et al., 2005; Matsuda et al., 2006; Yu et al., 2011), reinforcing this concept. Additionally, intracerebroventricular microinjection of VIP in rats promotes increase of glucose plasma concentrations and decreased food intake (Ghourab et al., 2011; Martins et al., 2018), as well as increased plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone in a dose-dependent manner, indicating that VIP regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), probably by activating corticotrophin-releasing factor (CRF) neurons (Alexander and Sander, 1994; Wang et al., 1998). In addition, although the hypothalamic release of VIP in response to feeding is not evidenced in the literature, it can be suggested that VIP is released in the hypothalamus, or at least in part involved in feeding-induced changes in the PVN, since Alexander et al. (1995) demonstrated that VIP release in the PVN mediates food-induced ACTH and CORT

Corresponding authors at: Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário, 860570-970 Londrina, PR, Brazil.

E-mail addresses: euchoa@uel.br (E.T. Uchôa), ctbvzaia@uel.br (C.T.B.V. Zaia).

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.08.008>

Received 6 April 2018; Received in revised form 26 July 2018; Accepted 18 August 2018
0018-506X/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

secretion.

CRF reduces food intake (Arase et al., 1988) and it is classically known as the main secretagogue of the HPA axis, which can also be regulated by vasopressin, a neuropeptide co-localized with CRF neurons especially in the medial parvocellular PVN (Piekut and Joseph, 1986) that stimulates ACTH secretion in the presence of CRF (Rivier and Vale, 1983). CRF acts through specific receptors, type 1 (CRFR1) and type 2 (CRFR2). CRFR1 has a large CNS distribution, with significant expression in the cerebellum, limbic structures, dorsal and medial raphe nuclei, PVN and anterior and intermediate pituitary (Chalmers et al., 1995; Van Pett et al., 2000), being related to the activation of the HPA axis by its presence in the corticotrophs (Gutman et al., 2003). CRFR2 is expressed in the olfactory bulb, amygdala, nucleus of the solitary tract, hippocampus, raphe nuclei, and hypothalamus, in ventromedial nucleus, SON, and PVN (Lovenberg et al., 1995; Van Pett et al., 2000), hypothalamic areas related to food intake control and the anorexic effects of CRF (Vaughan et al., 1995).

Thus, as VIP activates HPA axis and both VIP and CRF are anorexigenic neuropeptides, it was hypothesized that CRF acts as mediator of VIP-induced changes on food intake and plasma metabolic parameters. For this purpose, the present study aimed to evaluate the effects of VIP on the activity of PVN neurons and CRF mRNA expression in the PVN, as well as the involvement of CRFR1 and CRFR2 on VIP-induced changes on food intake and corticosterone, glucose and free fatty acids plasma parameters.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (260–280 g, n = 224), from the Central Animal Care Facility of the State University of Londrina (UEL), were housed in cages at controlled temperature (22 ± 2 °C) with a fixed light-dark cycle (light from 6:00 AM to 6:00 PM). Animals had ad libitum access to pelleted rat chow and water, unless otherwise specified. To improve adaptation to the laboratory environment, rats were daily handled before the experiments. All experimental procedures were conducted between 7:00 AM and 12:00 PM and were approved by local Ethics Commission on the Use of Animals (protocol number 14371.2017.44).

2.2. Intracerebroventricular (ICV) surgery

Animals were anesthetized with an association of ketamine (K, 100 mg/kg, Agener União, 10%) / xylazine hydrochloride (X, 20 mg/kg, Anasedan®, Vetbrands, Jacareí, Brazil, 2%) intraperitoneally, placed in a stereotaxic instrument (David Kopf Instruments, model 900) with bregma and lambda in a horizontal plane. A stainless-steel guide cannula (0.7 mm external diameter, 0.4 mm internal diameter and 10 mm length) was implanted in the right lateral ventricle according to Paxinos and Watson's (1997) atlas coordinates: 0.8 mm caudal to bregma, 3.6 mm below the skullcap and 1.5 mm lateral to the sagittal suture. Cannula was fixed to the cranium using dental acrylic resin and two jeweller's screws. Within the implanted cannula, a 30-gauge metal obturator filled the cannula except during the microinjections. After surgery, rats received prophylactic dose of antibiotic (50,000 units of penicillin G: 0.1 mL per 100 g of body weight, intramuscularly) and paracetamol (200 mg/kg, orally). Animals were kept in collective cages containing a maximum of three animals, for better surgery recovery. Three days before the experiment, they were accommodated in individual cages for adaptation. Cannula placement was verified by sectioning the brain in a cryostat at the end of the experiment, in all groups.

2.3. Perfusion, tissue preparation, and Immunohistochemistry

Animals were anesthetized with an intraperitoneal K + X injection

and were transcardially perfused with 200 mL of cold isotonic saline (0.15 M) containing heparin (1:80), followed by 400 mL of cold 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4), using a peristaltic bomb with a speed of 10 mL per minute. The brain was removed, fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h and stored at 4 °C in PB containing 30% sucrose. Coronal sections of 30 µm were obtained in a cryostat (Leica), collected in PB and stored in cryoprotectant solution at -20 °C. Sections were processed for FRA (Fos-related antigens) immunoreactivity by incubating for 48 h at 4 °C with an anti-FRA antibody (K25, Santa Cruz) diluted 1:2,000 in 0.1 PB containing 1.5% normal goat serum and 0.3% Triton. Free-floating sections were then washed with 0.01 PB and incubated with biotin-labelled anti-rabbit immunoglobulin (Vector Inc., Ca, USA, 1:200 dilution in 1.5% normal goat serum-PB) and after with the avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain, 1:200 in PB), for 1 h each at room temperature. For detection FRA labelling, diaminobenzidine hydrochloride (DAB, Sigma CO., Ca, USA, 0.01%) was used and intensified with 1% nickel ammonium sulfate. Thereafter, sections were mounted on gelatinized slides, air-dried overnight, dehydrated in xylene and placed under a cover slip with Ethelan (New Jersey, USA).

The PVN was identified according to Paxinos and Watson (1997) brain rat atlas. Medial (PaMP) and ventral (PaV) subdivisions of the PVN were considered at -1.80 mm, and posterior parvocellular (PaPo) subdivision of the PVN was considered at -2.12 mm from bregma. FRA immunoreactive neurons were quantified with the aid of an image system attached to a microscope (Motic). FRA-immunoreactivity neurons, indicated in black staining, were identified when the nuclear structure demonstrated a clear immunoreactivity compared with the background level. Sections were counted for PaMP, PaV and PaPo, and the visual counting of neurons expressing FRA was performed in one or two sections from ten to twelve animals of each experimental group by participants blind to the experimental protocols.

2.4. Microdissection, total RNA isolation and quantitative real-time PCR

Microdissections of the PVN were obtained using a stainless punch needle 1.5 mm in diameter, in a cryostat according to coordinates from -0.92 to -2.12 for PVN (1200 µm) from bregma. Total RNA was isolated from each micropunched hypothalamic tissue sample using Trizol reagent (Invitrogen®, New Zealand) according to the manufacturer's protocol. The RNA concentration in each sample was determined using a Multi-detection microplate reader (Synergy HT, BioTek), and 500 ng of RNA was used for cDNA synthesis using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Quantitative real-time PCR was performed using an Applied Biosystems 7500 real-time PCR system. The TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) used in this study was Rn 01462137_m1 (CRF). Each PCR reaction was performed in duplicate. Water (instead of cDNA) was used as negative control. Housekeeping gene, beta actin, was run for each cDNA sample. The determination of gene transcript levels in each sample was obtained by the CT method. For each sample, the threshold cycle (Ct) was determined and normalized to the average of the housekeeping gene ($Ct = Ct_{Unknown} - Ct_{Housekeepinggenes}$). The fold-change of mRNA expression in the unknown sample relative to the

control group was calculated as 2^{-Ct} , where $Ct = Ct_{Unknown} - Ct_{Control}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Data are shown as mRNA expression relative to the control group (Saline).

2.5. Experimental protocols

All animals were subjected to ICV surgery. After 6 days of recovery, they were fasted for 16 h, and on the seventh day after surgery, the experimental tests were performed.

The drugs ICV microinjected for the experiments were: VIP (Sigma Co., CA), 40 ng/g body weight (BW) in 6 µL microinjected in 1 min, and sterile saline (0.9% NaCl, 6 µL in 1 min) was microinjected as vehicle.

The dose of VIP was chosen based on different works from the literature (Alexander and Sander, 1994; Tachibana et al., 2003; Ghourab et al., 2011; Martins et al., 2018). Antalarmin (ANT, C₂₄H₃₄N₄-HCl, Sigma Co., CA; 0.25 µg in 5 µL/1 min), CRFR1 antagonist, or vehicle (0.9% NaCl/absolute ethanol/SDS/DMSO in 5 µL/1 min) was microinjected and the dose of ANT was selected based on doses previously used in the literature (Zorilla et al., 2002; Chotiawat and Harris, 2008). Anti-sauvagine-30 (AS30, D-Phe¹¹, His¹²-Sauvagine 11–40, Peninsula/Ba-chem, 5 µg in 5 µL/1 min), CRFR2 antagonist, or vehicle (0.9% NaCl in 5 µL/1 min) was microinjected and the dose was tested in previous work (Uchoa et al., 2010).

2.6. Experiment 1: effects of microinjection of VIP on PVN neuron activation

Animals received ICV microinjection of VIP or saline. After 90 min, animals were transcardially perfused for brain tissue collection and immunohistochemistry studies (Hoffmann and Murphy, 2000).

2.7. Experiment 2: effects of microinjection of VIP on CRF mRNA expression in the PVN

Animals received ICV microinjection of VIP or saline. After 60 min (Bredow et al., 1994), animals were decapitated and the brains were collected under RNase-free conditions, immediately frozen in dry ice and stored at -80 °C for determination of CRF mRNA expression in the PVN.

2.8. Experiment 3: effects of pretreatment with CRFR1 or CRFR2 antagonist on VIP-induced responses on food intake

A first set of animals received ICV microinjection of CRFR1 antagonist, ANT, or vehicle. Another set of animals received ICV microinjection of CRFR2 antagonist, AS30 or vehicle. After 15 min, animals of both experiments received ICV microinjection of VIP or saline. Fifteen minutes after these microinjections, all animals had access to food (50 g), and food intake was quantified (g/100 g BW) after 120 min.

2.9. Experiment 4: effects of pretreatment with CRFR1 or CRFR2 antagonist on VIP-induced changes on plasma parameters

A first set of animals received ICV microinjection of CRFR1 antagonist, ANT, or vehicle. Another set of animals received ICV microinjection of CRFR2 antagonist, AS30 or vehicle. After 15 min, animals of both experiments received ICV microinjection of VIP or saline. Fifteen minutes after the microinjections, all animals were decapitated and trunk blood was collected in heparinized tubes and centrifuged at 14,000 ×g for 20 min. Plasma was stored at -20 °C and used for bio-chemical dosages of glucose (spectrophotometric determination based on the peroxidase reaction (Trinder, 1969), BioLiquid Glucose Commercial Kit, Laborclin, PR), corticosterone (modified fluorometric method of Guillemain et al., 1959), and free fatty acids (modified spectrophotometric method of Falholt et al., 1973).

2.10. Statistical analysis

Data are expressed as means ± SEM. Normal distribution and homogeneity of the data were tested. t-test of Student was performed to evaluate the effects of microinjection of VIP on PVN neuron activation and CRF mRNA expression in the PVN, as Cohen's d for effect size estimates (experiments 1 and 2). Two-way ANOVA was used to evaluate the effects of pretreatment with CRFR1 or CRFR2 antagonist on VIP-induced responses on food intake and plasma parameters (experiments 3 and 4) followed by the Newmann-Keuls post hoc test, and eta square for effect size estimates. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

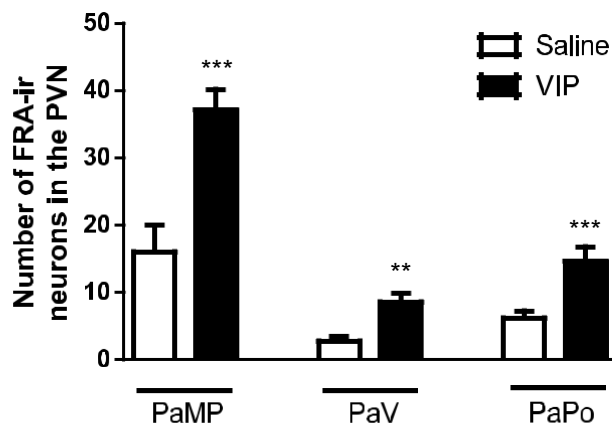


Fig. 1. Number of Fos related antigens-immunoreactive neurons in the medial parvocellular (PaMP - 5000 mm²), ventral parvocellular (PaV - 3000 mm²) and posterior parvocellular (PaPo - 8000 mm²) subdivision of the PVN of animals treated with ICV microinjection of saline (0.9% NaCl, 6 µL in 1 min) or vasoactive intestinal peptide (VIP; 40 ng/g BW, 6 µL in 1 min). Data are shown as means ± SEM (n = 11–12 rats/group). * $p < 0.05$ vs. Saline group.

3. Results

3.1. Experiment 1: effects of microinjection of VIP on PVN neuron activation

Compared to saline group (Fig. 1), VIP induced increase ($p < 0.05$) on the number of FRA-immunoreactive neurons in all areas of the PVN, 130% on PaMP ($t = 4.29$, $df = 21$, Cohen's $d = 1.8$), 205% on PaV ($t = 3.79$, $df = 21$; Cohen's $d = 1.6$) and 136% on PaPo ($t = 3.35$, $df = 20$; Cohen's $d = 1.5$).

3.2. Experiment 2: effects of microinjection of VIP on CRF mRNA expression in the PVN

Animals treated with VIP showed elevation ($p < 0.05$) in 44% of CRF mRNA expression in the PVN compared to saline group ($t = 2.24$, $df = 16$, Cohen's $d = 1.1$; Fig. 2).

3.3. Experiment 3: effects of pretreatment with CRFR1 or CRFR2 antagonist on VIP-induced responses on food intake

Vehicle-VIP animals showed reduction ($p < 0.03$) of about 50% on

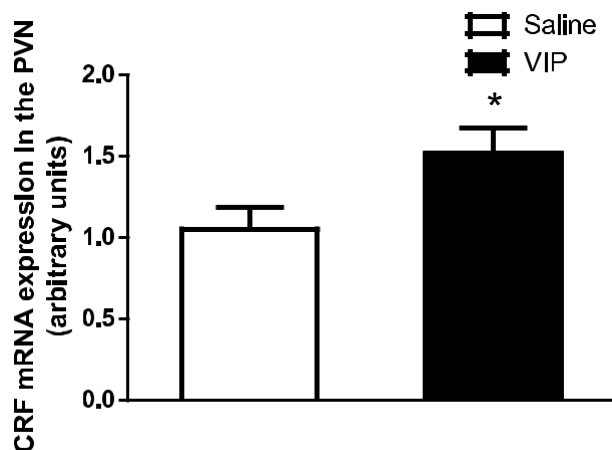


Fig. 2. Relative CRF mRNA expression in the PVN of animals treated with ICV microinjection of saline (0.9% NaCl, 6 µL in 1 min) or vasoactive intestinal peptide (VIP; 40 ng/g BW, 6 µL in 1 min). Data are shown as mean ± SEM (n = 8–10 rats/group). * $p < 0.05$ vs. Saline group.

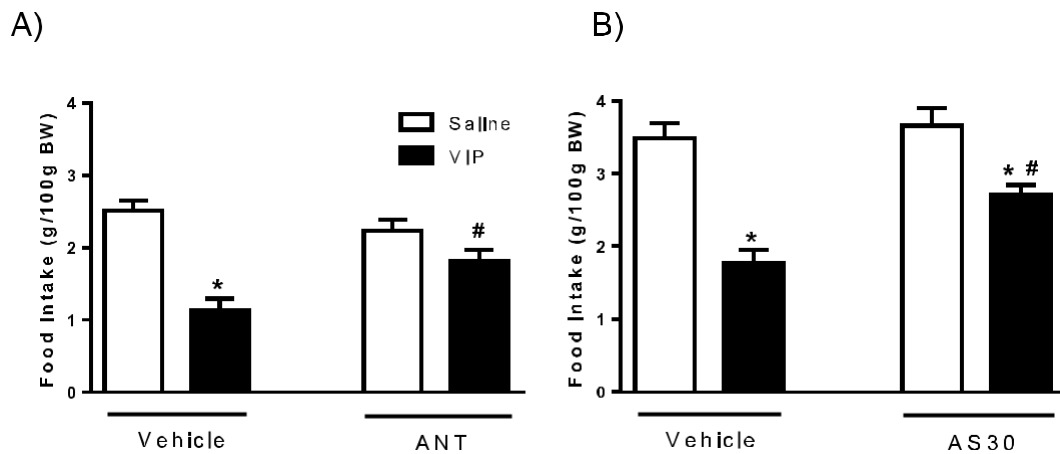


Fig. 3. Food intake (g/100 g body weight) for 120 min after ICV microinjection of saline (0.9% NaCl, 6 μ L in 1 min) or vasoactive intestinal peptide (VIP; 40 ng/g BW, 6 μ L in 1 min) in animals pretreated with ICV microinjection of vehicle or antalarmin hydrochloride (ANT; 0.25 μ g in 5 μ L/1 min) (A), and vehicle or D-Phe¹¹,His¹²-Sauvagine 11–40 (antisauvagine-30, AS30; 5 μ g in 5 μ L/1 min) (B). Data are shown as means \pm SEM (n = 10–16 rats/group). *p < 0.05 vs. respective saline group. #p < 0.05 vs. vehicle/VIP group.

food intake compared to Vehicle-Saline group. On the other hand, after ANT microinjection (CRFR1 antagonist), food intake of VIP treated animals did not differ from saline group, while it was higher (p < 0.05) than Vehicle-VIP group, an attenuation of 59% of the VIP-induced inhibition of food intake (Fig. 3A). There was an interaction between antagonist treatment (Vehicle or ANT) and drug treatment (Saline or VIP) on the food intake (F(3,50) = 9.1, p = 0.004, eta square = 11.12%). We observed an effect of drug treatment (F(3,50) = 32.6, p < 0.001, eta square = 39.68%) on food intake, with no effect of antagonist treatment (F(3,50) = 1.6, p = 0.217; eta square = 1.90%). Differently, AS30-VIP group showed lower (p < 0.05) food intake than AS30-Saline animals, but higher (p < 0.05) food intake than Vehicle-VIP group. AS30 attenuated in 52% VIP-induced inhibition (Fig. 3B). There was no interaction between antagonist treatment (Vehicle or AS30) and drug treatment (Saline or VIP) on the food intake (F(3,45) = 3.6, p = 0.064, eta square = 3.33%). We observed an effect of antagonist treatment (F(3,45) = 7.5, p = 0.009, eta square = 7.0%) and drug treatment (F(3,45) = 44.2, p < 0.001, eta square = 41.14%) on food intake.

3.4. Experiment 4: effects of pretreatment with CRFR1 or CRFR2 antagonist on VIP-induced responses on plasma parameters

In vehicle-pretreated animals, VIP microinjection induced increase (p < 0.05) on corticosterone plasma levels (Fig. 4A and B) compared to Saline treatment. When pretreated with ANT, there was no difference on corticosterone plasma levels between Saline and VIP microinjections, with no difference between ANT-VIP and Vehicle-VIP groups. There was no interaction between antagonist treatment (Vehicle or ANT) and drug treatment (Saline or VIP) on corticosterone plasma concentration (F(3,41) = 0.2, p = 0.666, eta square = 0.42%). We observed an effect of drug treatment (F(3,41) = 7.5, p = 0.01; eta square = 16.69%) on corticosterone plasma concentration, with no effect of antagonist (F(3,41) = 0.8, p = 0.381, eta square = 1.76%). Within pretreatment with AS30, similarly, no difference was observed on corticosterone levels between Saline and VIP groups, and AS30 pretreatment reduced (p < 0.05) this parameter in animals treated with VIP compared to Vehicle-VIP group. There was no interaction between antagonist treatment (Vehicle or AS30) and drug treatment (Saline or VIP) on corticosterone plasma concentration (F(3,43) = 2.4, p = 0.126, eta square = 3.85%). We observed an effect of drug treatment (F(3,43) = 17.0, p < 0.001, eta square = 26.87%) on corticosterone plasma concentration, with no effect of antagonist (F(3,43) = 2.2, p = 0.148, eta square = 3.42%).

Blood plasma glucose concentrations (Fig. 4C and D) were increased (p < 0.001) by VIP microinjection in vehicle-pretreated animals compared to its control. Likewise, after ANT pretreatment, VIP treatment also promoted enhancement (p < 0.001) on glucose plasma levels and had no difference with Vehicle-VIP group. There was no interaction between antagonist treatment (Vehicle or ANT) and drug treatment (Saline or VIP) on glucose plasma levels (F(3,41) = 0.3, p = 0.597, eta square = 0.32%). We observed an effect of drug treatment (F(3,41) = 53.0, p < 0.001, eta square = 59.22%) on glucose plasma levels, with no effect of antagonist (F(3,41) = 0.8, p < 0.377, eta square = 0.89%). After pretreatment with AS30, VIP treated animals also showed increase (p < 0.001) on glucose plasma levels compared to Saline treatment, however AS30 reduced (p < 0.002) blood glucose when compared to Vehicle in VIP-treated groups. There was no interaction between antagonist treatment (Vehicle or AS30) and drug treatment (Saline or VIP) on glucose plasma levels (F(3,43) = 4.0, p = 0.053, eta square = 2.17%). We observed an effect of antagonist (F

(3,43) = 6.8, p = 0.012, eta square = 3.73%) and drug (F(3,43) = 129.3, p < 0.001, eta square = 70.39%) on glucose plasma levels.

In vehicle-pretreated groups, VIP microinjection decreased (p < 0.05) free fatty acids plasma levels (Fig. 4E and F) compared to Saline. Nevertheless, in ANT and AS30 pretreated animals, there was no difference on free fatty acids plasma concentrations between Saline and VIP treatments. Additionally, no difference was observed in the comparison of Vehicle with ANT or AS30 in VIP-treated groups. There was no interaction between antagonist treatment (Vehicle or ANT) and drug treatment (Saline or VIP) on free fatty acids plasma levels (F(3,41) = 0.5, p = 0.47, eta square = 0.13%). We observed an effect of drug treatment (F(3,41) = 5.6, p = 0.02, eta square = 13.34%) on free fatty acids plasma levels, with no effect of antagonist (F(3,41) = 0.01, p = 0.939, eta square = 0.01%). Regarding AS30, there was an interaction between antagonist treatment (Vehicle or AS30) and drug treatment (Saline or VIP) on free fatty acids plasma levels (F(3,43) = 4.1, p = 0.049, eta square = 7.77%). We observed an effect of drug treatment (F(3,43) = 7.1, p = 0.011; eta square = 13.38%) on free fatty acids plasma levels, with no effect of antagonist (F(3,43) = 0.05, p = 0.824, eta square = 0.09%).

4. Discussion

The present study was undertaken to evaluate the effects of ICV microinjection of VIP on the activity of neurons and CRF mRNA expression in the PVN. In addition, the effects of CRFR1 or CRFR2

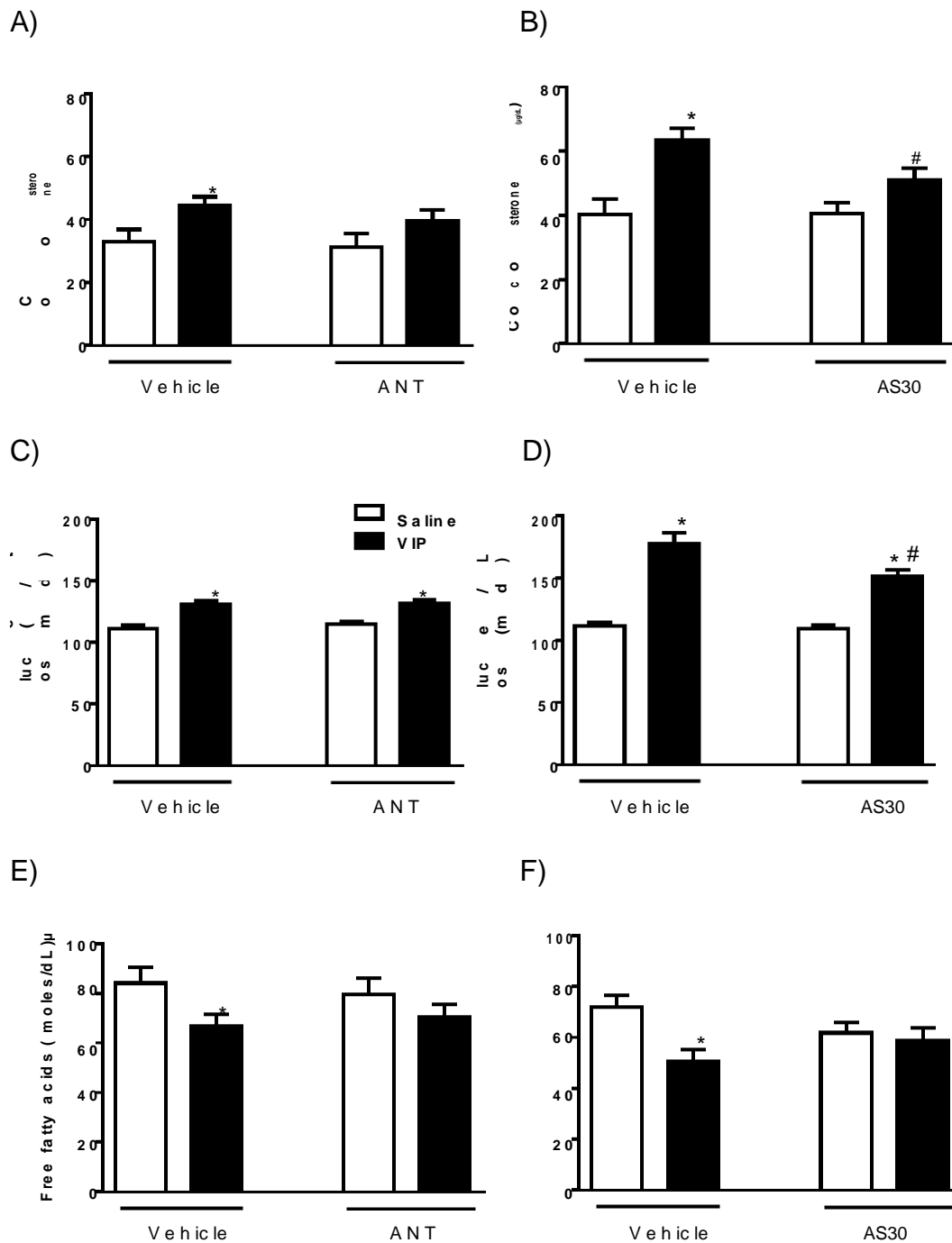


Fig. 4. Blood plasma levels of corticosterone ($\mu\text{g/dL}$) (A and B), glucose (mg/dL) (C and D), and free fatty acids ($\mu\text{moles/dL}$) (E and F) of animals after ICV microinjection of saline (0.9% NaCl, 6 μL in 1 min) or vasoactive intestinal peptide (VIP; 40 ng/g BW, 6 μL in 1 min), pretreated with ICV microinjection of vehicle or antalarmin hydrochloride (ANT; 0.25 μg in 5 μL /1 min) (A, C, E), and vehicle or D-Phe¹¹,His¹²-Sauvagine 11–40 (antisauvagine-30, AS30; 5 μg in 5 μL /1 min) (B, D, E). Data are shown as means \pm SEM ($n = 10\text{--}12$ rats/group). * $p < 0.05$ vs. respective saline group. # $p < 0.05$ vs. vehicle/VIP group.

antagonists on VIP-induced changes on food intake and plasma parameters of rats were also investigated. Increased activity of PVN neurons and CRF mRNA expression were observed after ICV microinjection of VIP. Additionally, CRFR1 or CRFR2 antagonists reduced the anorexi-genic effect of VIP on food intake, and they were able to attenuate changes on plasma parameters in response to VIP.

The present study was the first to demonstrate that microinjection of VIP in the lateral ventricle promoted increases on CRF mRNA expression in the PVN as well as on the activity of parvocellular PVN neurons, in subdivisions with high expression of CRF neurons. In accordance with this, Alexander and Sander (1995) observed that

microinjection of VIP in the PVN stimulated the secretion of ACTH and corticosterone, and pretreatment with CRF antagonist inhibited these responses, suggesting that the activation of the HPA axis by VIP is mediated by its action through CRF neurons. On the other hand, in chicks, ICV injection of VIP lowered CRF mRNA expression in the diencephalon although injection of VIP increased plasma corticosterone, possibly by negative feedback (Khan et al., 2013).

It can predict that the majority of those FRA immunoreactive neurons were CRF neurons, since CRF is highly expressed in the subdivisions of the PVN evaluated (Sawchenko et al., 1984; Imaki et al., 1992; Rorato et al., 2008). In addition, although the well-established concept

that mRNA expression may not be associated with protein synthesis, VIP-induced increase on CRF mRNA expression in PVN also reinforces the hypothesis that at least part of those VIP-induced activated neurons are CRF neurons. Accordingly, the increased CRF mRNA expression and neuronal activity in the PVN after VIP microinjection strongly suggest that CRF is a mediator of the central effects of VIP on energy homeostasis. Microinjection of VIP in the lateral ventricle promoted hypophagia and CRF receptors antagonists, ANT and AS30, decreased the anorexigenic effects induced by VIP. This finding demonstrates the well established anorexigenic effect of VIP, as shown by the reduction of food intake after VIP microinjection in different species (Almeida et al., 2002; Ghourab et al., 2011; Martins et al., 2018; Matsuda et al., 2005; Tachibana et al., 2003). Additionally, pretreatment with CRF receptor antagonists attenuated VIP-induced hypophagia, demonstrating the important role of both CRF receptors as mediators of VIP actions. In-deed, pretreatment with CRFR1 antagonist, antalarmin, promoted re-duction and CRFR2 antagonist, antisauvagine-30, partially reduced the hypophagia induced by VIP. It is well known that CRF has a major role in the control of endocrine, autonomic and behavioral responses to stress (Henckens et al., 2016), mediated by the two receptor subtypes, CRFR1 and CRFR2, which present different roles.

Accordingly, it was demonstrated in chicks that the anorexigenic effect of VIP is mediated by CRF, by the unespecific blockage of CRF receptor (Tachibana et al., 2004). Reports suggest that the inhibition of food intake induced by CRF is mediated only by CRFR2, since CRF could inhibit food intake both in CRFR1-deficient and wild-type mice equally (Contarino et al., 2000), and CRF-induced inhibition of food intake was blocked by a selective CRFR2 antagonist but not by NBI27914, a CRFR1 antagonist (Pellemounter et al., 2000). However, Sekino et al. (2004) showed that ICV microinjection of CRFR2 antagonist, AS30, partially attenuated the inhibition of food intake and CRFR1 antagonist, CRA1000, almost completely reduced the inhibition of food intake induced by stress. Peripheral injection of CRFR1 antagonist also decreased the stress-induced hypophagia (Hotta et al., 1999) and knockout mice for CRFR1 showed no response for urocortin-induced hypophagia and weight loss after food deprivation (Bradbury et al., 2000). Central and peripheral tissues analyzed for mRNA expression of CRF receptors observed that CRFR1 is expressed in the pituitary gland and pancreatic islets but is predominantly expressed in the cerebrum. On the other hand, CRFR2 mRNA is expressed in the cerebrum, skeletal muscle, brown adipose tissue and liver (Sakamoto et al., 2013). These data confirm the CRFR1 and CRFR2 involvement in the HPA axis and suggests the control of energy homeostasis at central and peripheral levels, and also demonstrate functional diversity between CRFR1 and CRFR2 (Chotiawat and Harris, 2008). The current study corroborates with these data, since both CRFR1 and CRFR2 receptor antagonists decreased VIP-induced hypophagia, and CRFR1 receptor antagonist, ANT, showed a more pronounced effect. AS30 and ANT did not significantly change food intake in control rats, as observed in other studies (Hotta et al., 1999; Sekino et al., 2004).

Regarding plasma parameters, ICV microinjection of VIP increased corticosterone plasma concentrations, which corroborates with data obtained by Alexander and Sander (1994), who observed increased plasma corticosterone after microinjection of VIP in the PVN of rats. In chicks, VIP microinjection in the lateral ventricle also promoted significant increase of corticosterone plasma levels (Khan et al., 2013). As seen, central microinjection of VIP promoted hyperglycemia and increased corticosterone suggesting that VIP acts centrally through CRF neurons, since intraperitoneal injection of VIP did not follow the increases in glucose and corticosterone plasma concentrations (Itoh et al., 1982; Nagai et al., 1994). Previous studies demonstrated that knockout mice for CRFR1 receptor had reduced corticosterone plasma concentrations (Bradbury et al., 2000; Sakamoto et al., 2013), and pre-treatment with an unespecific CRF antagonist followed by microinjection of VIP in the PVN reduced the VIP-induced increase in ACTH and corticosterone (Alexander and Sander, 1995). The current work is

in accordance with this hypothesis, since the lack of VIP-induced increase on corticosterone plasma levels in animals pretreated with CRFR1 and CRFR2 receptor antagonists strongly suggest that this re-ceptor is involved in VIP activation of HPA axis.

Microinjection of VIP also promoted hyperglycemia, an effect observed in previous studies (Martins et al., 2018; Nagai et al., 1994). However, pretreatment with AS30 was able to reduce VIP-induced increase on glucose plasma levels, while ANT did not change the hyperglycemia promoted by VIP. These effects indicate the participation of CRF on the hyperglycemia promoted by VIP, especially through CRFR2, known to mediate the anorexigenic effects of CRF (Vaughan et al., 1995). In this context, CRFR2 mRNA was shown to be highly expressed in medial parvocellular cells of PVN, a subdivision that was highly activated in response to VIP in the current work, as well as in the nucleus of the solitary tract and ventromedial nucleus of the hypothalamus (Chalmers et al., 1995; Van Pett et al., 2000), while CRFR1 mRNA is less expressed in these regions. Martins et al. (2018) demonstrated that pretreatment with oxytocin receptor antagonist reduced VIP-induced increase on glucose plasma levels, suggesting that VIP effects may also be due to sympathetic activation mediated by PVN pathways, since PVN control pituitary-adrenal axis and oxytocin neurons contribute to sympathetic activity regulation (Nunn et al., 2011; Yee et al., 2016). In addition, VIP microinjection decreased free fatty acids plasma concentrations. This result was demonstrated by Martins et al. (2018) and differs from Richter et al. (1989) that performed an in vitro experiment with human adipose tissue and observed that VIP increased the release of free fatty acids. Pretreatments with both ANT and AS30 were able to attenuate VIP effects on free fatty acids plasma levels, since microinjection of VIP did not change this parameter after the treatment with these antagonists.

Although VIP-induced changes on urocortins were not evaluated in the current study, Khan et al. (2013) demonstrated that VIP affects not only CRF but also urocortin 3 mRNA expression in the diencephalon of chicks, indicating that VIP is related to CRF systems. Thus, it cannot be discarded that VIP can also act through urocortins systems in rats, since it is known that this peptide is a potent agonist for CRFR2, which was demonstrated to participate on VIP-elicited responses (Perrin and Vale, 1999; Bittencourt et al., 1999; Reyes et al., 2001).

Finally, the hypothalamus acts as the major center control of food intake and body weight and its different nuclei are implicated in different neuronal pathways that generate integrated responses (Schwartz et al., 2000; Woods et al., 1998). The arcuate nucleus is localized adjacent to the third ventricle's floor, which receives peripheral signaling such as leptin and insulin (Satoh et al., 1997). Distinct neuronal populations are responsible to initiate circuits with high specialized roles in energy homeostasis. Neuropeptide Y and Agouti-related peptide are co-localized in arcuate nucleus neurons and comprise an anabolic pathway, while proopiomelanocortin and cocaine- and amphetamine-regulated transcript are co-localized in an adjacent subset of arcuate nucleus neurons and initiate a catabolic pathway (Elias et al., 1998; Hahn et al., 1998). CRF neurons in the PVN are innervated by α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), a post-translational processing of POMC, and CRF was demonstrated to be an anorexigenic mediator of α -MSH (Lu et al., 2003). Thus, as shown in the present study, CRF mediates different effects of VIP in male rats, as seen that blockade of both CRFR1 and CRFR2 attenuated hypophagia and plasma parameters changes in response to VIP. Additionally, Ghourab et al. (2011) showed a reversion of hypophagia induced by VIP when pretreated with α -MSH antagonist and incubation of hypothalamic explants with VIP promoted increase in α -MSH release. Oxytocin was also demonstrated to be a mediator of anorexigenic responses induced by α -MSH and CRF (Olson et al., 1991; Yosten and Samson, 2010) and pretreatment with oxytocin receptor antagonist blunted VIP-induced anorexia, suggesting that VIP may modulate the α -MSH-CRF-oxytocin pathway (Martins et al., 2018) (Fig. 5).

In conclusion, our study shows that VIP increases neuronal activity

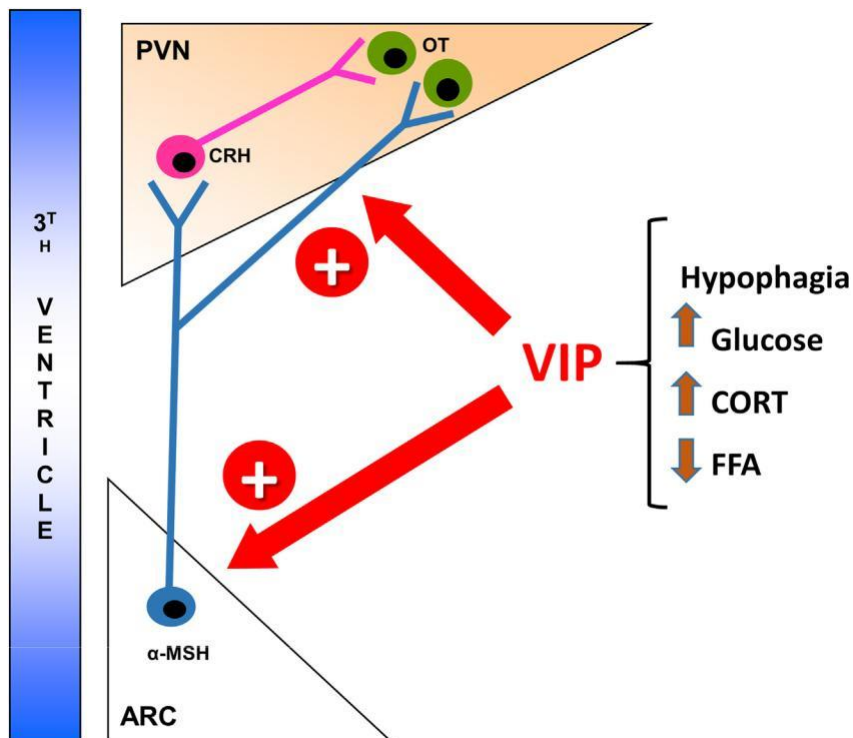


Fig. 5. Schematic drawing of the interaction of VIP with other neuropeptides in the hypothalamus. VIP effects on energy homeostasis were shown to be mediated by α -mela-nocyt-stimulating hormone (α -MSH), corticotrophin-re-leasing factor (CRF) and oxytocin (OT). Since CRF was de-monstrated to mediate the hypophagic effects of α -MSH, and OT was also shown to be a mediator of anorexigenic re-sponses induced by α -MSH and CRF, it is likely that VIP modulates the α -MSH-CRF-oxytocin pathway to reduce food intake and promote metabolic plasma changes.

in the medial, ventral and posterior parvocellular PVN subdivisions, as well as CRF mRNA expression in the PVN. Furthermore, VIP was de-monstrated to promote hypophagia, hyperglycemia, elevation of corti-costerone plasma levels, and reduction of free fatty acids plasma levels. For the first time in the literature, the specific contribution of each CRF receptor to VIP-induced effects was observed. Pretreatment with CRFR1 and CRFR2 receptors antagonists were able to reverse the inhibition of food intake promoted by VIP, with ANT showing a more pronounced effect. Both antagonists attenuated VIP-induced changes on free fatty acids and corticosterone plasma levels, and only AS30 was able to at-tenuate the hyperglycemia. These data show that CRF is an important mediator of VIP responses on energy balance, and both CRFR1 and CRFR2 participate in these effects.

Acknowledgments

We would like to thank the financial support of Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Brasil, for the grant (protocol number 23275). MRGS thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for PhD fellowship.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Alexander, L.D., Sander, L.D., 1994. Vasoactive intestinal peptide stimulates ACTH and corticosterone release after injection into the PVN. *Regul. Pept.* 51, 221–227.
- Alexander, L.D., Sander, L.D., 1995. VIP antagonist demonstrates differences in VIP- and PHI-mediated stimulation and inhibition of ACTH and corticosterone secretion in rats. *Regul. Pept.* 59, 321–333.
- Alexander, L.D., Evans, K., Sander, L.D., 1995. A possible involvement of VIP in feeding-induced of ACTH and corticosterone in the rat. *Physiol. Behav.* 58, 409–413.
- Almeida, S.S., Duntas, L.H., Dye, L., Nunes, M.L., Prasad, C., Rocha, J.B.T., Wainwright, P., Zaia, C.T.B.V., Guedes, R.C.A., 2002. Nutrition and brain function: a multi-disciplinary virtual symposium. *Nutr. Neurosci.* 5, 311–320.
- Arase, K., York, D.A., Shimizu, H., Shargill, N., Bray, G.A., 1988. Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am. J. Phys.* 255, E255–E259.

- Bittencourt, J.C., Vaughan, J., Arias, C., Rissman, R.A., Vale, W.W., Sawchenko, P.E., 1999. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J. Comp. Neurol.* 415, 285–312.
- Bradbury, M.J., McBurnie, M.I., Denton, D.A., Lee, K.F., Vale, W.W., 2000. Modulation of urocortin-induced hypophagia and weight loss by corticotropin-releasing factor receptor 1 deficiency in mice. *Endocrinology* 141, 2715–2724.
- Bredow, S., Kacsóh, B., Obál Jr., F., Fang, J., Krueger, J.M., 1994. Increase of prolactin mRNA in the rat hypothalamus after intracerebroventricular injection of VIP or PACAP. *Brain Res.* 660, 301–308.
- Chalmers, D.T., Lovenberg, T.W., De Souza, E.B., 1995. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J. Neurosci.* 15, 6340–6350.
- Chotiaw, C., Harris, R.B.S., 2008. Antagonism of specific corticotropin-releasing factor receptor subtypes selectively modifies weight loss in restrained rats. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 295, R1762–R1773.
- Contarino, A., Dellu, F., Koob, G.F., Smith, G.W., Lee, K.-F., Vale, W.W., Gold, L.H., 2000. Dissociation of locomotor activation and suppression of food intake induced by CRF in CRFR1-deficient mice. *Endocrinology* 141, 2698–2702.
- Dogrukul-Ak, D., Banks, W.A., Tuncel, N., Tuncel, M., 2003. Passage of vasoactive intestinal peptide across the blood–brain barrier. *Peptides* 24, 437–444.
- Dogrukul-Ak, D., Tore, F., Tuncel, N., 2004. Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood–brain barrier: therapeutic effects. *Curr. Pharm. Des.* 10, 1325–1340.
- Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., Elmquist, J.K., 1998. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21, 1375–1385.
- Falholt, K., Lund, B., Falholt, W., 1973. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma. *Clin. Chim. Acta* 46, 105–111.
- Gerhold, L.M., Horvath, T.L., Freeman, M.E., 2001. Vasoactive intestinal peptide fibers innervate neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res.* 919, 48–56.
- Ghourab, S., Beale, K.E., Semjonous, N.M., Simpson, K.A., Martin, N.M., Gbatei, M.A., Bloom, S.R., Smith, K.L., 2011. Intracerebroventricular administration of vasoactive intestinal peptide inhibits food intake. *Regul. Pept.* 172, 8–15.
- Guillemin, R., Clayton, G.W., Lipscomb, H.S., Smith, J.D., 1959. Fluorometric measurement of rat plasma and adrenal corticosterone concentration; a note on technical details. *J. Lab. Clin. Med.* 53, 830–832.
- Gutman, D.A., Owens, M.J., Skelton, K.H., Thrivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., 2003. The corticotropin-releasing factor 1 receptor antagonist R121919 attenuates the behavioral and endocrine responses to stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 874–880.
- Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., Schwartz, M.W., 1998. Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.* 1, 271–272.
- Henckens, M.J.A.G., Deussing, J.M., Chen, A., 2016. Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor–urocortin system in stress. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 636–651.
- Hoffmann, G.E., Murphy, A.Z., 2000. Anatomical markers of activity in hypothalamic systems. In: Conn, P.M., Freeman, M.E. (Eds.), *Neuroendocrinology*. Human Press, New Jersey, pp. 541–552.
- Hotta, M., Shibasaki, T., Arai, K., Demura, H., 1999. Corticotropin-releasing factor

- receptor type 1 mediates emotional stress-induced inhibition of food intake and behavioral changes in rats. *Brain Res.* 823, 221–225.
- Imaki, T., Vale, W., Sawchenko, P.E., 1992. Regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in neuroendocrine and autonomic neurons by osmotic stimulation and volume loading. *Neuroendocrinology* 56, 633–640.
- Itoh, S., Hirota, R., Katsuura, G., 1982. Effect of cholecystokinin octapeptide and vasoactive intestinal polypeptide on adrenocortical secretion in the rat. *Jpn. J. Physiol.* 32, 553–560.
- Joo, K.M., Chung, Y.H., Kim, M.K., Nam, R.H., Lee, B.L., Lee, K.H., Cha, C.I., 2004. Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 476, 388–413.
- Khan, M.S.I., Cline, M.A., Aramaki, T., Ueda, H., Tachibana, T., 2013. Feeding response following central administration of chicken vasoactive intestinal peptide in chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 184, 61–66.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408.
- Lovenberg, T.W., Liaw, C.W., Grigoriadis, D.E., Clevenger, W., Chalmers, D.T., De Souza, E.B., Oltersdorf, T., 1995. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 836–840.
- Lu, X.-Y., Barsh, G.S., Akil, H., Watson, S.J., 2003. Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J. Neurosci.* 23, 7863–7872.
- Martins, A.B., Garnica-Siqueira, M.C., Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., Uchôa, E.T., 2018. Oxytocin participates on the effects of vasoactive intestinal peptide on food intake and plasma parameters. *Mol. Cell. Biochem.* 437, 177–183.
- Matsuda, K., Maruyama, K., Nakamachi, T., Miura, T., Uchiyama, M., Shioda, S., 2005. Inhibitory effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides* 26, 1611–1616.
- Matsuda, K., Maruyama, K., Nakamachi, T., Miura, T., Shioda, S., 2006. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on food intake and locomotor activity in the goldfish, *Carassius auratus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070, 417–421.
- Miskowiak, J., Andersen, B., Stadil, F., Fahrenkrug, J., 1985. Meal stimulated levels of pancreatic polypeptide (PP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in gastro-plasty for morbid obesity. *Regul. Pept.* 12, 231–236.
- Nagai, N., Kajikawa, H., Sasaki, T., Nagai, K., Nakagawa, H., 1994. Hyperglycemic response to intracranial injection of vasoactive intestinal peptide. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 17, 29–34.
- Nunn, N., Womack, M., Dart, C., Barrett-Jolley, R., 2011. Function and pharmacology of spinally-projecting sympathetic pre-autonomic neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Curr. Neuropharmacol.* 9, 262–277.
- Olson, B.R., Drutarosky, M.D., Stricker, E.M., Verbalis, J.G., 1991. Brain oxytocin receptors mediate corticotropin-releasing hormone-induced anorexia. *Am. J. Phys.* 260, R448–R452.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Pelleymounter, M.A., Joppa, M., Carmouche, M., Cullen, M.J., Brown, B., Murphy, B., Grigoriadis, D.E., Ling, N., Foster, A.C., 2000. Role of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in the anorexic syndrome induced by CRF. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 799–806.
- Perrin, M.H., Vale, W.W., 1999. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 885, 312–328.
- Piekut, D.T., Joseph, S.A., 1986. Co-existence of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular paraventricular neurons of rat hypothalamus. *Peptides* 7, 891–898.
- Reyes, T.M., Lewis, K., Perrin, M.H., Kunitake, K.S., Vaughan, J., Arias, C.A., Hogensch, J.B., Gulyas, J., Rivier, J., Vale, W.W., Sawchenko, P.E., 2001. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2843–2848.
- Richter, W.O., Robl, H., Schwandt, P., 1989. Human glucagon and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) stimulate free fatty acid release from human adipose tissue in vitro. *Peptides* 10, 333–335.
- Rivier, C., Vale, W., 1983. Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo. *Endocrinology* 113, 939–942.
- Rorato, R., Castro, M., Borges, B.C., Benedetti, M., Germano, C.M., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L., 2008. Adrenalectomy enhances endotoxemia-induced hypophagia: higher activation of corticotropin-releasing factor and proopiomelanocortin hypothalamic neurons. *Horm. Behav.* 54, 134–142.
- Sakamoto, R., Matsubara, E., Nomura, M., Wang, L., Kawahara, Y., Yanase, T., Nawata, H., Takayanagi, R., 2013. Roles for corticotropin-releasing factor receptor type 1 in energy homeostasis in mice. *Metabolism* 62, 1739–1748.
- Satoh, N., Ogawa, Y., Katsuura, G., Tsuji, T., Masuzaki, H., Hiraoka, J., Okazaki, T., Tamaki, M., Hayase, M., Yoshimasa, Y., Nishi, S., Hosoda, K., Nakao, K., 1997. Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH) lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinology* 138, 947–954.
- Sawchenko, P.E., Swanson, L.W., Vale, W.W., 1984. Corticotropin-releasing factor: co-expression within distinct subsets of oxytocin-, vasopressin-, and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat. *J. Neurosci.* 4, 1118–1129.
- Schutzberg, M., Hokfelt, T., Lundberg, J.M., Fuxe, K., Mutt, V., Said, S., 1980. Distribution of VIP neurons in the peripheral and central nervous system. *Endocrinol. Jpn.* 1, 23–30.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D.J., Seeley, R.J., Baskin, D.G., 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661–671.
- Sekino, A., Ohata, H., Mano-Otagiri, A., Arai, K., Shibasaki, T., 2004. Both corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 are involved in stress-induced inhibition of food intake in rats. *Psychopharmacology* 176, 30–38.
- Sheward, W.J., Lutz, E.M., Harmar, A.J., 1995. The distribution of vasoactive intestinal peptide2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization. *Neuroscience* 67, 409–418.
- Tachibana, T., Saito, S., Tomonaga, S., Takagi, T., Saito, E.S., Boswell, T., Furuse, M., 2003. Intracerebroventricular injection of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits feeding in chicks. *Neurosci. Lett.* 339, 203–206.
- Tachibana, T., Saito, E.S., Takahashi, H., Saito, S., Tomonaga, S., Boswell, T., Furuse, M., 2004. Anorexigenic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in the chick brain are mediated by corticotropin-releasing factor. *Regul. Pept.* 120, 99–105.
- Trinder, P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6, 24.
- Uchoa, E.T., da Silva, L.E., de Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L., 2010. Corticotropin-releasing factor mediates hypophagia after adrenalectomy, increasing meal-related satiety responses. *Horm. Behav.* 58, 714–719.
- Usdin, T.E.D.B., Bonner, T.O.M.I., Mezey, R.V.A., 1994. Two receptors for vasoactive intestinal with similar and complementary. *Endocrinology* 135, 2662–2680.
- Van Pett, K., Viau, V., Bittencourt, J.C., Chan, R.K.W., Li, H.Y., Arias, C., Prins, G.S., Perrin, M., Vale, W., Sawchenko, P.E., 2000. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of bat and mouse. *J. Comp. Neurol.* 428, 191–212.
- Vaughan, J., Donaldson, C., Bittencourt, J.C., Perrin, M.H., Lewis, K., Sutton, S., Lovejoy, D., Rivier, C., Rivier, J., Sawchenko, P.E., Vale, W., 1995. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378, 287–292.
- Wang, J., Akabayashi, A., Dourmashkin, J., Yu, H.J., Alexander, J.T., Chae, H.J., Leibowitz, S.F., 1998. Neuropeptide Y in relation to carbohydrate intake, corticosterone and dietary obesity. *Brain Res.* 802, 75–88.
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D., Schwartz, M.W., 1998. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280, 1378–1383.
- Yee, J.R., Kenkel, W.M., Frijling, J.L., Doodhia, S., Onishi, K.G., Tovar, S., Saber, M.J., Lewis, G.F., Liu, W., Porges, S.W., Carter, C.S., 2016. Oxytocin promotes functional coupling between paraventricular nucleus and both sympathetic and para-sympathetic cardioregulatory nuclei. *Horm. Behav.* 80, 82–91.
- Yosten, G.L.C., Samson, W.K., 2010. The anorexigenic and hypertensive effects of nes-fat1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 298, 1642–1647.
- Yu, R., Zhang, H., Huang, L., Liu, X., Chen, J., 2011. Anti-hyperglycemic, antioxidant and anti-inflammatory effects of VIP and a VPAC1 agonist on streptozotocin-induced diabetic mice. *Peptides* 32, 216–222.
- Zorilla, E.P., Schulteis, G., Ormsby, A., Klaassen, A., Ling, N., McCarthy, J.R., Koob, G.F., De Souza, E.B., 2002. Urocortin shares the memory modulating effects of corticotropin-releasing factor (CRF): mediation by CRF1 receptors. *Brain Res.* 952, 200–210.