



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRESSA BUSETTI MARTINS

**PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO E POLIPEPTÍDEO
HIPOFISÁRIO ATIVADOR DE ADENILCICLASE NA
HOMEOSTASE ENERGÉTICA:
PAPEL DOS ESTRÓGENOS**

Londrina
2022

ANDRESSA BUSETTI MARTINS

**PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO E POLIPEPTÍDEO
HIPOFISÁRIO ATIVADOR DE ADENILCICLASE NA
HOMEOSTASE ENERGÉTICA:
PAPEL DOS ESTRÓGENOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cássia Thaïs B. V. Zaia

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M386 MARTINS, ANDRESSA.
Peptídeo intestinal vasoativo e polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária em ratos na homeostase energética: papel do núcleo arqueado do hipotálamo e dos estrógenos. / ANDRESSA MARTINS. - Londrina, 2022.
70 f. : il.

Orientador: Cassia Thaís Bussamra Vieira Zaia.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2022.
Inclui bibliografia.

1. imuno-histoquímica - Tese. 2. PCR - Tese. 3. GLICEMIA - Tese. 4. PVN - Tese. I. Bussamra Vieira Zaia, Cassia Thaís . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

ANDRESSA BUSETTI MARTINS

**PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO E POLIPEPTÍDEO
HIPOFISÁRIO ATIVADOR DE ADENILCICLASE NA
HOMEOSTASE ENERGÉTICA:
PAPEL DOS ESTRÓGENOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Cássia Thaís B. V. Zaia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Rodrigo César Rorato
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Profa. Dra. Priscila Cassola
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Londrina, 23 de fevereiro de 2022.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dra^a Thaïs Zaia, minha orientadora, pelo carinho e dedicação durante todos esses anos que estamos trabalhando juntas, demonstrados todos os dias, através de sua constante presença, acompanhando e orientando cada fase deste trabalho, exemplo de profissional e amiga, como uma segunda mãe.

Ao Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa, que atuou como co-orientador nessa jornada, ajudando, ensinando, animando e acrescentando demais, não só neste trabalho, mas em tudo que fizemos, obrigada pela confiança e pelo apoio, a Prof^a Dra^a Cristiane Motta Leite, pela colaboração neste trabalho sempre que necessário.

Aos meus pais, Ivanir e Luiz, pelo apoio, compreensão, carinho e amor. Por proporcionar as melhores condições para meu crescimento, por acreditarem em meus objetivos, por sempre me aconselharem e estarem ao meu lado sempre, independente da situação, me mostrando que juntos “nós somos nós”. E a minha irmã, Larissa, por me aturar e manter-se sempre firme e confiante durante todos esses anos.

Aos meus amigos, aos novos e aos velhos onde citar nomes seria cometer uma gafe por serem tantos, mas especialmente os grandes amigos que fiz no podcast do Beerholder cego e o grupo Dona Marocas, que acompanharam alegrias e tristezas.

Não posso deixar de agradecer profundamente as amigas e parceiras de laboratório, Larissa, Camila, Ana Luiza, Rhauani, Daniela, Marcela e Érica, que são mais que amigas, são minha família criada e crescida no LaFiNeM, sem elas as noites seriam ainda mais escuras e o trabalho um fardo difícil demais. Levo vocês comigo.

Aos meus companheiros de laboratório: Fabiano, Lucas e Eloisa. Obrigada pela confiança, pela compreensão e pelas risadas, vocês são maravilhosos.

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

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

À CAPES pela bolsa de doutoramento.

MARTINS, Andressa Buseti. **Peptídeo intestinal vasoativo e polipeptídeo hipofisário ativador de adenilciclase na homeostase energética: papel dos estrógenos.** 2022. 74 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e peptídeo ativador de adenilato ciclase (PACAP) são peptídeos anorexígenos que atuam no hipotálamo participando do controle neural de ingestão alimentar e do metabolismo energético. Os estrógenos também participam do controle da homeostase energética e têm papel inibitório sobre a ingestão alimentar em fêmeas. O presente trabalho, visou elucidar a ação do VIP e do PACAP e entender o papel dos estrógenos nas ações destes peptídeos. Para isso, todos os ratos (Wistar machos ou fêmeas adultos) foram submetidos à estereotaxia para implantação de cânula guia intracerebroventricular (ICV, ventrículo lateral) ou no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC). As fêmeas, imediatamente após a estereotaxia, foram também ovariectomizadas bilateralmente e durante sete dias, receberam reposição hormonal (cipionato de estradiol; 10 µg/0,2 mL/rata, sc) ou o veículo de diluição (óleo de milho; 0,2 mL, sc). Após microinjeção de VIP ou PACAP, avaliou-se a ingestão alimentar, fez-se eutanásia para coleta de sangue para as análises bioquímicas e do cérebro para PCR em tempo real ou fez-se perfusão para análises de imuno-histoquímica. Nos machos, tanto VIP quanto PACAP microinjetados no ARC ou ICV promoveram menor ingestão de alimentos, aumento das concentrações plasmáticas de glicose e ácidos graxos livres e diminuição plasmática de triglicerídeos, lipídeos totais e colesterol. Assim, o ARC pode ser apontado como um importante local de ação de VIP e PACAP para induzir hipofagia e alterações metabólicas plasmáticas. Nas fêmeas, os dados mostraram a participação dos estrógenos em promover hiperglicemia e redução da ingestão alimentar, entretanto os estrógenos parecem ter participação mais ativa nas ações do PACAP, sendo ressaltadas pelo aumento da expressão PAC1 e dos neurônios imunorreativos especialmente no ARC. Assim, sugere-se que os estrógenos atuam juntamente com PACAP no ARC e de forma indireta sobre as ações do VIP.

Palavras-chave: PVN; imuno-histoquímica; glicemia; corticosterona; PCR.

MARTINS, Andressa Buseti. **Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylcyclase-activating polypeptide in energy homeostasis: role of estrogens.** 2022. 74 p. Thesis (Doctorate in Physiological Sciences) - State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Vasoactive intestinal peptide (VIP) and adenylate cyclase activating peptide (PACAP) are anorectic peptides that act on the hypothalamus participating in the neural control of food intake and energy metabolism. Estrogens also participate in the control of energy homeostasis and have an inhibitory role on food intake in females. The present work aimed to elucidate the action of VIP and PACAP and to understand the role of estrogens in the actions of these peptides. For this, all rats (adult male or female Wistar) were submitted to stereotaxis for implantation of an intracerebroventricular guide cannula (ICV, lateral ventricle) or in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC). The females, immediately after stereotaxis, were also bilaterally ovariectomized and, for seven days, received hormone replacement (estradiol cypionate; 10 µg/0.2 mL/rats, sc) or the dilution vehicle (corn oil; 0.2 mL, sc). After microinjection of VIP or PACAP, food intake was evaluated, blood was euthanized for biochemical and brain analysis for real-time PCR, or perfusion was performed for immunohistochemical analysis. In males, both VIP and PACAP microinjected into the ARC or ICV promoted lower food intake, increased plasma concentrations of glucose and free fatty acids, and decreased plasma triglycerides, total lipids and cholesterol. Thus, the ARC can be pointed out as an important site of action of VIP and PACAP to induce hypophagia and plasma metabolic alterations. In females, the data showed the participation of estrogens in promoting hyperglycemia and reduced food intake, however estrogens seem to have a more active participation in the actions of PACAP, being highlighted by the increase of PAC1 expression and of immunoreactive neurons especially in the ARC. Thus, it is suggested that estrogens act together with PACAP in the ARC and indirectly on the actions of the VIP.

Key words: PVN; immunohistochemistry; blood glucose; corticosterone; PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Desenhos experimentais do protocolo 1. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP no núcleo arqueado do hipotálamo nos parâmetros metabólicos plasmáticos (A) e ingestão alimentar (B)18
- Figura 2** - Desenhos experimentais do protocolo 2. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP no ventrículo lateral sobre parâmetros metabólicos plasmáticos e ingestão alimentar18
- Figura 3** - Desenhos experimentais do protocolo 3. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP em neurônios imunorreativos de antígenos relacionados a Fos (FRA) no ARC19
- Figura 4** - Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) (A), ácidos graxos livres (μ moles/dL) (B), triglicerídeos (mg/dL) (C), colesterol total (mg/dL) (D), e lipídios totais (mg/dL) (E) após microinjeção (6 μ L, 0,3 μ L/min em 20 min, com auxílio de bomba de microinfusão) de Veículo (solução salina estéril, NaCl 0,9%), peptídeo intestinal vasoativo (VIP; 40 ng/g) ou polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP; 4,0 ng/g) no núcleo arqueado do hipotálamo. O número de animais é mostrado dentro das barras dos gráficos. Os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste post hoc de Dunnett (grupo controle: Veículo em cada tempo) e estão apresentados como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus respectivo grupo Veículo22
- Figura 5** - Ingestão de alimentos (g) após microinjeção (6 μ L, 0,3 μ L/min em 20 min, com o auxílio de uma bomba de microinfusão) de Veículo (solução salina estéril, NaCl 0,9%), peptídeo intestinal vasoativo (VIP; 40 ng/g) ou polipeptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária (PACAP; 4,0 ng/g) no núcleo arqueado do hipotálamo pela manhã (entre 08:00 e 10:00) ou à noite (entre 20:00 e 22:00). O número de animais é mostrado dentro das barras. Os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste post hoc de Dunnett (grupo controle: Veículo em cada

período) e estão apresentados como média \pm SEM. * $p < 0,0001$ versus respectivo grupo Veículo23

Figura 6 - Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) (A, B), ácidos graxos livres (μ moles/dL) (C, D) e corticosterona (μ g/dL) (E, F) após microinjeção (6 μ L, 6 μ L/min em 1 min) de Veículo (solução salina estéril, 0,9% NaCl), peptídeo intestinal vasoativo (VIP; 40 ng/g) ou polipeptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária (PACAP; 4,0 ng/g) no ventrículo lateral. O número de animais é mostrado dentro das barras. Os dados são expressos como média \pm SEM para o teste t (A – E) e mediana (1^o-3^o intervalo interquartil) para o teste de Mann-Whitney (F). * $p < 0,05$ versus respectivo grupo Veículo25

Figura 7 - Ingestão de alimentos (g) após microinjeção (6 μ L, 6 μ L/min em 1 min) de Veículo (solução salina estéril, NaCl a 0,9%), peptídeo intestinal vasoativo (A, VIP, 40 ng/g) ou adenilato hipofisário polipeptídeo ativador da ciclase (B, PACAP, 4,0 ng/g) no ventrículo lateral. O número de animais é mostrado dentro das barras. Os dados são expressos como média \pm SEM para o teste t (B) e mediana (1^o-3^o intervalo interquartil) para o teste de Mann-Whitney (A). * $p < 0,05$ versus respectivo grupo Veículo26

Figura 8 - Número de neurônios imunorreativos a antígenos relacionados a Fos (FRA-ir) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) após microinjeção (6 μ L, 6 μ L/min em 1 min) de Veículo (solução salina estéril, NaCl a 0,9%), peptídeo intestinal vasoativo (A, VIP, 40 ng/g) ou polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (B, PACAP, 4,0 ng/g) no ventrículo lateral. Fotomicrografias representativas (ampliação 10x) de imunohistoquímica para neurônios FRA-positivos no ARC após Veículo (C e D), VIP (E) ou PACAP (F). O número de animais é mostrado dentro das barras. Os dados foram analisados pelo teste t e são apresentados como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. respectivo grupo de veículos. A barra de escala representa 100 μ m (ampliação de 100x).....27

- Figura 9** - Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP no ARC. VIP: peptídeo intestinal vasoativo. PACAP: polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária. PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo. ARC: núcleo arqueado do hipotálamo. NPY/AgRP: neuropeptídeo Y/proteína relacionada ao gene Agouti. α -MSH: hormônio estimulante de α -melanócitos. CRH: hormônio liberador de corticotropina. OT: hormônio ocitocina33
- Figura 10** - Valores de ingestão alimentar (A), concentrações plasmáticas de glicose (B), ácidos graxos livres (C) e corticosterona (D) de ratas ovariectomizadas bilateralmente (OVX) tratadas com estradiol (E; 10 μ g/0,2 mL/rata, sc) ou veículo (O; óleo de milho; 0,2 mL sc) e microinjetadas ICV (ventrículo lateral direito) com salina (0,9%), peptídeo intestinal vasoativo (VIP; 4,0 ng/g em 5 μ L; 2,5 μ L/min) ou polipeptídeo hipofisário ativador de adenilciclase (PACAP; 4,0 ng/g em 5 μ L; 2,5 μ L/min). Os dados são expressos como média \pm SEM. *Diferente do grupo Salina. #Diferente do grupo OVX+O50
- Figura 11** - Número de neurônios imunorreativos a antígenos relacionados a Fos (FRA-ir) de ratas ovariectomizadas bilateralmente (OVX) tratadas com estradiol (E; 10 μ g/0,2 mL/rata, sc) ou veículo (O; óleo de milho; 0,2 mL sc) e microinjetadas ICV (ventrículo lateral) com Salina (0,9%), peptídeo intestinal vasoativo (VIP; 4,0 ng/g em 5 μ L; 2,5 μ L/min) ou polipeptídeo hipofisário ativador de adenilciclase (PACAP; 4,0 ng/g em 5 μ L; 2,5 μ L/min). A e C: núcleo arqueado do hipotálamo (ARC). B e D: núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Os dados foram analisados pelo teste t e são apresentados como média \pm SEM. *Diferente do grupo Salina ($p < 0,05$). #Diferente do grupo OVX+O ($p < 0,05$)52
- Figura 12** - Expressão relativa do RNAm do VPAC2 no ARC e PVN de ratas ovariectomizadas bilateralmente (OVX) tratadas com estradiol (E; 10 μ g/0,2 mL/rata, s.) ou veículo (O; óleo de milho; 0,2 mL sc). Os dados são expressos em unidades arbitrárias e

como média \pm SEM. *Diferente do grupo Salina. #Diferente do grupo OVX+O.....53

Figura 13 - Expressão relativa do RNAm do PAC1 no ARC e PVN de ratas ovariectomizadas bilateralmente (OVX) tratadas com estradiol (E; 10 μ g/0,2 mL/rata, sc) ou veículo (O; óleo de milho; 0,2 mL sc). Os dados são expressos em unidades arbitrárias e como média \pm SEM. *Diferente do grupo Salina. #Diferente do grupo OVX+O.....54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRP	proteína relacionada ao gene Agouti
ARC	núcleo arqueado do hipotálamo
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
Ct	ciclo de limiar
DAB	diaminobenzidina
E	estradiol
FRA	neurônios imunorreativos aos antígenos relacionados ao <i>Fos</i> (<i>Fos-related antigens</i>)
ICV	intracerebroventricular
ip	intraperitoneal
NPY	neuropeptídeo Y
OT	ocitocina
OVX	ovariectomia
OVX	ovariectomia bilateral
OVX+E	ovariectomia e tratamento com cipionato de estradiol
OVX+O	ovariectomia e tratamento com óleo de milho
PAC1	receptor de VIP tipo 1 ou VPAC1
PACAP	peptídeo ativador de adenilato ciclase
PB	tampão fosfato
PC	peso corporal
PCR	reação em cadeia da polimerase
POMC	proopiomelanocortina
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo
SNC	sistema nervoso central
VIP	peptídeo intestinal vasoativo
VPAC1	receptor de VIP tipo 1
VPAC2	receptor de VIP tipo 2
α -MSH	hormônio estimulante de α -melanócitos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	OBJETIVOS	15
3	METODOLOGIA	15
4	ARTIGO I	16
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1.1	Animais.....	16
4.1.2	Drogas.....	16
4.1.3	Procedimento Cirúrgico	17
4.1.4	Protocolos Experimentais	17
4.1.5	Procedimentos Analíticos	19
4.1.6	Perfusão, Preparação de Tecidos e Imuno-Histoquímica.....	19
4.1.7	Análise Histológica para Localização de Cânula	20
4.1.8	Análise Estatística	21
4.2	RESULTADOS.....	21
4.3	DISCUSSÃO	27
4.4	CONCLUSÃO	34
4.5	REFERÊNCIAS.....	34
5	ARTIGO II	42
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1.1	Animais.....	42
5.1.2	Drogas.....	42
5.1.3	Protocolos Experimentais	43
5.1.4	Procedimentos Cirúrgicos.....	44
5.1.5	Análises Bioquímicas.....	45
5.1.6	Análise Histológica	46
5.1.7	Perfusão de Cérebro	46
5.1.8	Imuno-Histoquímica.....	47

5.1.9	Microdissecção, Isolamento de RNA Total e PCR Quantitativo em Tempo Real	48
5.1.10	Análise Estatística	48
5.2	RESULTADOS	48
5.3	DISCUSSÃO	55
5.4	CONCLUSÃO	60
5.5	REFERÊNCIAS	61
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	ANEXOS	72
	ANEXO 1 Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL	72
	ANEXO 2 Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL	73
	APÊNDICE	74
	APÊNDICE 1	74

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os mecanismos de regulação fisiológica e do controle metabólico são complexos e envolvem geralmente o sistema nervoso central, mais especificamente áreas hipotalâmicas, e tecidos periféricos (OLLER DO NASCIMENTO CURI et al., 1990; WOODS et al., 1998). O núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo participa do controle da ingestão alimentar e do peso corporal (KOHNO;YADA, 2012; BOURET et al, 2004) e é responsivo a hormônios e nutrientes como insulina, leptina e glicose (CONE et al., 2004). Esses sinais levam a mudanças na expressão de neuropeptídeos associados à regulação da ingestão de alimentos e metabolismo lipídico (WORTLEY et al., 2004; CONE, et al., 2001; HAHN et al., 1998; JHANWAR-UNIYAL et al., 1990).

O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) é um peptídeo de 28 resíduos de aminoácidos pertencente à família do glucagon-secretina, que foi primeiramente isolado do trato gastrointestinal (SAID; MUTT, 1970) e posteriormente do hipotálamo (TAYLOR; PERT, 1979). O VIP está presente no núcleo paraventricular (PVN) (MORIN et al., 1994), estimula a síntese de NPY (BALBI; ALLEN, 1993) e participa de vias metabólicas induzindo a glicogenólise hepática pela ativação do AMPc (MAGISTRETTI et al., 1981). Quando microinjetado no PVN de ratos, o VIP promove aumento de corticosterona, glicose e ácidos graxos livres, bem como diminuição da ingestão alimentar (LARA-GALVÃO, 2003; GHOURAB et al., 2011). Neurônios que expressam o VIP estão distribuídos em diversas áreas do sistema nervoso central (SNC), como córtex, hipocampo, núcleo amigdalóide, tálamo e hipotálamo. O núcleo supraquiasmático do hipotálamo apresenta grande concentração de neurônios VIPérgicos e está normalmente colocalizado com neurônios GABAérgicos. Os receptores de VIP, receptor de VIP tipo 1 (VPAC1 ou PAC1) e receptor de VIP tipo 2 (VPAC2), são receptores de proteínas acoplados à proteína G expressos em áreas do SNC associadas a funções neuroendócrinas (HUGHES et al., 2011; USDIN et al., 1994), sendo PAC1 seletivo para PACAP e VPAC2 sensitivo tanto para VIP quanto para PACAP (PISEGN.; WANK, 1993; HARMAR et al., 2002).

O polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP), um peptídeo com 27 ou 38 aminoácidos, também faz parte da família glucagon-secretina-VIP. O PACAP está amplamente distribuído no cérebro e nas glândulas endócrinas e

participa das respostas às funções emocionais e psicomotoras, sono e ingestão de água e alimentos (VAUDRY et al., 2009; ARIMURA, 1998; MIYATA et al., 1989). PACAP é expresso no ARC e PVN (RESCH et al., 2013; SEGAL et al., 2005), e os receptores PACAP, especialmente PAC1-R e VPAC2-R, são abundantemente expressos no hipotálamo (JOO et al., 2004; USDIN et al., 1994; SPENGLER, et al., 1993). A microinjeção de altas doses de PACAP na estria terminal resultou em aumento da concentração plasmática de corticosterona, anorexia e perda de peso em ratos machos e fêmeas (KOCHO-SHELLENBERG et al., 2014; LEZAK et al., 2014).

O controle da ingestão alimentar e do peso corpóreo também é regulado pelos esteroides ovarianos (BROWN; CLEGG, 2010). Os hormônios produzidos pelos ovários estão entre os fatores que influenciam a ingestão alimentar e ganho de peso em fêmeas. O estradiol influencia, em curto ou longo prazo, a homeostase do peso corporal (GEARY, 2001; GEARY, 2004). A retirada de estrógenos, pela ovariectomia, leva a mudanças no tamanho e na duração das refeições ocasionando hiperfagia e obesidade, e a reposição com estrógenos reverte esses efeitos (SANTOLLO; ECKEL, 2008; MESSINA et al., 2006). Além disso, há diminuição do consumo alimentar e do peso corpóreo durante o período de estro, fase de aumento das concentrações plasmáticas de estrógenos (SLONAKER, 1925; BROBECK et al., 1947). Verifica-se que há receptores de estradiol localizados na região parvocelular do PVN (SIMERLY et al., 1990) e propõem-se que o estradiol atue de forma direta e indireta para diminuir a ingestão de alimentos diminuindo a concentração de peptídeos orexígenos (BROWN; CLEGG, 2010) como o NPY (TITOLO et al., 2006), grelina (CLEGG et al., 2007; THAMMACHAROEN et al., 2008; FAULCONBRIDGE et al., 2003) e o hormônio concentrador de melanina (SANTOLLO; ECKEL., 2008; MESSINA et al., 2006).

Hong e colaboradores (2009) demonstraram um efeito diferencial da dieta hipercalórica em animais machos e fêmeas, de modo que os machos se apresentaram mais responsivos ao ganho de peso corporal e de tecido adiposo em respostas à dieta hipercalórica que fêmeas intactas, no entanto, a ovariectomia as tornou tão suscetíveis a desenvolverem o quadro de obesidade quanto os machos, demonstrando que a proteção contra a obesidade em fêmeas é eliminada pela ovariectomia. Além disso, os estrógenos apresentam um efeito protetor no desenvolvimento de obesidade induzida pela dieta hiperlipídica tanto em machos

(ZHU et al., 2014), quanto fêmeas intactas (LITWAK et al., 2014) e ovariectomizadas (RIANT et al., 2009; MATYŠKOVÁ et al., 2010; STUBBINS et al., 2012a, 2012b; ZHU et al., 2013). Adicionalmente, sabe-se que os estrógenos são capazes de modular os efeitos de diferentes tratamentos anorexígenos, de modo que o estradiol parece potencializar ou ser necessário para a resposta anorexígena desses diferentes tratamentos, tais como leptina e CCK (SILVA et al., 2010; GEARY, 2001).

Considerando que: 1) o ARC é um núcleo importante que participa do controle da ingestão alimentar e do balanço energético, 2) tanto o VIP quanto o PACAP têm demonstrado participar da regulação fisiológica desses processos, 3) há falta de dados sobre os efeitos de VIP e PACAP no ARC na homeostase energética, e 4) uma vez que parece haver uma interação entre os peptídeos VIP, PACAP com os estrógenos, e não há relatos na literatura do papel dos estrógenos nos efeitos dos do VIP, PACAP no controle da ingestão alimentar e do metabolismo energético, se faz relevante avaliar os de VIP e PACAP microinjetados no ARC ou intracerebroventricular (ICV) e seus efeitos sobre a ingestão de alimentos e parâmetros plasmáticos e ativação neuronal no PVN e ARC, juntamente com o papel desempenhado pelos estrógenos na ação desses peptídeos.

2 OBJETIVOS

Avaliar o papel de VIP e PACAP no núcleo arqueado do hipotálamo ou no ventrículo lateral e a participação dos estrógenos em sua ação, sobre a ingestão alimentar, parâmetros metabólicos plasmáticos, ativação neuronal e expressão de RNAm em ratos e ratas.

3 METODOLOGIA

Este trabalho está dividido em dois momentos diferentes, sendo: experimento com machos (**ARTIGO I**) e experimento com fêmeas (**ARTIGO II**).

4 ARTIGO I

O núcleo arqueado do hipotálamo contribui para o efeito hipofágico e alterações metabólicas plasmáticas induzidas pelo peptídeo intestinal vasoativo e polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária¹

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Animais

Ratos Wistar machos pesando 215 - 230 g foram usados para os protocolos de microinjeção no ARC, e ratos Wistar machos pesando 260 - 280 g foram usados para os protocolos de microinjeção ICV (n = 279). Esses animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL, em gaiolas coletivas com controle de luz (claro das 6h00 às 18h00) e temperatura (22 ± 2 °C). A menos que especificado de outra forma, os animais tiveram acesso *ad libitum* a ração peletizada para ratos e água, e os procedimentos experimentais foram conduzidos entre 8h00 e 12h00. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (Anexo 1: OF.CIRC.CEUA N° 135/2015, protocolo N° 4929.2015.80).

4.1.2 Drogas

As drogas utilizadas para os experimentos, microinjetadas no ventrículo lateral ou no ARC, foram: VIP (Sigma Co., CA), 40 ng/g de peso corporal (PC) (3 nmol/g), PACAP (Sigma Co., CA) 4,0 ng/g PC (0,35 nmol/g) ou Veículo (solução salina estéril: 0,9% NaCl). A dose de VIP e PACAP foi escolhida com base em publicações anteriores (ALEXANDER; SANDER, 1994; CHANCE et al., 1995; MARTINS et al., 2018).

¹ Artigo publicado na revista *Neurochemistry International* (Apêndice 1). Martins, A. B.; Brownlow, M. L.; Araújo, B. B.; Garnica-Siqueira, M. C.; Zaia, D. A. M.; Leite, C. M.; Zaia, C. T. B. V.; Uchoa, E. T. Arcuate nucleus of the hypothalamus contributes to the hypophagic effect and plasma metabolic changes induced by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neurochemistry International*, v. 155, art.105300, p. 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105300>.

4.1.3 Procedimento cirúrgico

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica. Os ratos foram anestesiados intraperitonealmente com 40 mg/kg de PC de pentobarbital de sódio (Nembutal) para os protocolos de microinjeção no ARC, ou um coquetel de cetamina (K, 100mg/kg de PC, 10%, Agener União, Apucarana, PR, Brasil) e cloridrato de xilazina (X, 20 mg/kg PC, 2%, Anasedan[®], Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) para os protocolos de microinjeção no ICV, e foram colocados em um instrumento estereotáxico (David Kopf Instruments, modelo 900). A cânula guia de aço inoxidável foi implantada no ARC ou ICV (ventrículo lateral direito) de acordo com as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (2009) (ARC: -3,8 mm caudal ao bregma, 10,2 mm da base do cérebro e 0,2 mm lateral ao seio sagital médio; ICV: -0,8 mm caudal ao bregma, -3,6 mm abaixo da calota craniana e -1,5 mm lateral à sutura sagital). Para os experimentos com animais não anestesiados, foram utilizados resina acrílica dentária e dois parafusos de joalheiro para fixar a cânula guia ao crânio. Após a cirurgia, os ratos receberam uma dose profilática de antibiótico (50.000 unidades de penicilina G: 0,1 mL por 100 g de peso corporal, por via intramuscular) e paracetamol (200 mg/kg de peso corporal, por via oral). A colocação da cânula foi verificada em todos os ratos seccionando o cérebro no final do experimento, sendo somente incluídos na análise de dados os ratos cuja área-alvo foi alcançada. Todos os experimentos com animais não anestesiados foram realizados 6 dias após a cirurgia para permitir recuperação completa dos mesmos.

4.1.4 Protocolos experimentais

Protocolo 1. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP no núcleo arqueado do hipotálamo sobre os parâmetros metabólicos plasmáticos e ingestão de alimentos:

No primeiro conjunto de protocolos (figura 1A), ratos anestesiados receberam imediatamente após a implantação da cânula no ARC, microinjeção de Veículo, VIP ou PACAP (6 μ L, 0,3 μ L/min em 20 min com o auxílio de uma bomba de microinfusão), e após 5, 10 ou 30 min, eles foram decapitados para coleta de sangue. No segundo conjunto de protocolos (figura 1B), os ratos ficaram restritos a alimentação por 3 horas (grupo Noite, experimentos entre 20 h e 22 h) ou por 24 horas (grupo Manhã, experimentos entre 8 h e 10 h) e receberam microinjeção no ARC do Veículo, VIP ou PACAP (6 μ L, 0,3 μ L/min em 20 min com o auxílio de uma bomba de microinfusão). Após 1 hora, foi oferecido alimento (50 g) e avaliado o consumo alimentar (g) após 120 min.

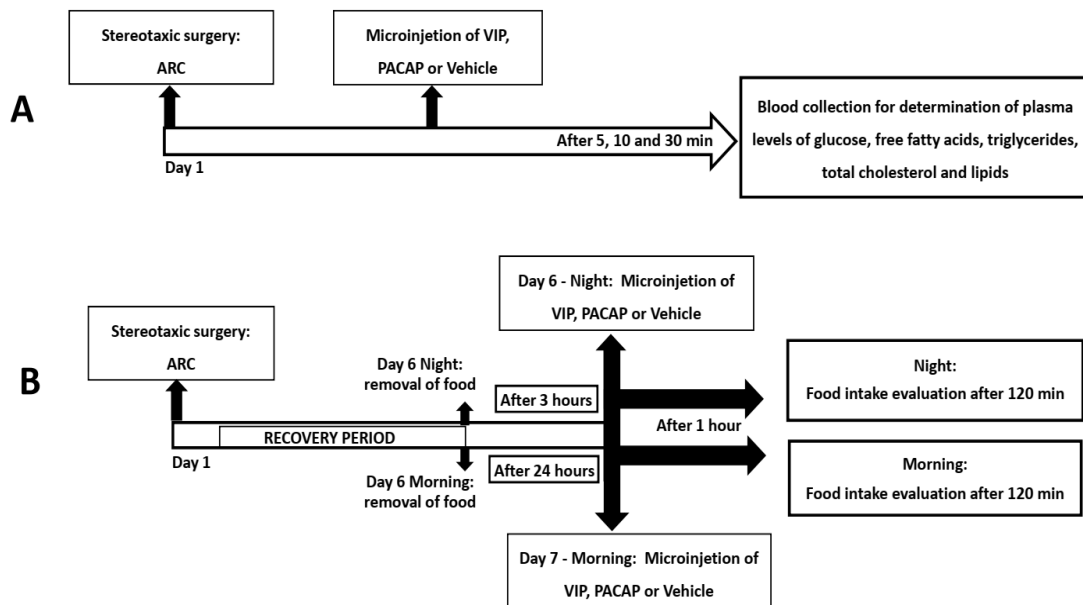


Figura 1. Desenhos experimentais do protocolo 1. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP no núcleo arqueado do hipotálamo nos parâmetros metabólicos plasmáticos (A) e ingestão alimentar (B).

Protocolo 2. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP no ventrículo lateral sobre os parâmetros metabólicos plasmáticos e ingestão de alimentos:

Neste conjunto de protocolos, após 16 horas de jejum, os animais não anestesiados receberam microinjeção ICV de Veículo, VIP ou PACAP (6 μ L, 6 μ L/min em 1 min), e após 15 min foram decapitados para coleta de sangue (figura 2). Em outro protocolo, após 16 horas de jejum, os animais não anestesiados receberam microinjeção ICV de Veículo, VIP ou PACAP (6 μ L, 6 μ L/min em 1 min), e após 15 min, todos os animais tiveram acesso à comida (50 g) e a ingestão alimentar foi quantificada (g) após 120 min.

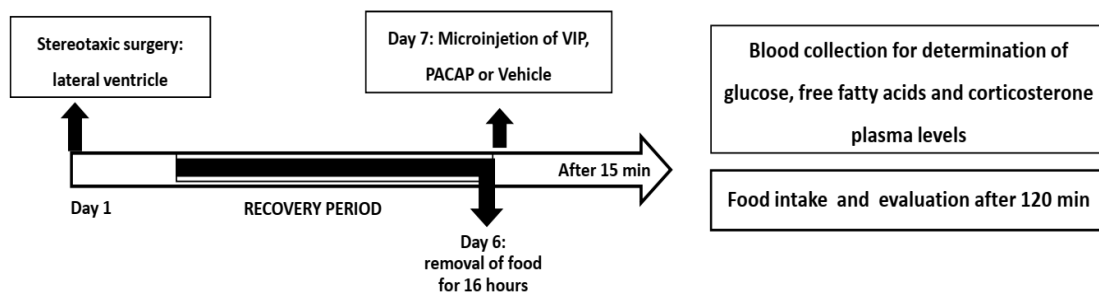


Figura 2. Desenhos experimentais do protocolo 2. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP no ventrículo lateral sobre parâmetros metabólicos plasmáticos e ingestão alimentar.

Protocolo 3. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP em neurônios imunorreativos de antígenos relacionados a Fos (FRA) no ARC:

Neste protocolo experimental (figura 3), após 16 horas de jejum, os animais não anestesiados receberam microinjeção ICV (6 μ L, 6 μ L/min em 1 min) de Veículo, VIP ou PACAP. Após 90 min, eles foram perfundidos transcárdialmente para coleta de tecido cerebral e ensaios de imuno-histoquímica (HOFFMAN et al., 1993; HOFFMAN; MURPHY, 2000).

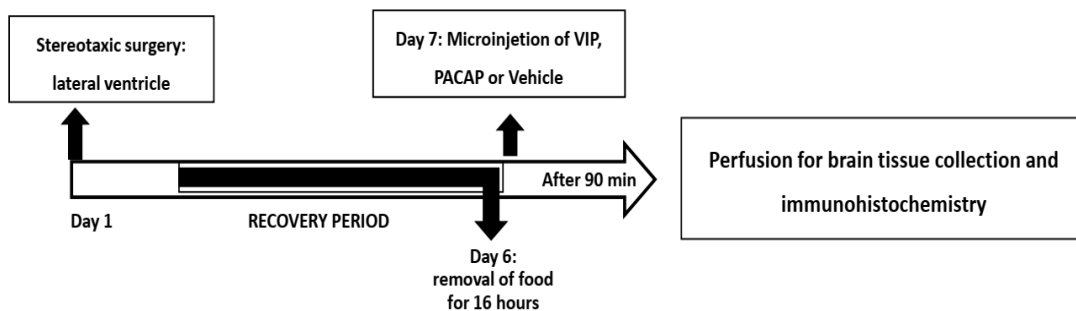


Figura 3. Desenhos experimentais do protocolo 3. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP em neurônios imunorreativos de antígenos relacionados a Fos (FRA) no ARC.

4.1.5 Procedimentos analíticos

Imediatamente após a decapitação, o sangue do tronco foi coletado em tubos heparinizados e centrifugados a 14.000 x *g* por 20 min a 4 °C. O plasma foi armazenado a -20 °C e usado para ensaios bioquímicos. A análise bioquímica foi realizada pelo método espectrofotométrico da glicemia (baseado na reação da peroxidase de Trinder, Trinder, 1969) (BioLiquid Glucose Commercial Kit, Laborclin, PR), ácidos graxos livres pelo método modificado de Falholt et al. (1973), triglicerídeos (Commercial KitGPO Trinder, Bio Diagnostic), colesterol total (baseado na reação da peroxidase de Allain, Allain et al., 1974) (Commercial Kit, Analisa, MG) e lipídios totais (por Commercial Kit, Bioclin, MG); para determinação de corticosterona no plasma foi usado método fluorimétrico modificado de Guillemin et al. (1958).

4.1.6 Perfusão, preparação de tecidos e imuno-histoquímica

Para a detecção de neurônios imunorreativos a antígenos relacionados ao Fos (FRA), os animais foram anestesiados intraperitonealmente com o coquetel K+X

e perfundidos de forma transcardíaca com 200 mL de solução salina isotônica (0,15 M) contendo heparina (1:80), seguido de 400 mL de solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M (PB, pH 7,4), utilizando bomba peristáltica com velocidade de 10 mL/min. O cérebro foi removido, fixado em paraformaldeído a 4% por 1 hora e armazenado a 4°C em 0,1 M PB contendo 30% de sacarose. Os tecidos cerebrais foram cortados em seções de 30 µm de espessura usando criostato, separados em aliquotas e mantidos em solução crioprotetora (0,1 M PB, etilenoglicol, glicerol – 3:2:1) a -20 °C. No primeiro dia, os cortes foram lavados três vezes com tampão fosfato (PB, 0,01 M, pH: 7,4) por 5 min cada e, após, a peroxidase endógena foi bloqueada com solução de H₂O₂ (30%) por 30 min. Em seguida, os cortes foram lavados três vezes em PB 0,01M por 5 min, e a ligação não específica foi bloqueada com albumina bovina 5% por uma hora. Subsequentemente, os cortes foram incubados durante a noite a 4 °C com anticorpo anti-FRA, criado em coelho (1:2000, K25, Santa Cruz). Após a lavagem, os cortes foram incubados com o segundo anticorpo (anti-coelho de cabra biotilado, 1:200, Vector) por 1 hora e depois lavados em PB. Após 1 hora de incubação em solução de avidina-biotina-peroxidase (1:200, ABC, Vectastain) e três lavagens em PB, diaminobenzidina (0,01% DAB) e cloreto de níquel foram utilizados como cromógenos para a detecção de FRA. As imagens foram adquiridas com o auxílio de um sistema de imagens acoplado a um microscópio (Motic). Neurônios imunorreativos FRA foram considerados quando exibiam um produto de imunorreação azul-preto conspícuo no núcleo da célula e foram quantificados manualmente com o auxílio do software *ImageJ* (*National Institutes of Health*), por participantes cegos ao protocolo experimental. O ARC foi identificado de acordo com Paxinos e Watson (2009) e foi considerado de -1,8 mm a -3,12 mm do bregma.

4.1.7 Análise histológica para localização de cânula

Os cérebros foram cuidadosamente removidos, após a eutanásia por decapitação, armazenados à temperatura de -80 °C e posteriormente fatiados com 30 µm de espessura, em criostato a -10°C, para avaliação da posição da cânula, segundo atlas de Paxinos e Watson (2009).

4.1.8 Análise estatística

As análises foram realizadas usando GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Uma análise exploratória foi realizada para avaliar a normalidade de distribuição (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Levene) para cada variável. Variáveis com distribuição normal e homogeneidade foram analisadas por ANOVA seguida de teste *post hoc* de Dunnett (experimentos com microinjeção no ARC) ou teste *t* de Student (experimentos ICV). Na ausência de distribuição normal e/ou homogeneidade de variância, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) para o teste *t* e ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett e como mediana (intervalo interquartil 1^o-3^o) para o teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

4.2 RESULTADOS

Protocolo 1. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP no núcleo arqueado do hipotálamo sobre os parâmetros metabólicos do plasma e ingestão de alimentos

A ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett mostrou que quando VIP foi microinjetado no ARC, as concentrações plasmáticas de glicose (figura 4A) e ácidos graxos livres (figura 4B) aumentaram ($p < 0,05$) após 10 min e 30 min de microinjeção, enquanto que a microinjeção de PACAP no ARC aumentou apenas transitoriamente ($p < 0,05$) a concentração de ácidos graxos livres após 10 min da microinjeção e não houve alteração da concentração de glicose. A microinjeção de PACAP no ARC, mas não VIP ($p > 0,05$), diminuiu os valores plasmáticos de triglicerídeos (figura 4C, $p < 0,017$) após 5 min, sem alterações após 10 min ($p = 0,125$) ou 30 min ($p = 0,691$) da microinjeção. A diminuição ($p < 0,05$) da concentração plasmática de colesterol foi observada após 5 min de microinjeção de VIP no ARC, sem efeitos de PACAP neste parâmetro (figura 4D). A concentração total de lipídios no plasma diminuiu ($p < 0,05$) após a microinjeção de VIP e PACAP em todos os tempos avaliados (figura 4E).

No ARC, a microinjeção de VIP ou PACAP também reduziu (ANOVA seguida de teste *post hoc* de Dunnett, $p < 0,0001$) a ingestão alimentar nos períodos Manhã e Noturno quando comparado ao grupo Veículo (figura 5).

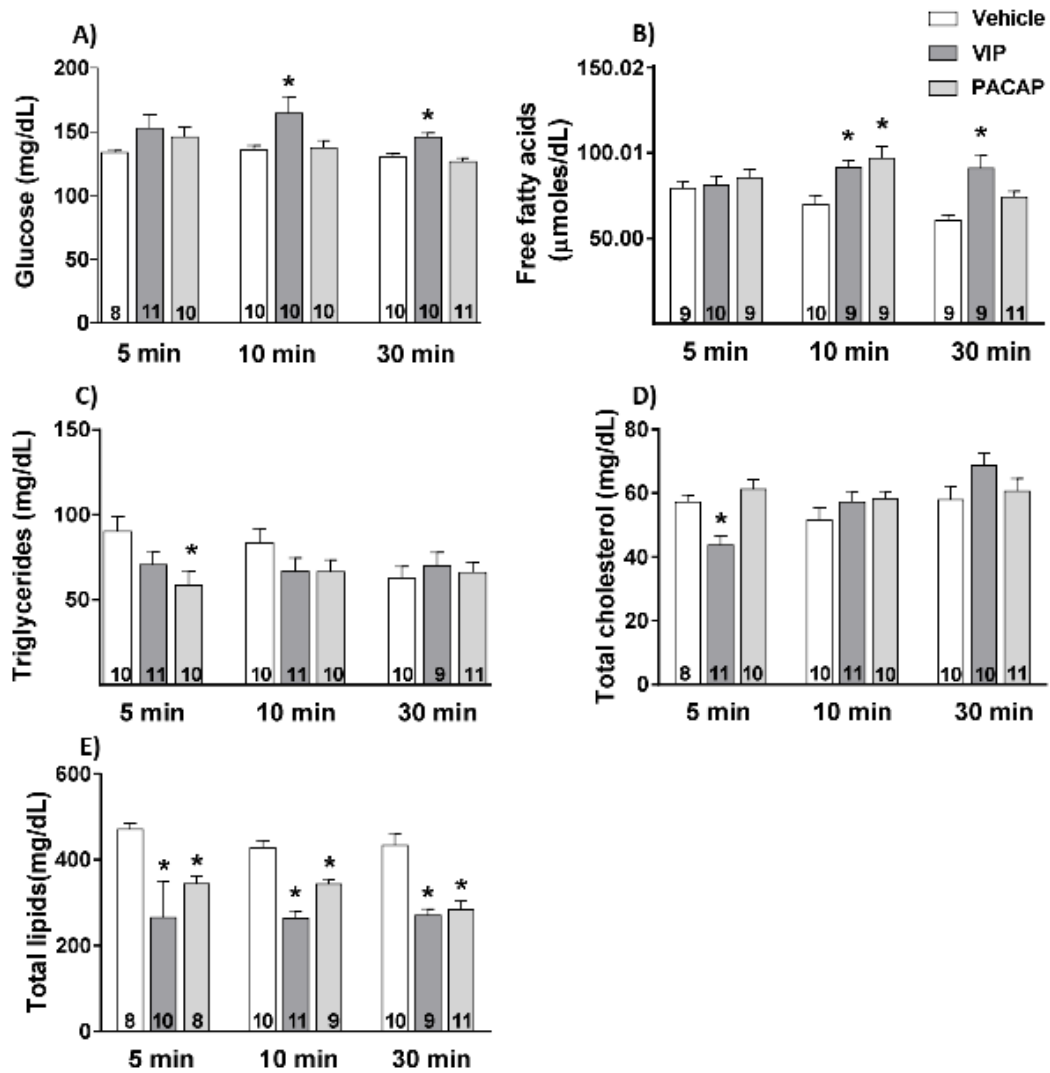


Figura 4. Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) (A), ácidos graxos livres (μmoles/dL) (B), triglicerídeos (mg/dL) (C), colesterol total (mg/dL) (D), e lipídios totais (mg/dL) (E) após microinjeção (6 μL, 0,3 μL/min em 20 min, com auxílio de bomba de microinfusão) de Veículo (solução salina estéril, NaCl 0,9%), peptídeo intestinal vasoativo (VIP; 40 ng/g) ou polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP; 4,0 ng/g) no núcleo arqueado do hipotálamo. O número de animais é mostrado dentro das barras dos gráficos. Os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste *post hoc* de Dunnett (grupo controle: Veículo em cada tempo) e estão apresentados como média ± SEM. *p<0,05 versus respectivo grupo Veículo.

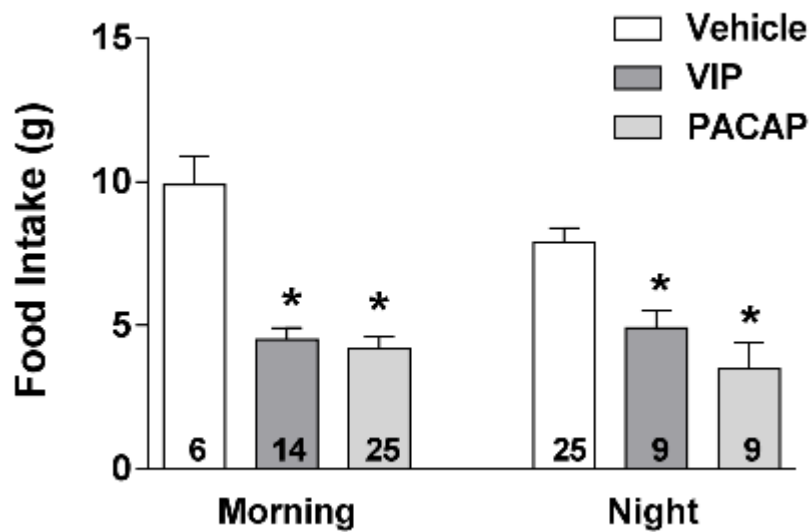


Figura 5. Ingestão de alimentos (g) após microinjeção (6 μ L, 0,3 μ L/min em 20 min, com o auxílio de uma bomba de microinfusão) de Veículo (solução salina estéril, NaCl 0,9%), peptídeo intestinal vasoativo (VIP; 40 ng/ g) ou polipeptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária (PACAP; 4,0 ng/g) no núcleo arqueado do hipotálamo pela manhã (entre 08:00 e 10:00) ou à noite (entre 20:00 e 22:00). O número de animais é mostrado dentro das barras. Os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste *post hoc* de Dunnett (grupo controle: Veículo em cada período) e estão apresentados como média \pm SEM. * $p < 0,0001$ versus respectivo grupo Veículo.

Protocolo 2. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP no ventrículo lateral sobre os parâmetros metabólicos plasmáticos e ingestão de alimentos:

A microinjeção ICV de VIP, mas não PACAP (figura 6B, D e F) aumentou a concentração plasmática de glicose e corticosterona (figura 6A e E, teste *t*,

$p < 0,0001$), e diminuiu a de ácidos graxos livres (figura 6C, teste t $p < 0,0001$). Tanto a microinjeção de VIP quanto de PACAP no ventrículo lateral reduziram a ingestão de alimentos (teste de Mann-Whitney para VIP e teste t para PACAP, $p < 0,05$) em comparação com o veículo (figura 7A e B, respectivamente).

Protocolo 3. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP em neurônios imunorreativos de antígenos relacionados a Fos (FRA) no ARC:

Houve um aumento no número de neurônios FRA-imunorreativos no ARC após as microinjeções de VIP (teste t , $p = 0,021$) e de PACAP (teste t , $p = 0,039$) quando comparado ao grupo Veículo (figura 8A e B, respectivamente). Fotomicrografias representativas de neurônios imunorreativos para FRA no ARC desses animais são mostradas na figura 8, painéis C-F.

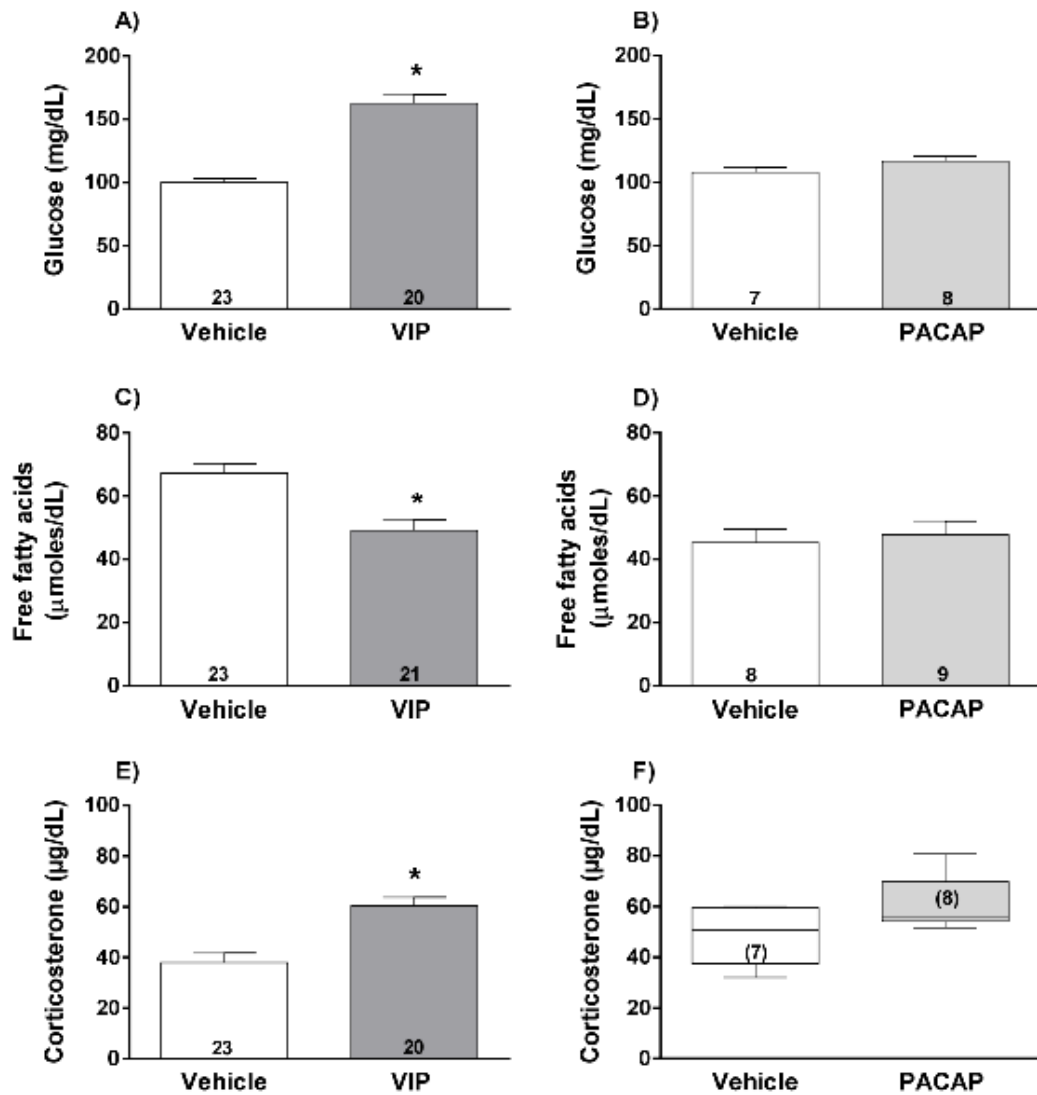


Figura 6. Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) (A, B), ácidos graxos livres (μmoles/dL) (C, D) e corticosterona (μg/dL) (E, F) após microinjeção (6 μL, 6 μL/min em 1 min) de Veículo (solução salina estéril, 0,9% NaCl), peptídeo intestinal vasoativo (VIP; 40 ng/g) ou polipeptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária (PACAP; 4,0 ng/g) no ventrículo lateral. O número de animais é mostrado dentro das barras. Os dados são expressos como média ± SEM para o teste *t* (A – E) e mediana (1^o-3^o intervalo interquartil) para o teste de Mann-Whitney (F). **p*<0,05 versus respectivo grupo Veículo.

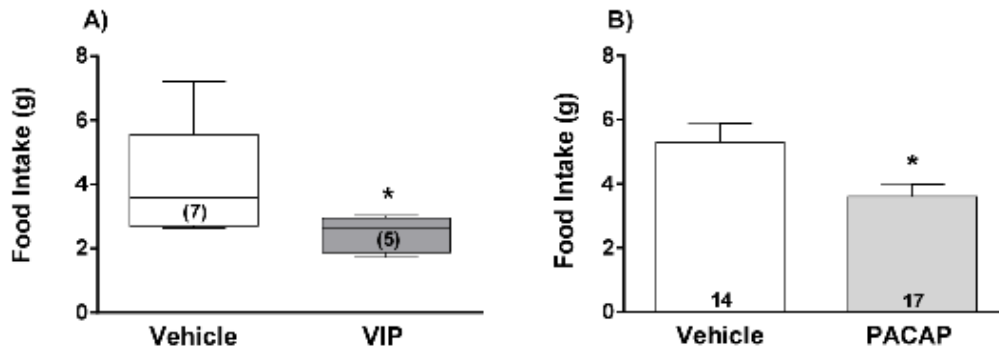


Figura 7. Ingestão de alimentos (g) após microinjeção (6 μ L, 6 μ L/min em 1 min) de Veículo (solução salina estéril, NaCl a 0,9%), peptídeo intestinal vasoativo (A, VIP, 40 ng/g) ou adenilato hipofisário polipeptídeo ativador da ciclase (B, PACAP, 4,0 ng/g) no ventrículo lateral. O número de animais é mostrado dentro das barras. Os dados são expressos como média \pm SEM para o teste *t* (B) e mediana (1^o-3^o intervalo interquartil) para o teste de Mann-Whitney (A). **p*<0,05 versus respectivo grupo Veículo.

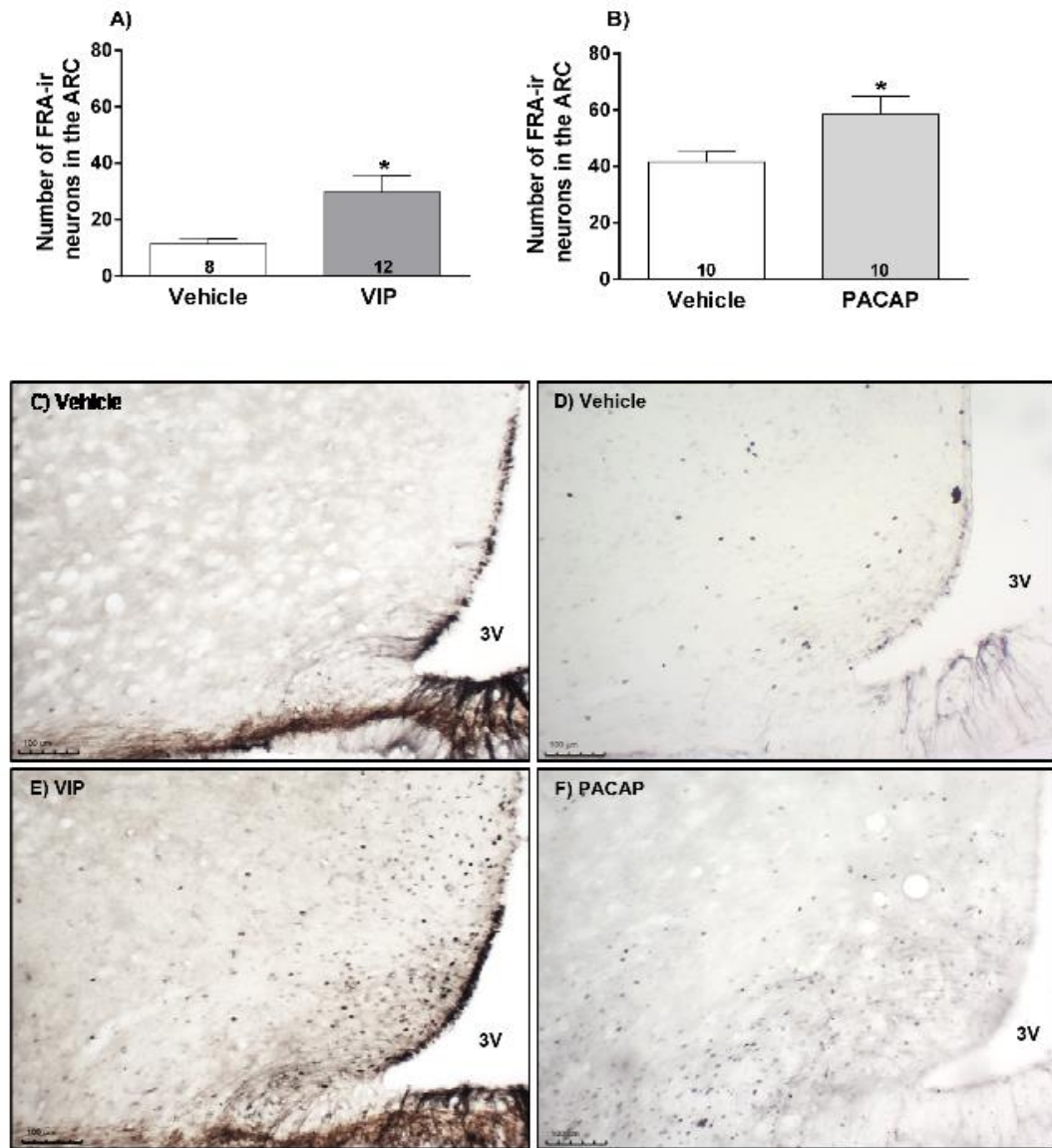


Figura 8. Número de neurônios imunorreativos a antígenos relacionados a Fos (FRA-ir) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) após microinjeção (6 μ L, 6 μ L/min em 1 min) de Veículo (solução salina estéril, NaCl a 0,9%), peptídeo intestinal vasoativo (A, VIP, 40 ng/g) ou polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (B, PACAP, 4,0 ng/g) no ventrículo lateral. Fotomicrografias representativas (ampliação 10x) de imuno-histoquímica para neurônios FRA-positivos no ARC após Veículo (C e D), VIP (E) ou PACAP (F). O número de animais é mostrado dentro das barras. Os dados foram analisados pelo teste *t* e são apresentados como média \pm SEM. * p <0,05 versus respectivo grupo Veículo. A barra de escala representa 100 μ m (ampliação de 100x).

4.3 DISCUSSÃO

As microinjeções VIP e PACAP especificamente no ARC diminuíram a hiperfagia induzida pelo jejum, promoveram hipofagia e alterações metabólicas plasmáticas. Além disso, microinjeções de VIP e PACAP no ventrículo lateral induzem ativação neuronal no ARC, bem como diminuição da hiperfagia induzida pelo jejum e alteração dos parâmetros plasmáticos.

A hipofagia, hiperglicemia, aumento da concentração plasmática de corticosterona e redução da concentração plasmática de ácidos graxos livres promovidos pela microinjeção ICV de VIP estão de acordo com trabalhos publicados anteriores (ITOH et al., 1982; GHOURAB et al., 2011; NAGAI et al., 1994; MARTINS et al., 2018; GARNICA-SIQUEIRA et al., 2019). Além disso, a microinjeção ICV de PACAP reduziu a ingestão de alimentos (MIZUNO et al., 1998; MORLEY et al., 1992) e aumentou a glicose plasmática em camundongos e ratos (YI et al., 2010; MOUNIEN et al., 2009). Essas respostas são mediadas pelo hipotálamo, e o ARC é conhecido por participar do circuito neural que controla a homeostase energética (SATOH et al., 1997; CONE et al., 2001). Devido à sua localização anatômica na parte inferior do terceiro ventrículo nas proximidades da iminência mediana, os neurônios ARC estão favoravelmente posicionados para responder rapidamente às respostas periféricas, facilitando seu papel crucial na regulação da homeostase energética (JOLY-AMADO et al., 2014). No ARC, esses sinais atuam em neurônios que expressam mediadores orexígenos, como neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada ao gene Agouti (AgRP), ou neuropeptídeos anorexigênicos, como proopiomelanacortina (POMC) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (ELIAS et al., 1998; HAHN et al., 1998; CHANG et al., 2021).

Conforme descrito por Ghourab et al (2011), a administração ICV de VIP diminuiu significativamente a hiperfagia induzida pelo jejum pela manhã e a ingestão de alimentos na fase escura. Assim, a microinjeção de VIP e PACAP no ARC para análise da ingestão alimentar foi realizada pela manhã e à noite para avaliar os efeitos diretos desses neuropeptídeos no ARC na hiperfagia induzida pelo jejum e na ingestão alimentar, respectivamente. Até onde sabemos, nosso estudo mostrou pela primeira vez que as microinjeções de VIP e PACAP no ARC reduzem a hiperfagia induzida pelo jejum (grupo Manhã e grupo Noite) e promovem alterações metabólicas periféricas. A expressão de receptores VIP (VPAC1-R e VPAC2-R) e

receptores PACAP (PAC1 e VPAC2) no hipotálamo, incluindo o ARC (USDIN et al., 1994; LABURTHE et al., 2002; MOUNIEN et al., 2009) reforçam nossos achados de que VIP e PACAP podem modular diretamente a atividade neuronal neste núcleo, que foi avaliada pela expressão de FRA. Além disso, FRA (antígenos relacionados a Fos) são proteínas quimicamente semelhantes a Fos, que alteram a transcrição celular, positiva ou negativamente, em resposta a sinais na superfície celular e são úteis na avaliação da ativação neuronal (DRAGUNOW, 1987; MOREAU; CIRIELLO, 2013). Assim, a expressão de FRA foi usada como marcador para avaliar se os neurônios ARC foram recrutados após microinjeções VIP e PACAP no SNC. Após a microinjeção ICV de VIP ou PACAP, o aumento da expressão de FRA em neurônios ARC indica alterações na atividade neuronal nesse núcleo, sugerindo que esses neuropeptídeos estimulam neurônios no ARC. Em concordância com nossos achados, a microinjeção ICV de PACAP em camundongos induziu a expressão de Fos no ARC e aumentou a ativação do neurônio POMC no ARC (MOUNIEN et al., 2009).

Evidências moleculares e celulares foram publicadas em estudos anteriores, os quais demonstraram que os neurônios POMC do núcleo arqueado expressam receptores PACAP e VIP (MOUNIEN et al., 2006), e tanto PACAP quanto VIP estimulam a biossíntese e liberação do hormônio estimulador de melanócitos alfa (α -MSH), um produto do processamento pós-tradução de POMC, e o bloqueio dos receptores MC3/ C4 foi capaz de reverter a hipofagia induzida por VIP e PACAP (MOUNIEN et al., 2006; MOUNIEN et al., 2009; GHOURAB et al., 2011). Esses dados indicam que os neurônios POMC no ARC são mediadores importantes dos efeitos anorexigênicos VIP e PACAP, e esses peptídeos podem atuar diretamente no ARC para alterar a expressão de neuropeptídeos e, assim, promover tanto a hipofagia (noite) quanto a redução da hiperfagia induzida pelo jejum (manhã). Nesse contexto, pode-se especular que o VIP e o PACAP reduziram a hiperfagia induzida pelo jejum, ao inibir os neurônios NPY/AgRP do ARC, que são estimulados pelo jejum (UCHOA et al., 2012). No entanto, a falta de evidências de que esses neuropeptídeos alteram a expressão de AgRP ou NPY no ARC enfraquece essa hipótese (GHOURAB et al, 2011; MOUNIEN et al., 2009). Por outro lado, a participação do sistema ARC melanocortina pode ser apontada novamente, uma vez que o jejum reduziu POMC no ARC (MOUNIEN et al, 2009), e VIP e PACAP

aumentaram (MOUNIEN et al., 2006; MOUNIEN et al., 2009; GHOURAB et al., 2011).

Além disso, já foi demonstrada a presença de neurônios sensíveis à concentração de glicose no ARC, sugerindo uma importante participação desse núcleo no controle glicêmico (GARDUÑO et al., 2019). Nesse contexto, o aumento das concentrações plasmáticas de glicose e corticosterona após microinjeção ICV de VIP é corroborado por estudos anteriores (MARTINS et al., 2018; GARNICA-SIQUEIRA et al., 2019). Diferentemente do VIP, a microinjeção ICV de PACAP não alterou os valores plasmáticos de glicose ou corticosterona. No entanto, a participação do PACAP no controle da produção de glicose foi observada em camundongos, que apresentaram aumento da glicemia, mas não de corticosterona, após microinjeção ICV de PACAP (MOUNIEN et al., 2009). Além disso, foi observado aumento de glicose e corticosterona após microinjeção ICV de 1 nmol de PACAP em ratos (YI et al., 2010), cuja concentração foi três vezes superior à utilizada no presente trabalho. Em relação ao perfil lipídico, a redução dos valores plasmáticos de ácidos graxos livres após microinjeção ICV de VIP está de acordo com dados de Garnica-Siqueira et al. (2018; 2019) e Martins et al. (2018); no entanto, nosso estudo é o primeiro a investigar os efeitos da microinjeção ICV de PACAP em ácidos graxos livres em ratos. Trabalhos anteriores em cães (KAWAI et al., 1994) e galinhas (TACHIBANA et al., 2007) mostraram que este peptídeo aumentou a concentração plasmática de ácidos graxos livres após 5 a 10 min ou 30 min de microinjeção de PACAP, respectivamente. Portanto, deve-se notar que tempos, animais ou doses diferentes podem determinar respostas diferentes para VIP ou PACAP.

Os achados do presente trabalho mostrando que as microinjeções VIP e PACAP no ARC induzem hiperglicemia e aumento de ácidos graxos livres circulantes estão de acordo com estudos anteriores de que o hipotálamo responde à estimulação química com epinefrina, norepinefrina ou dopamina, aumentando os ácidos graxos livres e de glicose plasmáticos (COIMBRA; MIGLIORINI, 1983; STEFFENS et al., 1988; ZAIA et al., 1997). A redução dos lipídios totais após a microinjeção de VIP e PACAP no ARC é provável de ocorrer por causa dos efeitos desses peptídeos na redução das concentrações plasmáticas de colesterol ou triglicerídeos, o que pode ser devido a sua maior utilização no fígado ou tecidos adiposos (GIBBONS et al. 2000). O papel do hipotálamo e do sistema nervoso

autônomo no controle do metabolismo lipídico está bem estabelecido (NOGUEIRAS et al., 2010; BRUINSTROOP et al., 2014), e o sistema de melanocortina no ARC demonstrou contribuir para este circuito de controle metabólico, estimulando o catabolismo dos lipídios (NOGUEIRAS et al., 2007). Em concordância, a deafferentação hipotalâmica em ratos reduziu a mobilização de ácidos graxos livres quando a atividade simpática era necessária (GROSS; MIGLIORINI, 1977), e alguns estudos demonstraram a mobilização de ácidos graxos livres do tecido adiposo pelo sistema nervoso simpático (TEIXEIRA et al., 1973; BRUINSTROOP et al., 2014). Conseqüentemente, o bloqueio central dos receptores de melanocortina em ratos ou o nocaute desses receptores em camundongos levou ao aumento da síntese e armazenamento de lipídios no tecido adiposo branco, bem como a um aumento no colesterol circulante de lipoproteína de alta densidade por meio das vias hepáticas (NOGUEIRAS et al., 2008; NOGUEIRAS et al., 2010; PEREZ-TILVE et al., 2010).

O conjunto dos nossos resultados apontam que as microinjeções de PACAP ou VIP no ARC promovem agudamente respostas simpáticas típicas sobre o metabolismo, como aumentos na glicemia e mobilização de lipídios, conforme observado pela elevação plasmática de ácidos graxos livres acompanhada de diminuição de colesterol ou triglicerídeos. Na verdade, esses resultados podem ser apoiados pelo papel bem estabelecido dos neurônios no ARC para controlar a atividade de órgãos periféricos, regulando substratos plasmáticos por meio do sistema nervoso autônomo (JOLY-AMADO et al., 2014; MANCEAU et al., 2020). Assim, apesar do sistema nervoso simpático não ter sido avaliado neste trabalho, é tentador hipotetizar que VIP e PACAP podem ativar neurônios ARC para recrutar o sistema nervoso simpático e promover aumento na glicemia e ácidos graxos livres. Este conceito pode ser reforçado por dados que mostram que quase todos os tecidos recebem inervação do sistema nervoso autônomo, incluindo o fígado, pâncreas endócrino, tecido adiposo, e que os neurônios hipotalâmicos modulam o metabolismo da glicose e o metabolismo lipídico por meio da modulação autonômica no fígado e tecido adiposo (KALSBECK et al., 2010; JOLY-AMADO et al., 2014).

É importante destacar que, além do ARC, o PVN também expressa receptores VIP e PACAP (DE SOUZA et al., 1985; USDIN et al., 1994; JOO et al., 2004). De fato, a participação de PVN em algumas dessas respostas eliciadas por VIP e PACAP foi relatada anteriormente, como o aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona após microinjeção de VIP em PVN (ALEXANDER;

SANDER, 1994), bem como maior expressão de FRA em o PVN após microinjeção ICV de VIP, indicando que VIP ativa neurônios do PVN (GARNICA-SIQUEIRA et al., 2018), além dos efeitos anorexigênicos induzidos por microinjeções no PVN de PACAP (RESCH et al., 2013). Além disso, os neurônios do ARC projetam e modulam neurônios do PVN (LU et al., 2003), que expressam neuropeptídeo anorexigênico CRH e recrutam o sistema nervoso simpático (NUNN et al., 2011). Assim, considerando que o CRH é um mediador anorexigênico do hormônio estimulante de α -melanócitos (α -MSH) e VIP (LU et al., 2003; GARNICA-SIQUEIRA et al., 2018), as microinjeções ICV de VIP e PACAP aumentaram a atividade neuronal e a expressão de CRH no PVN (GRINEVICH et al., 1997; AGARWAL et al., 2005; DORE et al., 2013; GARNICA-SIQUEIRA et al., 2018), outra hipótese é que as ações VIP e PACAP no ARC para induzir hipofagia e regular o metabolismo energético periférico podem também ser mediada por neurônios PVN (figura 9).

Outro aspecto interessante de ser comentado é que a liberação de VIP do trato gastrointestinal, em resposta à alimentação (MISKOWIAK et al., 1985), além da redução da ingestão de alimentos após injeções periféricas de VIP em diferentes espécies (MATSUDA et al., 2005, 2006; YU et al., 2011), sugerem que o VIP pode atuar como um fator de saciedade, uma vez que o VIP pode atravessar a barreira hematoencefálica (DOGRUKOL-AK et al., 2003; DOGRUKOL-AK et al., 2004). Além disso, a injeção periférica de PACAP mostrou reduzir a ingestão de alimentos em camundongos (VU et al., 2015). Assim, os análogos de VIP e PACAP podem ser ferramentas terapêuticas promissoras para o tratamento da obesidade e precisam ser mais exploradas.

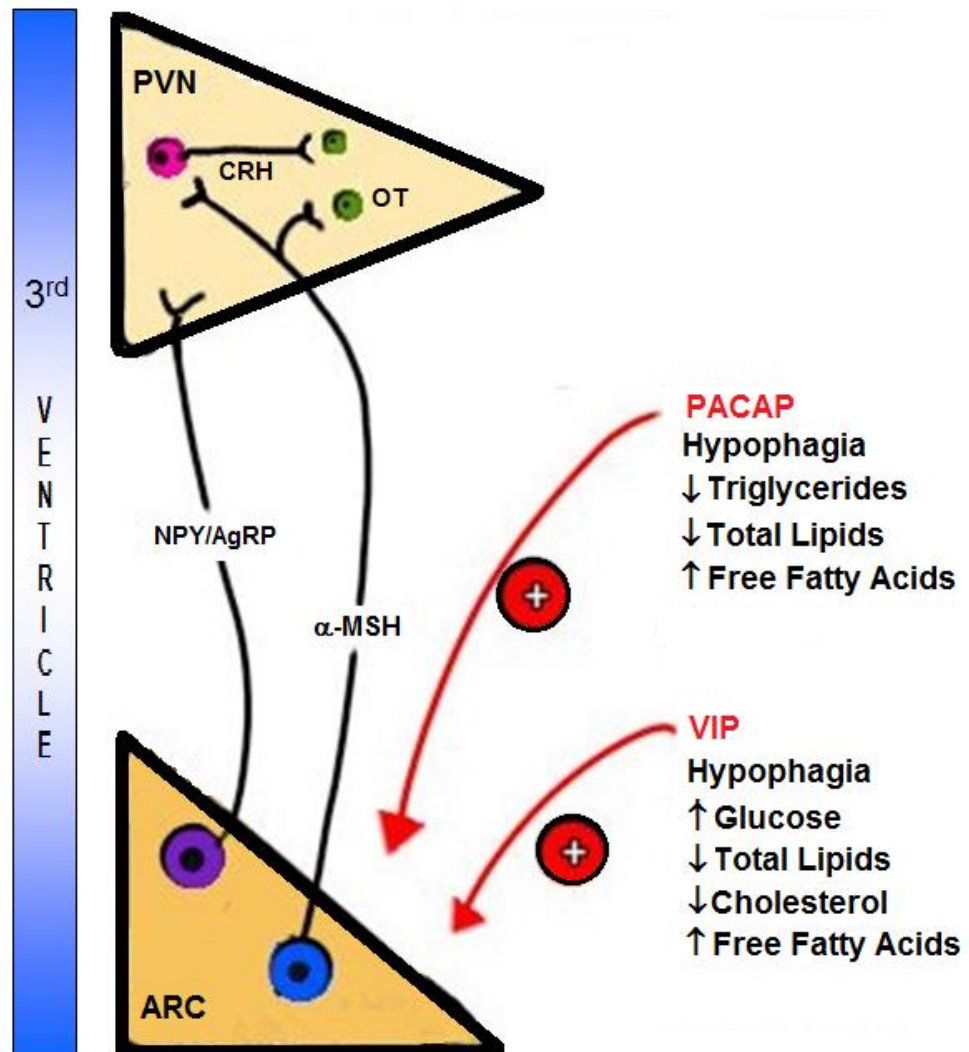


Figura 9. Efeitos da microinjeção de VIP ou PACAP no ARC. VIP: peptídeo intestinal vasoativo. PACAP: polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária. PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo. ARC: núcleo arqueado do hipotálamo. NPY/AgRP: neuropeptídeo Y/proteína relacionada ao gene Agouti. α -MSH: hormônio estimulante de α -melanócitos. CRH: hormônio liberador de corticotropina. OT: hormônio ocitocina.

4.4 CONCLUSÃO

Em resumo, o presente estudo mostra que VIP e PACAP atuam no ARC induzindo hipofagia, redução da hiperfagia induzida pelo jejum, aumento das concentrações plasmáticas de glicose e ácidos graxos livres, associadas a menores concentrações de triglicerídeos, colesterol e lipídeos totais. Assim, além de outros núcleos, o ARC pode ser apontado como um importante local de ação tanto do VIP quanto do PACAP para induzir hipofagia e alterações metabólicas plasmáticas.

4.5 REFERÊNCIAS

- Agarwal, A., Halvorson, L.M., Legradi, G., 2005. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Molec. Brain Res.* 138, 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.03.016>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(94\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0167-0115(94)90068-X)
- Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S.G., Richmond, W., Fu, P.C., 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20, 470–475. <https://doi.org/10.1093/clinchem/20.4.470>
<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1016.9631&rep=rep1&type=pdf>
- Arimura, A., 1998. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jnp J. Physiol.* 48, 301–331. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.48.301>
- Bouret, S.G., Draper, S.J., Simerly, R.B., 2004. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J. Neurosci.* 24, 2797–2805. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004>
- Bruinstroop, E., Fliers, E., Kalsbeek, A., 2014. Hypothalamic control of hepatic lipid metabolism via the autonomic nervous system. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 28, 673–684. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.05.001>
- Chance, W.T., Thompson, H., Thomas, I., Fischer, J.E., 1995. Anorectic and neurochemical effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in rats. *Peptides* 16, 1511–1516. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(95\)02048-9](https://doi.org/10.1016/0196-9781(95)02048-9)
- Chang, R., Hernandez, J., Gastelum, C., Guadagno, K., Perez, L., Wagner, E.J., 2021. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide excites proopiomelanocortin neurons:

implications for the regulation of energy homeostasis. *Neuroendocrinology* 111, 45–69. <https://doi.org/10.1159/000506367>

Coimbra, C.C., Migliorini, R.H., 1983. Evidence for a longitudinal pathway in rat hypothalamus that controls FFA mobilization. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 245, E332–E337. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1983.245.4.E332>

Cone, R.D., Cowley, M.A., Butler, A.A., Fan, W., Marks, D.L., Low, M.J., 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int. J. Obes.* 25, S63–S67. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801913>

De Souza, E.B., Seifert, H., Kuhar, M.J., 1985. Vasoactive intestinal peptide receptor localization in rat forebrain by autoradiography. *Neurosci. Lett.* 56, 113–120. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90116-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90116-8)

Dogrukol-Ak, D., Banks, W.A., Tuncel, N., Tuncel, M., 2003. Passage of vasoactive intestinal peptide across the blood–brain barrier. *Peptides* 24, 437–444. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(03\)00059-7](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(03)00059-7)

Dogrukol-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. doi: 10.2174/1381612043384934

Dore, R., Iemolo, A., Smith, K.L., Wang, X., Cottone, P., Sabino, V., 2013. CRF mediates the anxiogenic and anti-rewarding, but not the anorectic effects of PACAP. *Neuropsychopharmacology* 38, 2160–2169. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.113>

Dragunow, M., Robertson, H.A., 1987. Kindling stimulation induces *c-fos* protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature* 329, 441–442. <https://doi.org/10.1038/329441a0>

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. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80656-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80656-X)

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. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(73\)90016-8](https://doi.org/10.1016/0009-8981(73)90016-8)

Garduño, J., Hernández-López, S., Rolón, D.C., Cruz, L., Hernández-Vásquez, F., Reyes-Vaca, A., Arenas, I., Bravo-Martínez, J., 2019. Electrophysiological characterization of glucose sensing neurons in the hypothalamic arcuate nucleus of male rats. *Neurosci. Lett.* 703, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.03.041>

Garnica-Siqueira, M.C., Martins, A.B., Stopa, L.R., Souza, C.F., Zaia, D.A.M., Leite, C.M., Zaia, C.T.B.V., Uchoa, E.T., 2019. Adrenalectomy impairs vasoactive intestinal peptide-induced changes in food intake and plasma parameters. *Endocrine* 65, 675–682. <https://doi.org/10.1007/s12020-019-02012-w>

- Garnica-Siqueira, M.C., Martins, A.B., Zaia, D.A.M., Leite, C.M., Uchoa, E.T., Zaia, C.T.B.V. 2018. Corticotrophin-releasing factor mediates vasoactive intestinal peptide-induced hypophagia and changes in plasma parameters. *Horm. Behav.* 105, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.08.008>
- Ghourab, S., Beale, E.K., Semjonous, N.M., Simpson, K.A., Martin, N.M., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Smith, K.L., 2011. Intracerebroventricular administration of vasoactive intestinal peptide inhibits food intake. *Regul. Pept.* 172, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2011.07.006>
- Gibbons, G.F., Islam, K., Pease, R.J., 2000. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids* 1483, 37–57. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00182-1](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00182-1)
- Grinevich, V., Fournier, A., Pelletier, G., 1997. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on corticotropin-releasing hormone (CRH) gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* 773, 190–196. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01011-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01011-1)
- Gross, J.L., Migliorini, R.H., 1977. Further evidence for a central regulation of free fatty acid mobilization in the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 232, E165–E171. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1977.232.2.E165>
- Guillemin, R., Clayton, G.W., Smith, J.D., Lipscomb, H.S., 1958. Measurement of free corticosteroids in rat plasma: physiological validation of a method. *Endocrinology* 63, 349–358. <https://doi.org/10.1210/endo-63-3-349>
- 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. <https://doi.org/10.1038/1082>
- Harding, C., Bechtold, D.A., Brown, T.M., 2020. Suprachiasmatic nucleus-dependent and independent outputs driving rhythmic activity in hypothalamic and thalamic neurons. *BMC Biol.* 18, 134, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00871-8>
- Hoffman, 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.
- Hoffman, G.E., Smith, M.S., Verbalis, J.G., 1993. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* 14, 173–213. <https://doi.org/10.1006/frne.1993.1006>
- Hughes, A.T.L., Guilding, C., Piggins, H.D., 2011. Neuropeptide signaling differentially affects phase maintenance and rhythm generation in SCN and extra-SCN circadian oscillators. *PLoS One* 6, e18926, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018926>
- 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. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.32.553>

Jhanwar-Uniyal, M., Beck, B., Bulet, C., Leibowitz, S.F., 1990. Diurnal rhythm of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the suprachiasmatic, arcuate and paraventricular nuclei and other hypothalamic sites. *Brain Res.* 536, 331–334. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90045-D](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90045-D)

Joly-Amado, A., Cansell, C., Denis, R.G., Delbes, A.S., Castel, J., Martinez, S., Luquet, S., 2014. The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 28, 725–737. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.03.003>

Jones, J.R., Simon, T., Lones, L., Herzog, E.D., 2018. SCN VIP neurons are essential for normal light-mediated resetting of the circadian system. *J. Neurosci.* 38, 7986–7995. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1322-18.2018>

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. <https://doi.org/10.1002/cne.20231>

Kalsbeek, A., Bruinstroop, E., Yi, C.X., Klieverik, L.P., La Fleur, S.E., Fliers, E., 2010. Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212, 114–129. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05800.x>

Kawai, K., Yokota, C., Ohashi, S., Isobe, K., Suzuki, S., Nakai, T., Yamashita, K., 1994. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: effects on pancreatic-adrenal hormone secretion and glucose-lipid metabolism in normal conscious dogs. *Metabolism* 43, 739–744. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(94\)90124-4](https://doi.org/10.1016/0026-0495(94)90124-4)

Kingsbury, M.A., Wilson, L.C., 2016. The role of VIP in social behavior: neural hotspots for the modulation of affiliation, aggression, and parental care. *Integr. Comp. Biol.* 56, 1238–1249. <https://doi.org/10.1093/icb/icw122>

Kocho-Schellenberg, M., Lezak, K.R., Harris, O.M., Roelke, E., Gick, N., Choi, I., Edwards, S., Wasserman, E., Toufexis, D.J., Braas, K.M., May, V., Hammack, S.E., 2014. PACAP in the BNST produces anorexia and weight loss in male and female rats. *Neuropsychopharmacology* 39, 1614–1623. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.8>

Kohno, D., Yada, T., 2012. Arcuate NPY neurons sense and integrate peripheral metabolic signals to control feeding. *Neuropeptides* 46, 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.09.004>

Köves, K., Arimura, A., Görcs, T.G., Somogyvári-Vigh, A., 1991. Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 54, 159–169. <https://doi.org/10.1159/000125864>

Laburthe, M., Couvineau, A., Marie, J.C., 2002. VPAC receptors for VIP and PACAP. *Recept. Channels* 8, 137–153. <https://doi.org/10.3109/10606820213680>

- Lezak, K.R., Roelke, E., Harris, O.M., Choi, I., Edwards, S., Gick, N., Cocchiaro, G., Missig, G., Roman, C.W., Braas, K.M., Toufexis, D.J., May, V., Hammack, S.E., 2014. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) increases corticosterone in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 45, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.03.007>
- Lu, X.Y., Barsh, G.S., Akil, H., Watson, S.J., 2003. Interaction between α -melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J. Neurosci.* 23, 7863–7872. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-21-07863.2003>
- Manceau, R., Majeur, D., Alquier, T., 2020. Neuronal control of peripheral nutrient partitioning. *Diabetologia* 63, 673–682. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05104-9>
- Martins, A.B., Garnica-Siqueira, M.C., Zaia, D.A., 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. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3106-x>
- 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. <https://doi.org/10.1196/annals.1317.054>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.02.022>
- Miskowiak, J., Andersen, B., Stadil, F., Fahrenkrug, J., 1985. Meal stimulated levels of pancreatic polypeptide (PP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in gastroplasty for morbid obesity. *Regul. Pept.* 12, 231–236. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(85\)90064-3](https://doi.org/10.1016/0167-0115(85)90064-3)
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.D., Coy, D.H., 1989. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 567–574. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91757-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91757-9)
- Mizuno, Y., Kondo, K., Terashima, Y., Arima, H., Murase, T., Oiso, Y., 1998. Anorectic effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rats: lack of evidence for involvement of hypothalamic neuropeptide gene expression. *J. Neuroendocrinol.* 10, 611–616. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1998.00244.x>
- Moreau, J.M., Ciriello, J., 2013. Effects of acute intermittent hypoxia on energy balance and hypothalamic feeding pathways. *Neuroscience* 253, 350–360. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.007>

Morley, J.E., Horowitz, M., Morley, P.M.K., Flood, J.F., 1992. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) reduces food intake in mice. *Peptides* 13, 1133–1135. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(92\)90019-Y](https://doi.org/10.1016/0196-9781(92)90019-Y)

Mounien, L., Bizet, P., Boutelet, I., Gourcerol, G., Fournier, A., Vaudry, H., Jégou, S., 2006. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide directly modulates the activity of proopiomelanocortin neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroscience* 143, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.07.022>

Mounien, L., Do Rego, J.C., Bizet, P., Boutelet, I., Gourcerol, G., Fournier, A., Brabet, P., Costentin, J., Vaudry, H., Jégou, S., 2009. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits food intake in mice through activation of the hypothalamic melanocortin system. *Neuropsychopharmacology* 34, 424–435. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.73>

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. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.17.29>

Nogueiras, R., López, M., Diéguez, C., 2010. Regulation of lipid metabolism by energy availability: a role for the central nervous system. *Obes. Rev.* 11, 185–201. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00669.x>

Nogueiras, R., Veyrat-Durebex, C., Suchanek, P.M., Klein, M., Tschöp, J., Caldwell, C., Woods, S.C., Wittmann, G., Watanabe, M., Liposits, Z., Fekete, C., Reizes, O., Rohner-Jeanrenaud, F., Tschöp, M.H., 2008. Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake-independent metabolic benefits in diet-induced obese rats. *Diabetes* 57, 2977–2991. <https://doi.org/10.2337/db08-0161>

Nogueiras, R., Wiedmer, P., Perez-Tilve, D., Veyrat-Durebex, C., Keogh, J.M., Sutton, G.M., Pfluger, P.T., Castaneda, T.R., Neschen, S., Hofmann, S.M., Howles, P.N., Morgan, D.A., Benoit, S.C., Szanto, I., Schrott, B., Schürmann, A., Joost, H.G., Hammond, C., Hui, D.Y., Woods, S.C., Rahmouni, K., Butler, A.A., Farooqi, I.S., O’Rahilly, S., Rohner-Jeanrenaud, F., Tschöp, M.H., 2007. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 117, 3475–3488. <https://doi.org/10.1172/JCI31743>

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. <https://doi.org/10.2174/157015911795596531>

Paxinos, G., Watson, C., 2009. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York, NY.

Perez-Tilve, D., Hofmann, S.M., Basford, J., Nogueiras, R., Pfluger, P.T., Patterson, J.T., Grant, E., Wilson-Perez, H.E., Granholm, N.A., Arnold, M., Trevaskis, J.L., Butler, A.A., Davidson, W.S., Woods, S.C., Benoit, S.C., Sleeman, M.W., DiMarchi, R.D., Hui, D.Y., Tschöp, M.H., 2010. Melanocortin signaling in the CNS directly

regulates circulating cholesterol. *Nat. Neurosci.* 13, 877–882. <https://doi.org/10.1038/nn.2569>

Resch, J.M., Maunze, B., Gerhardt, A.K., Magnuson, S.K., Phillips, K.A., Choi, S.J., 2013. Intrahypothalamic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates energy balance via site-specific actions on feeding and metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305, E1452–E1463. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00293.2013>

Said, S.I., Mutt, V., 1970. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 169, 1217–1218. <https://doi.org/10.1126/science.169.3951.1217>

Satoh, N., Ogawa, Y., Katsuura, G., Hayase, M., Tsuji, T., Imagawa, K., Yoshimasa, Y., Nishi, S., Hosoda, K., Nakao, K., 1997. The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosc. Lett.* 224, 149–152. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)00163-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)00163-8)

Segal, J.P., Stallings, N.R., Lee, C.E., Zhao, L., Socci, N., Viale, A., Harris, T.M., Soares, M.B., Childs, G., Elmquist, J.K., Parker, K.L., Friedman, J.F., 2005. Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *J. Neurosci.* 25, 4181–4188. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0158-05.2005>

Sims, K.B., Hoffman, D.L., Said, S.I., Zimmerman, E.A., 1980. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res.* 186, 165–183. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90263-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90263-2)

Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P.H., Journot, L., 1993. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365, 170–175. <https://doi.org/10.1038/365170a0>

Steffens, A.B., Scheurink, A.J.W., Luiten, P.G.M., Bohus, B., 1988. Hypothalamic food intake regulating areas are involved in the homeostasis of blood glucose and plasma FFA levels. *Physiol. Behav.* 44, 581–589. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90322-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90322-8)

Tachibana, T., Oikawa, D., Adachi, N., Boswell, T., Furuse, M., 2007. Central administration of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide differentially regulates energy metabolism in chicks. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.* 147, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.043>

Taylor, D.P., Pert, C.B., 1979. Vasoactive intestinal polypeptide: specific binding to rat brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 660–664. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.660>

Teixeira, V.L., Antunes-Rodrigues, J., Migliorini, R.H., 1973. Evidence for centers in the central nervous system that selectively regulate fat mobilization in the rat. *J. Lipid Res.* 14, 672–677. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)36849-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)36849-8)

Trinder, P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6, 24–27. <https://doi.org/10.1177/000456326900600108>

Uchoa, E.T., Silva, L.E.C.M., Castro, M., Jose Antunes-Rodrigues, J., Lucila L.K. Elias, L.L.K., 2012. Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. *Neuropeptides* 46, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.02.002>

Usdin, T.B., Bonner, T.I., Mezey, E., 1994. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 135, 2662–2680. <https://doi.org/10.1210/endo.135.6.7988457>

Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B.K.C., Hashimoto, H., Galas, L., Vaudry, H., 2009. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* 61, 283–357. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>

Vu JP, Goyal D, Luong L, Oh S, Sandhu R, Norris J, Parsons W, Pisegna JR, Germano PM., 2015. PACAP intraperitoneal treatment suppresses appetite and food intake via PAC1 receptor in mice by inhibiting ghrelin and increasing GLP-1 and leptin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 309, G816–G825. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00190.2015>

Wortley, K.E., Chang, G.Q., Davydova, Z., Fried, S.K., Leibowitz, S.F., 2004. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the arcuate nucleus stimulates lipid metabolism to control body fat accrual on a high-fat diet. *Regul. Pept.* 117, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2003.08.005>

Yi, C.X., Sun, N., Ackermans, M.T., Alkemade, A., Foppen, E., Shi, J., Serlie, M.J., Buijs, R.M., Fliers, E., Kalsbeek, A., 2010. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates glucose production via the hepatic sympathetic innervation in rats. *Diabetes* 59, 1591–1600. <https://doi.org/10.2337/db09-1398>

Yu, R., Zhang, H., Huaang, 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. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.11.017>

Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., Delattre, E., Dolnikoff, M.S., Timo-laria, C., 1997. Effect of chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamic nucleus on blood plasma glucose, triglycerides and free fatty acids in rats. *Brain Res. Bull.* 42, 195–198. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(96\)00225-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(96)00225-0)

5 ARTIGO II

Papel dos estrógenos nos efeitos de hipofagia e alterações metabólicas plasmáticas induzidas por microinjeção intracerebroventricular do peptídeo intestinal vasoativo e polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária

Artigo a ser submetido à revista Brain Research Bulletin.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar adultas (n=130) pesando entre 250-270 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Foram mantidas no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF-B2), com luz (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 °C) controladas, e água e alimentação à vontade, exceto nos experimentos que envolvam jejum. Os experimentos ocorreram no Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo do CIF, no período noturno a partir das 18 h e realizados 7 dias após a cirurgia para permitir aos animais uma recuperação completa. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (OF.CIRC.CEUA. N 12/2018, protocolo N° 21997.2017.34; Anexo 2).

5.1.2 Drogas

Por microinjeção intracerebroventricular (ICV) foram administrados: VIP (Sigma Co., CA) na dose de 40 ng/g rato em 6 µL; PACAP (Sigma Co., CA) na dose de (4,0 ng/g em 6 µL), doses de VIP e PACAP escolhidas com base em publicações anteriores (ALEXANDER; SANDER, 1994; CHANCE et al., 1995; MARTINS et al., 2018), como veículo foi microinjetado 6 µL de salina estéril (NaCl 0,9%). O hormônio de reposição foi o cipionato de estradiol (Pfizer, São Paulo, SP), 10 µg/0,2 mL/rata, subcutâneo (sc), e como veículo em relação ao hormônio foi utilizado óleo de milho 0,2 mL, subcutâneo.

5.1.3 Protocolos experimentais

Todos os animais foram submetidos à estereotaxia e a cirurgia de ovariectomia bilateral (OVX); após cirurgia foram mantidas em duplas em caixas coletivas constituindo os seguintes grupos experimentais:

- grupo OVX+O: ratas ovariectomizadas e tratadas com óleo de milho;
- grupo OVX+E: ratas ovariectomizadas e tratadas com estradiol.

Protocolo 1. Efeitos da microinjeção intracerebroventricular de VIP ou PACAP sobre parâmetros metabólicos plasmáticos e ingestão de alimentos

Neste conjunto de protocolos, as ratas OVX+O e OVX+E tiveram a ração retirada às 16 h e, às 18h, receberam microinjeção ICV de Salina, VIP ou PACAP (6 µL, 6 µL/min em 1 min). Após 15 min, as ratas foram submetidas a eutanásia por decapitação, o sangue foi coletado em tubos heparinizados para obtenção de plasma para determinações plasmáticas de glicose, ácidos graxos livres, e corticosterona. Os cérebros foram retirados para avaliação histológica dos locais da microinjeção. Em outro protocolo, após a retirada de alimento às 16 h e microinjeção ICV às 18 h, as ratas receberam microinjeção ICV de Salina, VIP ou PACAP (6 µL, 6 µL / min em 1 min), e após 15 min, todos os animais tiveram acesso à comida (50 g) e a ingestão alimentar foi quantificada (em g/100 g de peso corpóreo) após 120 min.

Protocolo 2. Efeitos da microinjeção intracerebroventricular de VIP ou PACAP em neurônios imunorreativos de antígenos relacionados a Fos (FRA) no PVN e ARC

Neste protocolo experimental, a ração das ratas OVX+O e OVX+E foi retirada às 16 h e às 18 h elas receberam microinjeção ICV de Salina, VIP ou PACAP (6 µL, 6 µL/min em 1 min); após 90 min, foram perfundidas para coleta de tecido cerebral e ensaios de imuno-histoquímica (HOFFMAN et al., 1993; HOFFMAN; MURPHY, 2000).

Protocolo 3. Efeitos do tratamento com estradiol na expressão quantitativa de RNAm de VPAC2 e PAC1 por meio de PCR em tempo real no PVN e ARC

Neste protocolo experimental, após a retirada de alimento às 16 h e microinjeção ICV às 18 h, a ração das ratas OVX+O e OVX+E receberam Salina, tiveram seus cérebros congelados em freezer -80 °C; esses cérebros foram microdissecados utilizando-se uma agulha de punção inoxidável de 1,5 mm de

diâmetro, em um criostato. O RNA total foi isolado de cada amostra de tecido hipotalâmico usando Reagente Trizol (Invitrogen®, Nova Zelândia), o RNA foi usado para a síntese de cDNA e posterior quantificação em máquina de PCR em tempo real.

5.1.4 Procedimentos cirúrgicos

Cirurgia estereotáxica:

Todas as ratas foram anestesiadas intraperitonealmente com dose de 100 mg/kg de ketamina (Agener União, 10%) e 20 mg/kg de cloridrato de xilazina (Anasedan®; Vetbrands, Jacareí, Brazil; 2%) e, ao entrarem em hipnose, foi realizada a tricotomia na região dorsal da cabeça do animal. Por estereotaxia unilateral, foi implantada cânula-guia de aço inoxidável (0,7 mm de diâmetro externo, 0,4 mm de diâmetro interno e 10 mm de 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 (2009). A cânula-guia foi então fixada com acrílico autopolimerizante (Simplex®) sobre a calota craniana, onde previamente foram fixados parafusos metálicos para assegurar a adesão do polímero ao osso. O critério para a verificação da posição da cânula no ventrículo lateral se deu pelo influxo de salina (NaCl 0,9%), por meio de uma coluna de salina, durante a cirurgia de implantação da cânula. Dentro da cânula implantada, um mandril de aço foi posicionado para evitar a sua obstrução por detritos após o procedimento cirúrgico. Ao final da cirurgia, foi dada uma dose profilática de antibiótico (50000 unidades de penicilina G: 0,1 mL por 100 g de peso corpóreo via intramuscular) e paracetamol (200 mg/kg, via oral). As fêmeas foram mantidas em gaiolas coletivas contendo no máximo três animais, para melhor recuperação da cirurgia, recebendo água e alimentação à vontade juntamente com as injeções diárias de óleo de milho ou estradiol.

Ovariectomia bilateral:

Logo em seguida à cirurgia estereotáxica e ainda sob anestesia, foi realizada a cirurgia de ovariectomia bilateral (OVX) seguindo técnicas correntes em endocrinologia (FOLADOR, ZAIA, FERNANDES, 2005).

5.1.5 Análises bioquímicas

Imediatamente após a decapitação, o sangue do tronco foi coletado em tubos heparinizados e centrifugados a 14.000 x g por 20 min a 4 °C. O plasma foi armazenado a -20 °C e usado para ensaios bioquímicos. As análises bioquímicas realizadas foram:

Dosagem de glicose plasmática:

Determinação espectrofotométrica da concentração plasmática de glicose foi realizada utilizando-se o Kit Comercial Glicose BioLiquid (Laborclin, PR), baseado na reação da peroxidase (Trinder, 1969), onde a glicose é determinada por sua reação com a glicose oxidase, na qual são gerados o ácido glucurônico e o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio então reage com o hidroxibenzoato de sódio e 4-aminofenazona, produzindo um complexo corado de cor rosa com máximo de absorção em 500 nm. A intensidade da coloração é proporcional à concentração de glicose da amostra, sendo seus valores expressos em mg.dL⁻¹.

Dosagem de ácidos graxos livres plasmáticos:

Para a determinação plasmática da concentração de ácidos graxos livres foi utilizado o método espectrofotométrico de Falholt et al. (1973). Amostras de plasma (100 µL) foram submetidas a duas extrações seguidas de agitação, aspiração da fase superior e centrifugação. Como padrão, foram utilizados 50 µL de ácido palmítico (2 mmolar) em 1,0 mL de tampão fosfato (pH 6,4) e 6,0 mL de solução extratora, e para o branco apenas a solução extratora. Na 1ª extração utilizou-se 1,0 mL de tampão fosfato (pH 6,4) e 6,0 mL de solução de clorofórmio + heptano + metanol, e na 2ª extração 2,0 mL CuTEA (pH 8,1). Após, em 3,0 mL da fase superior foi adicionado 1,0 mL do reagente de cor (DPC: 4% de 1,5- difenilcarbazida-difenilcarbazona em 0,1 mL de TEA 1 M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm e os resultados expressos em µmoles.dL⁻¹.

Dosagem de corticosterona plasmática:

A determinação da concentração de corticosterona plasmática foi feita pelo método fluorimétrico de Guillemin et al. (1958), o qual se baseia na fluorescência da corticosterona em ácido sulfúrico. Para a execução do método, tem-se como solução

padrão 1 mg de corticosterona dissolvida em 10 mL de etanol absoluto. Em relação às amostras dos animais, 200 µL de plasma foram acrescidos em 6 mL de diclorometano, com posterior agitação e aspiração da fase superior, possibilitando a partição e extração da corticosterona. Após isso, 500 µL de NaOH 0,1 N foram adicionados à amostra para lavagem, seguido por agitação e aspiração da fase superior; após, 500 µL de água destilada foram adicionados, fez-se agitação. Como branco, apenas 4 mL de diclorometano foram utilizados. Na segunda etapa do método, 5, 10 e 20 µL de solução "working" (0,5 mL de solução padrão e etanol) foram adicionados ao tubo da solução padrão e 1 mL de (H₂SO₄ : etanol) foi acrescido à todos os tubos para uma segunda extração, seguido por agitação, em repouso de 20 minutos. A leitura foi feita em fluorímetro, com excitação 477 nm, emissão 520 nm e sensibilidade 11. Os valores da concentração plasmática de corticosterona obtidos foram expressos em µg. d⁻¹.

5.1.6 Análise histológica

Para a avaliação do posicionamento correto da cânula, todos os cérebros após remoção foram cortados em fatias de 60 µm por meio de criostato, até a identificação do posicionamento da cânula. Para a análise dos cortes histológicos utilizou-se o atlas de Paxinos e Watson (2009).

5.1.7 Perfusão de cérebro

As fêmeas foram anestesiadas com ketamina/xilazina (45 mg/mL e 7 mg/mL, respectivamente) e, após o desaparecimento dos reflexos raqui-medulares, foram submetidos à perfusão do SNC. A perfusão intracardíaca foi iniciada 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 paraformaldeído 4%, utilizando bomba peristáltica com velocidade de infusão de 10 mL/min. O tecido foi pós-fixado em paraformaldeído 4%, por 1 h, e então estocado em uma solução de sacarose 30% a 4 °C para a realização dos procedimentos imunistoquímicos.

5.1.8 Imuno-histoquímica

Para a avaliação imuno-histoquímica de FRA (*Fos-related antigens*), que são proteínas quimicamente semelhantes ao FOS, os tecidos cerebrais foram seccionados em cortes de 30 µm de espessura, utilizando-se criostato, separados em alíquotas e mantidos em solução crioprotetora em freezer -20 °C. No primeiro dia, os cortes foram lavados três vezes com tampão fosfato (PB, 0,01 M, pH:7,4) por cinco minutos cada lavagem, e imediatamente após, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução H₂O₂ (30%) durante 30 min em agitação leve, e após o bloqueio os cortes foram lavados três vezes em PB 0,01M durante cinco minutos por lavagem. Em seguida, fez-se o bloqueio das ligações inespecíficas utilizando-se albumina bovina 5% durante uma hora, e logo após incubou-se com o primeiro anticorpo anti-FRA (1:2000, K25, Santa Cruz), sob agitação leve durante uma hora em temperatura ambiente e incubação por 48 horas a 4° C. No segundo dia, lavou-se os cortes com PB 0,01 M três vezes por cinco minutos cada, e posteriormente incubou-se com o segundo anticorpo (biotinilado, 1:200, Vector) por uma hora sob agitação leve, e em seguida lavou-se mais três vezes por cinco minutos cada. Incubou-se com solução avidina-biotina-peroxidase (1:200, ABC, Vectastain) durante uma hora sob agitação, e após lavou-se mais três vezes por cinco minutos. Para a visualização da expressão de FRA, os cortes foram revelados empregando-se diaminobenzidina (DAB 0,01%) e cloreto de níquel como cromógenos, cuja reação conferiu ao núcleo das células uma coloração de violeta escuro a preto. Após a revelação, os cortes foram lavados com PB 0,01 M logo em seguida foram encubados com albumina 5% por uma hora para o bloqueio das ligações inespecíficas, e posteriormente foram encubados com primeiro anticorpo anti-OT (1:20 000, Bachem) durante uma hora em temperatura ambiente e em seguida durante 48 h a 4 °C. No terceiro dia, os cortes foram lavados com PB 0,01M e incubados com o segundo anticorpo biotinilado (1:200, Vector), durante uma hora sob agitação leve. Em seguida, os cortes foram lavados com PB 0,01 M e depois incubado com solução ABC (1:200, Vectastain) por uma hora sob agitação. Após, lavou-se novamente com PB 0,01 M, e para a revelação empregou-se DAB, cuja reação conferiu ao citoplasma cor marrom escura, e depois lavou-se três vezes os cortes com PB 0,01 M por cinco minutos cada. Em seguida, os cortes foram montados em lâminas histológicas, para posterior análise em microscópio óptico.

5.1.9 Microdissecção, isolamento de RNA total e PCR quantitativo em tempo real

O RNA total foi isolado de cada amostra de tecido hipotalâmico microperfurado usando Reagente Trizol (Invitrogen®, Nova Zelândia) de acordo com o fabricante protocolo. A concentração de RNA em cada amostra foi determinada usando um leitor de microplacas de detecção múltipla (Synergy HT, BioTek) e 500 ng de RNA foi usado para a síntese de cDNA usando o High Capacity Kit de transcrição reversa de cDNA (Applied Biosystems, EUA). A PCR quantitativa em tempo real foi realizada usando um Applied Biosystems 7500 sistema de PCR em tempo real. O ensaio de expressão gênica TaqMan® (Applied Biosystems). Cada reação de PCR foi realizada em duplicata. Água (em vez de cDNA) foi usado como controle negativo. O gene constitutivo, beta actina, foi executado para cada amostra de cDNA. A determinação dos níveis de transcrição de genes em cada amostra foi obtida pelo método $\Delta\Delta\text{CT}$. Para cada amostra, o ciclo de limiar (Ct) foi determinado e normalizado para a média do gene housekeeping ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Unknown}} - \text{Ct}_{\text{housekeeping genes}}$). A mudança de dobra da expressão de mRNA na amostra desconhecida em relação ao grupo controle foi calculado como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, onde $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Unknown}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Calibrator}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

5.1.10 Análise estatística

Foi testada a distribuição normal e a homogeneidade dos dados e análise de Variância (ANOVA) two-way Anova seguida de teste *t* de Student Newman-Keuls (SNK). Foi considerado como nível de significância $p < 0,05$.

5.2 RESULTADOS

Protocolo 1. Efeitos da microinjeção intracerevrentricular de VIP ou PACAP sobre parâmetros metabólicos plasmáticos e ingestão de alimentos

Analisando as respostas de ingestão alimentar (figura 10A), verificam-se que os grupos que receberam VIP ou PACAP ingeriram menos alimento ($p < 0,05$) comparado com os respectivos grupos salina sem reposição ou com reposição de estradiol; observa-se ainda que as ratas tratadas com estradiol comeram menos que as que receberam óleo tanto para as microinjetadas com salina quanto para as microinjetadas com VIP ($p < 0,004$) ou PACAP ($p < 0,01$).

As microinjeções de VIP promoveram aumento ($p < 0,05$) das concentrações plasmáticas de glicose (figura 10B) tanto para os animais OVX+O quanto para os animais OVX+E comparado com os respectivos grupos Salina. A microinjeção de PACAP promoveu aumento da glicemia apenas no grupo OVX+O ($p < 0,005$) não sendo significativa sua ação nos animais OVX+E quando comparados com o grupo Salina ($p = 0,271$); entretanto, o aumento da concentração plasmática de glicose nos animais OVX+O foi significativamente maior em comparação aos animais OVX+E ($p < 0,003$) enquanto não houve diferença entre os grupos OVX+O e OVX+E que receberam salina.

A concentração de ácidos graxos livres após a microinjeção de VIP (figura 10C) não se alterou significativamente para o grupo OVX+O ($p = 0,597$), entretanto houve redução na concentração dos ácidos graxos livres para o grupo OVX-E ($p < 0,008$); a microinjeção de PACAP não promoveu alterações na concentração plasmática de ácidos graxos livres em nenhum dos grupos ou quando comparado entre eles.

A microinjeção de VIP não promoveu alterações na concentração plasmática de corticosterona (figura 10D) nas ratas OVX+O e OVX-E não houve modificações plasmáticas quando comparamos os animais VIP e Salina, entretanto houve aumento da corticosterona no grupo tratado com estradiol comparado ao grupo que recebeu óleo ($p < 0,023$), a microinjeção de PACAP também não foi capaz de promover alterações significativas dentro dos grupos OVX+O e OVX-E, mas houve aumento da concentração plasmática de corticosterona dos animais OVX-E quando comparado com os animais OVX+O ($p < 0,023$).

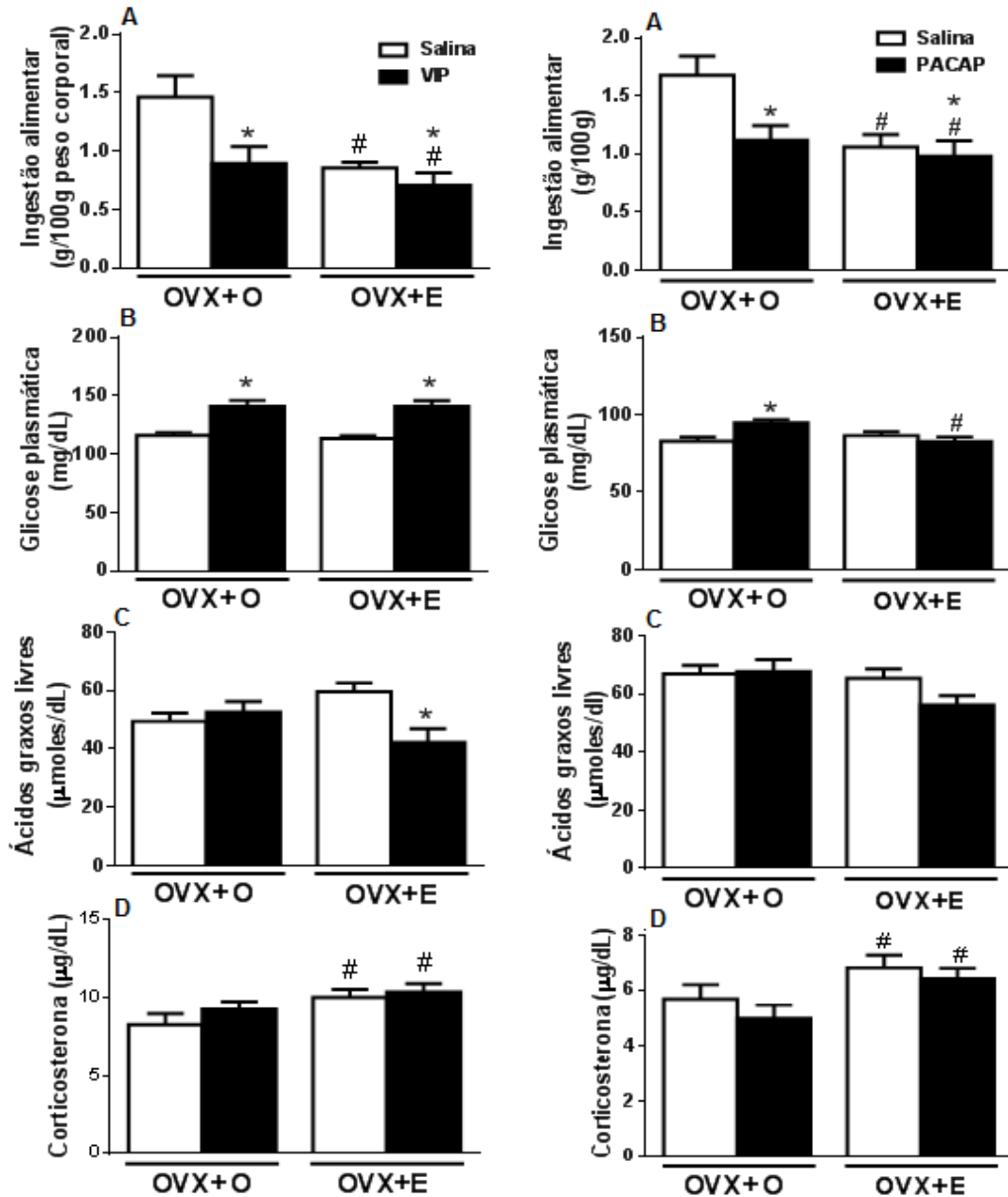


Figura 10. Valores de ingestão alimentar (A), concentrações plasmáticas de glicose (B), ácidos graxos livres (C) e corticosterona (D) de ratas ovariectomizadas bilateralmente (OVX) tratadas com estradiol (E; 10 $\mu\text{g}/0,2 \text{ mL}/\text{rata}$; sc) ou veículo (O; óleo de milho; 0,2 mL, sc) e microinjetadas ICV (ventrículo lateral direito) com Salina (0,9%), peptídeo intestinal vasoativo (VIP; 40 ng/g em 6 μL em 1 min) ou polipeptídeo hipofisário ativador de adenilciclase (PACAP; 4,0 ng/g 6 μL em 1 min). Dados expressos como média \pm SEM. *Diferente do grupo Salina. #Diferente do grupo OVX+O.

Protocolo 2. Efeitos da microinjeção intracerebroventricular de VIP ou PACAP em neurônios imunorreativos de antígenos relacionados a Fos (FRA) no PVN e ARC

A microinjeção de VIP promoveu um aumento no número de neurônios FRA-imunorreativos no PVN ($p < 0,001$) do grupo OVX+O (figura 11A e B); não houve diferença no número de neurônios reativos no PVN do grupo OVX-E, entretanto, houve redução no número de neurônios FRA-ir do grupo OVX-E quando comparado aos animais do grupo OVX+O ($p = 0,015$). O PACAP não promoveu mudanças significativas no número de neurônios FRA-ir no grupo OVX+O no ARC (figura 11C) e no grupo OVX-E no PVN (figura 11D), porém o grupo OVX-E que recebeu PACAP teve um aumento significativo no número de neurônios ativos no ARC (figura 11C), quando comparado ao seu controle ($p < 0,001$), e aos animais que receberam PACAP no grupo OVX+O ($p = 0,021$); no PVN apenas os animais do grupo OVX+O que receberam PACAP tiveram um aumento no número de neurônios FRA-ir quando comparados ao seu controle ($p = 0,026$).

Protocolo 3. Efeitos do tratamento com estradiol na expressão quantitativa de RNAm de VPAC2 e PAC1 por PCR em tempo real no PVN e ARC

Não houve diferença da expressão relativa do RNAm do VPAC2 no ARC de animais que foram ou não tratados com estradiol, entretanto no PVN mostrou-se redução significativa na expressão de RNAm do VPAC2 nos animais que foram tratados com estradiol ($p = 0,03$). Para o PAC1 não houve diferença na expressão de RNAm no ARC, entretanto, houve um aumento da expressão relativa do RNAm do PAC1 no PVN de animais que foram tratados com estradiol ($p = 0,02$) (figura 12 e figura 13).

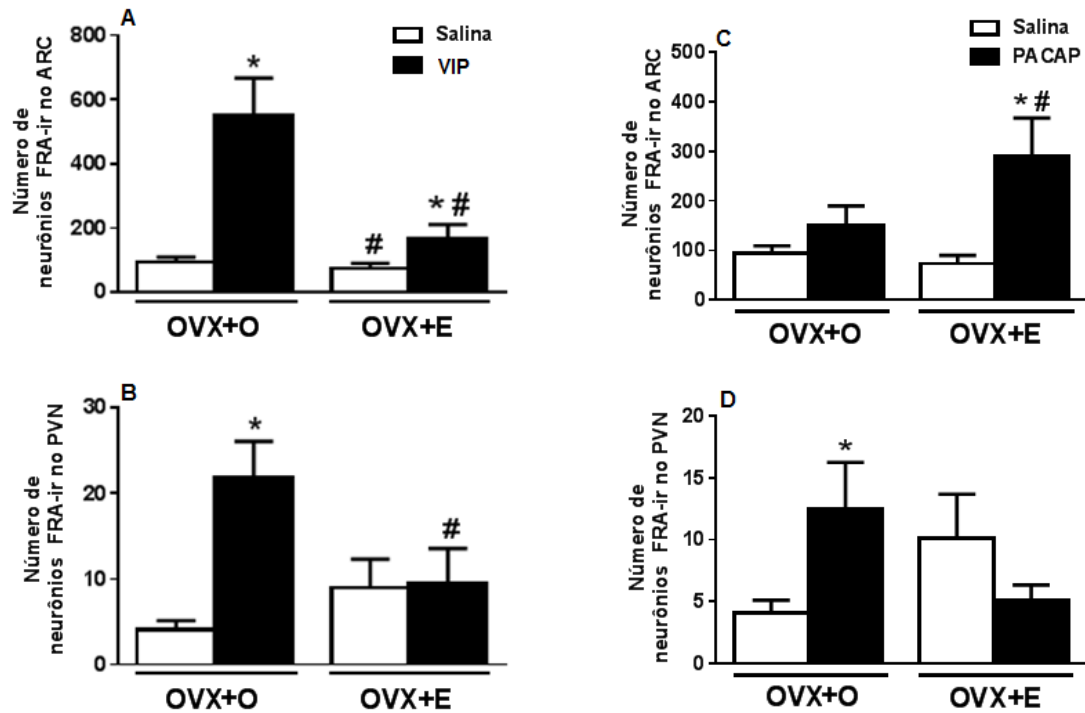


Figura 11. Número de neurônios imunorreativos a antígenos relacionados a Fos (FRA-ir) de ratas ovariectomizadas bilateralmente (OVX) tratadas com estradiol (E; 10 µg/0,2 mL/rata, sc) ou veículo (O; óleo de milho; 0,2 mL; sc) e microinjetadas ICV (ventrículo lateral direito) com Salina (0,9%), peptídeo intestinal vasoativo (VIP; 40 ng/g em 6 µL em 1 min) ou polipeptídeo hipofisário ativador de adenilciclase (PACAP; 4,0 ng/g 6 µL em 1 min). **A e C:** núcleo arqueado do hipotálamo (ARC). **B e D:** núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Os dados foram analisados pelo teste *t* e são apresentados como média ± SEM. *Diferente do grupo Salina ($p < 0,05$). #Diferente do grupo OVX+O ($p < 0,05$).

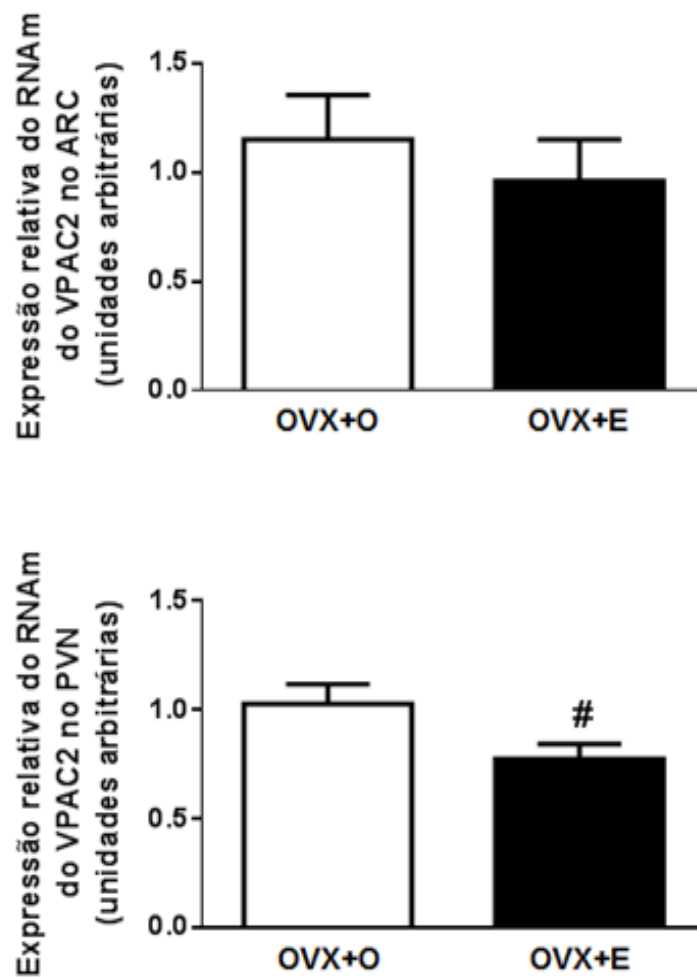


Figura 12. Expressão relativa do RNAm do VPAC2 no ARC e PVN de ratas ovariectomizadas bilateralmente (OVX) tratadas com estradiol (E; 10 μ g/0,2 mL/rata, sc) ou veículo (O; óleo de milho; 0,2 mL; sc). Os dados são expressos em unidades arbitrárias e como média \pm SEM. *Diferente do grupo Salina. #Diferente do grupo OVX+O.

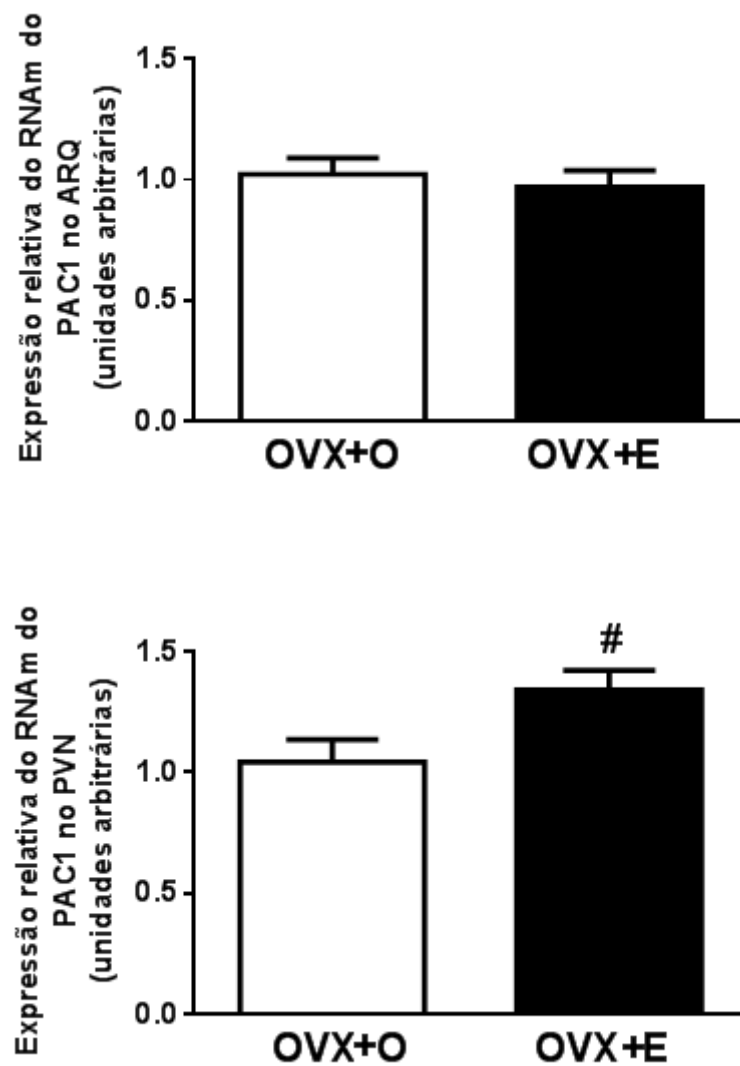


Figura 13. Expressão relativa do RNAm do PAC1 no ARC e PVN de ratas ovariectomizadas bilateralmente (OVX) tratadas com estradiol (E; 10 μ g/0,2 mL/rata, sc) ou veículo (O; óleo de milho; 0,2 mL; sc). Os dados são expressos em unidades arbitrárias e como média \pm SEM. *Diferente do grupo Salina. #Diferente do grupo OVX+O.

5.3 DISCUSSÃO

Neste trabalho, a microinjeção ICV de VIP ou PACAP em fêmeas castradas que foram ou não tratadas com estradiol, foi realizada para avaliar o papel dos estrógenos nas respostas anorexígena e metabólicas desses peptídeos e para isso foram analisados parâmetros plasmáticos, de ingestão, análises da expressão gênica e ativação de neurônios em núcleos do hipotálamo. Após as microinjeções, VIP e PACAP foram capazes de promover hipofagia e alterações metabólicas plasmáticas, além disso induziram ativação neuronal no ARC e PVN e tiveram variação na expressão relativa do RNAm dos receptores VPAC2 e PAC1 no PVN de fêmeas tratadas com estradiol.

A hipofagia e a hiperglicemia em fêmeas ovariectomizadas, promovidos pela microinjeção de VIP ICV, estão de acordo com trabalhos anteriores publicados (ITOH et al., 1982; GHOURAB et al., 2011; NAGAI et al., 1994; MARTINS et al., 2018; GARNICA-SIQUEIRA et al., 2019). Anos atrás, os efeitos inibitórios dos estrogênios no ganho de peso corporal foi reconhecido em modelos animais (DREWETT, 1973) e estabeleceram que ratas ovariectomizadas são hiperfágicas e ganham mais peso do que as fêmeas controle (WADE, 1972; TARTTELIN; GORSKI, 1973; WADE; GRAY, 1979; ASARIAN; GEARY, 2002). Além disso, efeito inibitório do estradiol sobre a ingestão alimentar estaria associado a mudanças no tamanho da refeição interferindo, na resposta de saciedade (BUTERA, 2010). Em nosso trabalho, fêmeas OVX-E microinjetadas com salina e VIP também tiveram uma redução da ingestão alimentar. A presença do estradiol foi capaz de promover redução na ingestão mesmo em animais que não receberam VIP indicando que apenas os estradiol já é capaz de promover o controle da ingestão, os animais do grupo OVX+E VIP também apresentaram redução na ingestão alimentar, corroborando trabalhos que mostram o efeito hipofágico do peptídeo. Quanto à hiperglicemia apresentada pelos animais OVX+E que receberam VIP, sabemos do envolvimento dos estrogênios na homeostase da glicose sanguínea, participando da regulação da sensibilidade a insulina no fígado, no músculo esquelético e no pâncreas por meio da liberação de insulina (ROPERO et al, 2008), entretanto não houve uma maior concentração ou redução de glicose em comparação ao grupo OVX+O, indicando que a ação aguda do VIP em promover hiperglicemia se mantém.

Os ácidos graxos livres, diferente da literatura (ITOH et al., 1982; GHOURAB et al., 2011; NAGAI et al., 1994; MARTINS et al., 2018; GARNICA-SIQUEIRA et al.,

2019), que mostra uma redução nas concentrações plasmáticas do mesmo, não sofreu alterações significativas nos animais OVX+O que receberam VIP. Os animais OVX-E que receberam VIP, entretanto, apresentaram uma redução na concentração plasmática de ácidos graxos. Esses resultados podem estar associados aos resultados obtidos nas análises de corticosterona, onde todos os animais OVX+E apresentaram aumento da concentração plasmática de corticosterona quando comparados ao grupo OVX+O. Estudos demonstraram que o aumento da concentração de corticosterona em ratas ovariectomizadas com reposição de estradiol ocorre porque a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é influenciada pelos esteroides sexuais (POLLARD et al., 1975). Fêmeas ovariectomizadas apresentam redução da concentração de corticosterona em comparação aos animais intactos que passaram por cirurgia fictícia (DE SOUZA et al., 2018). Em ratos machos Alexander e Sander (1994) mostraram que o VIP induz elevações de corticosterona no plasma de ratos quando microinjetado no PVN. Além disso, Itoh et al. (1982) mostraram que o VIP causa aumento de corticosterona no plasma quando administrado ICV. Deshaies et al. (1997) mostrou, em ratas ovariectomizadas e adrenalectomizadas, que a corticosterona é necessária para que os animais ovariectomizadas mantenham suas ações relacionadas ao metabolismo de lipídios. Além disso, a lipólise do tecido adiposo não é alterada diretamente pela presença ou ausência de estradiol (MacDONALD et al., 2017). Observando esses estudos, poderíamos sugerir, em nosso trabalho, que a diferença nas respostas obtidas nas concentrações de ácidos graxos livres de animais microinjetados com VIP estaria relacionada com o aumento da corticosterona, indicando a ação dela em controlar as respostas de lipídios, ao mesmo tempo em que a presença do estradiol interfere nas respostas de corticosterona, sendo o VIP um protagonista secundário nesses efeitos gerenciados pelo estradiol.

Semelhante aos achados de VIP e de acordo com a literatura, a microinjeção de PACAP promove a redução de ingestão alimentar (MIZUNO et al., 1998; MORLEY et al., 1992), e, da mesma forma que ocorre com o VIP, fêmeas OVX+E tem a ingestão menor que as fêmeas OVX, firmando a ação dos estrógenos em participar do controle da ingestão alimentar em fêmeas e corroborando, ainda mais, outros trabalhos da literatura (TARTTELIN; GORSKI, 1973; WADE; GRAY, 1979; ASARIAN; GEARY, 2002; BUTERA, 2010; DE SOUZA et al., 2018).

A microinjeção ICV de PACAP promoveu hiperglicemia em fêmeas ovariectomizadas. Yi et al. (2010) em ratos e Mounien et al. (2009) em camundongos, todos com injeção ICV de PACAP mostraram aumento nas concentrações plasmáticas de glicose. O grupo OVX+E não apresentou alterações dentro do próprio grupo, entretanto, os animais que receberam PACAP tiveram uma redução significativa na concentração plasmática de glicose quando comparados aos animais do grupo OVX que receberam PACAP. Os estrogênios têm sido relacionados ao metabolismo da glicose há muito tempo (ROPERO et al., 2008). Ratas e camundongas ovariectomizadas são resistentes à insulina, têm deficiência na eliminação de glicose estimulada pelo exercício no músculo (CAMPBELL; FEBBRAIO, 2002) e a reposição de estradiol mantém a ação da insulina e a tolerância à glicose (STUBBINS et al., 2012). Além disso a ação dos estrogênios em ligar aos seus receptores de membrana presentes em diversos tecidos, como músculo esquelético, tecido adiposo, fígado, e ativar esses receptores ajuda a regular a atividade das células excitáveis relevantes para o balanço energético e homeostase da glicose: células beta de insulina, células alfa secretoras de glucagon e neurônios hipotalâmicos de dopamina e POMC (ROPERO et al., 2008). Considerando que os estrógenos têm papel importante no controle do metabolismo da glicose, em nosso trabalho podemos sugerir que a presença dos estrógenos é suficiente para controlar e impedir o aumento de glicose promovida pelo PACAP.

Não houve diferença significativa nos ácidos graxos livres para todos os grupos e animais avaliados. Os dados por nós obtidos em machos (primeiro artigo deste trabalho), tivemos uma resposta semelhante nos ácidos graxos para a microinjeção de PACAP, onde os ratos não apresentaram alteração nos ácidos graxos livres após a microinjeção de PACAP no ventrículo lateral. Os dados nas fêmeas então reforça a ideia de que o PACAP ICV, diretamente, não promove alterações nos ácidos graxos. PACAP também não alterou as concentrações plasmáticas de corticosterona nas fêmeas ovariectomizadas, semelhante ao que encontramos em machos (primeiro artigo), entretanto o PACAP promoveu o aumento de corticosterona nos animais OVX+E quando comparados com o grupo OVX+O.

O PACAP tem a capacidade de estimular a adenilato ciclase nas células da hipófise anterior e aumentar a liberação de hormônio hipofisário, incluindo corticotropina (MIYATA et al. 1989; VAUDRY et al. 2009). A presença e a expressão

do PACAP e do seu receptor PAC1 no hipotálamo, hipófise glândula e a glândula adrenal, auxilia na produção e liberação de hormônios nesses tecidos (VAUDRY et al. 2009), além disso a administração central de PACAP, em machos induz comportamentos relacionados ao estresse e injeção periférica de PACAP aumenta a concentração de corticosterona e epinefrina (AGARWAL et al. 2005). Entretanto, o estradiol afeta a resposta de corticosterona em fêmeas, especialmente durante o estresse, mas estudos mostraram que a ovariectomia reduz os valores basais de corticosterona, e a reposição de estradiol os aumenta (KITAY, 1963; PHILLIPS; POOLSANGUAN, 1978), outros trabalhos mostram que concentrações basais de corticosterona (PHILLIPS; POOLSANGUAN, 1978; VIAU; MEANEY, 1991) são mais altas no proestro quando os valores de estrógenos estão mais altos, além disso, foi demonstrado que ratas que receberam reposição de estrógeno após ovariectomia tem concentração de corticosterona pós-estresse significativamente mais altas do que as controles (PHILLIPS; POOLSANGUAN, 1978; VIAU; MEANEY, 1991). Desse modo podemos sugerir que o aumento de corticosterona encontrado no grupo OVX+E é proveniente da ação do estradiol, e a ação do PACAP não se soma com a do estradiol.

PVN e ARC são dois núcleos hipotalâmicos bem estabelecidos como importantes para regulação de hormônios e nutrientes além de participarem do controle de ingestão alimentar (GOLD et al., 1977; SIMS; LORDEN, 1986; JHANWAR-UNIYAL et al., 1990; HAHN et al., 1998; KOHNO; CONE, et al., 2001; WILLIAMS et al., 2001; BOURET et al, 2004; WORTLEY et al., 2004; YADA, 2012). Joo et al. (2004) mostraram, por meio da imunistoquímica e imunofluorescência, que os receptores de VIP e PACAP (VPAC1, VPAC2 e PAC1) têm padrões de distribuição distintos, complementares e sobrepostos; esses peptídeos então exercem suas diversas funções por meio de seus receptores em locais específicos e em diferentes combinações e que PVN e ARC expressam receptores para VIP e PACAP. FRA (antígenos relacionados à Fos) são proteínas que alteram a transcrição celular, positiva ou negativamente, em resposta aos sinais na superfície celular, e são usados na avaliação de ativação neuronal (DRAGUNOW, 1990; MORGAN; CURRAN, 1989; SHARP et al, 1991; HOFFMAN et al, 1993). A marcação com FRA indica que o neurônio marcado foi ativado dentro daquele período de avaliação. Em nosso trabalho observamos que para o VIP no PVN tivemos aumento de neurônios FRA-ir nos animais OVX+O que receberam VIP, entretanto os animais

OVX+E que receberam VIP não diferiram de seu controle e ainda tiveram uma redução significativa no número de neurônios FRA-ir em comparação aos animais OVX/VIP. Para a região de ARC tivemos aumento no número de neurônios FRA-ir nos animais dos grupos OVX+O e OVX+E que receberam VIP, contudo a expressão de FRA nos animais OVX+E foi menor, significativamente, em comparação aos animais OVX ovariectomizadas que receberam VIP. Podemos adicionar ainda a este cálculo a expressão relativa de RNAm dos receptores, onde VAPC2, se mostrou reduzido no PVN de animais tratados com estradiol, enquanto no ARC não houve diferença na expressão, e, para o PAC1 tivemos um aumento na expressão de RNAm no PVN de ratos OVX+E, enquanto o no ARC não há diferença na expressão.

Gozes et al. (1989) mostraram que a expressão gênica do RNAm do VIP, no hipotálamo, foi significativamente diminuída após a ovariectomia e esta diminuição foi revertida após três dias de tratamento com dibenzoato de estradiol, o que não ocorreu com os machos, sugerindo que há dimorfismo sexual no que diz respeito à regulação esteróide da expressão do gene VIP hipotalâmico no rato. Inclusive, foi relatado que o estradiol estimula a expressão de RNAm do PACAP nos núcleos hipotalâmicos ventromedial e arqueado, enquanto a progesterona aumenta os níveis de RNAm de PACAP e PAC1 no hipotálamo e ovário de ratos (HA et al., 2000; PARK et al., 2000; APOSTOLAKIS et al., 2004) e a castração dos animais leva à diminuição dos níveis de PACAP no cérebro e nos tecidos hipofisários de ratos Wistar machos e fêmeas (NEMETH et al., 2006). Além disso, há um aumento da expressão de RNAm de PACAP no PVN durante o período de proestro das fêmeas e que decaí com o tempo (MOORE et al., 2005), e há uma redução nas concentrações de RNAm do VIP após sete dias de tratamento com estradiol, o que implica que a exposição prolongada ao estradiol pode ter efeitos indiretos na expressão do gene do VIP (GOZES et al., 1989).

Neurônios de ocitocina no PVN não respondem diferencialmente ao tratamento com estradiol, sugerindo que o estradiol não estaria modulando a atividade neuronal da ocitocina no PVN (KENNETT et al., 2008) e apenas uma pequena população de neurônios no PVN concentra estradiol (RHODES et al., 1981, 1982). Trabalhos anteriores sugerem que a ocitocina seja um regulador do VIP na homeostase energética (MARTINS et al., 2018). Por outro lado neurônios POMC do núcleo arqueado expressam receptores PAC1 e VPAC2 e o PACAP provoca um

aumento significativo na biossíntese e liberação de alfa-MSH de explantes hipotalâmicos (MOUNIEN et al, 2006) e o bloqueio dos receptores de melanocortina por uma quantidade moderada de antagonista promoveu, de maneira parcial, o efeito do PACAP na ingestão, mostrando que, pelo menos em parte, a anorexia induzida pela injeção central de PACAP é mediada pela ativação da via da melanocortina (MOUNIEN et al., 2009). NPY/AgRP são necessários para mediar os efeitos anorexígenos dos estrogênios, e a expressão hipotalâmica dos mesmos é regulada, em camundongos, ao longo do ciclo estral, com os níveis mais baixos durante o estro, coincidindo com o pico de estrogênio plasmático, entretanto não há expressão do receptor de estrogênio em neurônios NPY/AgRP, o estrogênio, então, estaria regulando esses neurônios indiretamente, por exemplo, através de neurônios POMC (OLOFSSON et al., 2009).

Com esses estudos é atrativo sugerir que as mudanças encontradas na expressão relativa do RNAm do VPAC 2 no PVN de animais OVX+E é causa indireta da exposição prolongada ao estradiol que também leva a diminuição do RNAm do VIP e que o aumento da expressão de PAC1 no PVN de animais OVX-E estaria associado a presença do estradiol e sua manutenção. E o aumento dos neurônios imunorreativos seguem essa indicação com o extra de vermos como o VIP age de maneira mais independente dos estrógenos apesar de suas ações metabólicas gerais ainda estarem ligadas a ele, com o PACAP estando diretamente relacionado com o ARC e aos estrógenos, ajudando a dar forças a hipótese de que ações VIP e PACAP, especialmente no ARC, nas ações hipofágicas e no metabolismo energético periférico, estão relacionadas com o sistema da melanocortina com ações nos neurônios do PVN.

5.4 CONCLUSÃO

Em resumo, o presente estudo mostra que para o VIP os estrógenos agem de uma forma mais indireta, não interferindo na ação principal do peptídeo em promover redução da ingestão alimentar e hiperglicemia, entretanto os estrógenos parecem ter participação ativa nas ações do PACAP, que pode ser ressaltado através do aumento da expressão PAC1 e dos neurônios imunorreativos especialmente no ARC. Com a ação dos estrógenos, podemos apontar o ARC e o PACAP como duas

engrenagens a trabalhar juntas, enquanto o VIP age de maneira mais independente ainda que tendo os estrógenos para mediar ações colaterais.

5.5 REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; HALVORSON, L. M.; LEGRADI, G. Pituitary adenylatecyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Molecular Brain Research*, v. 138, n. 1, p. 45-57, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.03.016>

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. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(94\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0167-0115(94)90068-X)

ALLEN, J. M.; BALBI, D. Structure and expression of the neuropeptide Y gene. The biology of neuropeptide y and related peptides. *Contemporary Neuroscience*, p. 43-64, 1993. In: Colmers, W.F., Wahlestedt, C. (eds) *The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides*. Contemporary Neuroscience. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-465-8_2

APOSTOLAKIS, E. M.; RIHERD, D. N.; O'MALLEY, B. W. PAC1 receptors mediate pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide- and progesterone-facilitated receptivity in female rats. *Molecular Endocrinology*, v. 19, n. 11, 2798-2811, 2005. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0387>

ARIMURA, A. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Japanese Journal of Physiology*, v. 48, p. 301–331, 1998. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.48.301>

ASARIAN, L.; GEARY, N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Hormones and behavior*, v. 42, n. 4, 461-471, 2002. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2002.1835>

BOURET, S. G.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. 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. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004>

BROBECK, J. R.; WHEATLAND, M.; STROMINGER, J. L. Variations in regulation of energy exchange associated with estrus, diestrus and pseudo pregnancy in rats. *Endocrinology*, v. 40, n. 2, p. 65-72, 1947. <https://doi.org/10.1210/endo-40-2-65>

BROWN, L. M.; CLEGG, D. J. Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 122, n. 1-3, p. 65-73, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.12.005>

CAMPBELL, S. E.; FEBBRAIO, M. A. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 282, n. 5, p. E1139-E1146, 2002. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00184.2001>

BUTERA, P. C. Estradiol and the control of food intake. *Physiology and Behavior*, v. 99, n. 2, 175-180, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.06.010>

CHANCE, W. T.; THOMPSON, H.; THOMAS, I.; FISCHER, J. E. Anorectic and neurochemical effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in rats. *Peptides*, v. 16, n. 8, p. 1511-1516, 1995. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(95\)02048-9](https://doi.org/10.1016/0196-9781(95)02048-9)

CLEGG, D. J.; BROWN, L. M.; ZIGMAN, J. M.; KEMP, C. J.; STRADER, A. D.; BENOIT, S. C.; GEARY, N. Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes*, v. 56, n. 4, p. 1051-1058, 2007. <https://doi.org/10.2337/db06-0015>

CONE, R. D.; COWLEY, M. A.; BUTLER, A. A.; FAN, W.; MARKS, D. L.; LOW, M. J. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity*, v. 25, n. 5, p. S63-S67, 2001. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801913>

CONE, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, v. 8, n. 5, p. 571-578, 2004. <https://doi.org/10.1038/nn1455>

NASCIMENTO CURI, C. O. D.; RIBEIRO, E. B.; ZAIA, C. T. B. V.; DOLNIKOFF, M. S. Glycemic response to stress stimulation by ether exposure in adrenalectomized rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 37, n. 3, p. 399-403, 1990. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90003-Z](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90003-Z)

DE SOUZA, C. F.; STOPA, L. R. S.; SANTOS, G. F.; TAKASUMI, L. C. N.; MARTINS, A. B.; GARNICA-SIQUEIRA, M. C.; ZAIA, C. T. B. V.; UCHOA, E. T. Estradiol protects against ovariectomy-induced susceptibility to the anabolic effects of glucocorticoids in rats. *Life Sciences*, v. 218, p. 185-196, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.037>

DESHAIES, Y. V. E. S.; DAGNAULT, A. N. N. E.; LALONDE, J. O. S. F. E.; RICHARD, D. E. N. I. S. Interaction of corticosterone and gonadal steroids on lipid deposition in the female rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 273, n. 2, p. E355-E362, 1997. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.273.2.E355>

DRAGUNOW, M.; ROBERTSON, H. A. Kindling stimulation induces c-fos protein (s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature*, v. 329, n. 6138, p. 441-442, 1987. <https://doi.org/10.1038/329441a0>

DREWETT, R. F. Oestrous and dioestrous components of the ovarian inhibition on hunger in the rat. *Animal Behaviour*, v. 21, n. 4, 772-780, 1973. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(73\)80103-4](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(73)80103-4)

- FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma. *Clinica Chimica Acta*, v. 46, n. 2, p. 105-111, 1973. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(73\)90016-8](https://doi.org/10.1016/0009-8981(73)90016-8)
- FAULCONBRIDGE, L. F.; CUMMINGS, D. E.; KAPLAN, J. M.; GRILL, H. J. Hyperphagic effects of brainstem ghrelin administration. *Diabetes*, v. 52, n. 9, 2260-2265, 2003. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.9.2260>
- FOLADOR, A.; ZAIA, C. T. B. V.; FERNANDE, L. C. *Estudando a ação dos esteróides gonadais*. Cap. 24. In: CURI, R.; PROCOPIO, J.; FERNANDES, L. C. *Praticando Fisiologia*. Barueri: Editora Manole Ltda, 2005.
- GARNICA-SIQUEIRA, M. C.; MARTINS, A. B.; STOPA, L. R.; DE SOUZA, C. F.; ZAIA, D. A. M.; LEITE, C. M.; ZAIA, C.T.V.B.; UCHÔA, E. T. Adrenalectomy impairs vasoactive intestinal peptide-induced changes in food intake and plasma parameters. *Endocrine*, v. 65, n. 3, 675-682, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12020-019-02012-w>
- GEARY, N. Estradiol, CCK and satiation. *Peptides*, v. 22, n.8, p. 1251-1263, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00449-1](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00449-1)
- GEARY, N. 2004. *The estrogenic inhibition of eating*. In *Neurobiology of food and fluid intake* (pp. 307-345). Boston, MA: Springer. https://doi.org/10.1007/0-306-48643-1_12
- GHOUREB, S.; BEALE, K. E.; SEMJONOUS, N. M.; SIMPSON, K. A.; MARTIN, N. M.; GHATEI, M. A.; SMITH, K. L. Intracerebroventricular administration of vasoactive intestinal peptide inhibits food intake. *Regulatory Peptides*, v. 172, n. 1-3, p. 8-15, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2011.07.006>
- GOLD, R. M.; JONES, A. P.; SAWCHENKO, P. E.; KAPATOS, G. Paraventricular area: critical focus of a longitudinal neurocircuitry mediating food intake. *Physiology and Behavior*, v. 18, n. 6, p. 1111-1119, 1977. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(77\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90019-1)
- GOZES, E.; WERNER, H.; FAWZI, M.; ABDELATY, A.; SHANI, Y.; FRIDKIN, M.; KOCH, Y. Estrogen regulation of vasoactive intestinal peptide mRNA in rat hypothalamus. *Journal of Molecular Neuroscience*, v.1, n. 3, p. 55-61,1989. <https://doi.org/10.1007/BF02918891>
- GUILLEMIN, R.; CLAYTON, G. W.; SMITH, J. D.; LIPSCOMB, H. S. Measurement of free corticosteroids in rat plasma: physiological validation of a method. *Endocrinology*, v. 63, n. 3, 349-358, 1958. <https://doi.org/10.1210/endo-63-3-349>
- HA, C. M.; KANG, J. H.; CHOI, E. J.; KIM, M. S.; PARK, J. W.; KIM, Y.; LEE, B. J. Progesterone increases mRNA levels of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and type I PACAP receptor (PAC1) in the rat hypothalamus. *Molecular Brain Research*, v. 78, n. 1-2, 59-68, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00070-X](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00070-X)

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. <https://doi.org/10.1038/1082>

Harmar, A. J.; Marston, H. M.; Shen, S.; Spratt, C.; West, K. M.; Sheward, W. J.; Morrison, C. F.; Dorin, J. R.; Piggins, H. D.; Reubi, J. C.; Kelly, J. S.; Maywood, E. S.; Hastings, M. H. The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell*, v. 109, n. 4, p. 497-508, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00736-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00736-5)

HOFFMAN, G. E.; MURPHY, A. Z. *Anatomical markers of activity in hypothalamic systems*. In: Conn, P.M., Freeman, M.E. (Eds.), *Neuroendocrinology*. New Jersey: Human Press, pp. 541–552, 2000.

HOFFMAN, G. E.; SMITH, M. S.; VERBALIS, J. G. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinology*, v. 14, p. 173–213, 1993. <https://doi.org/10.1006/frne.1993.1006>

HONG, J.; STUBBINS, R. E.; SMITH, R. R.; HARVEY, A. E.; NÚÑEZ, N. P. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. *Nutrition Journal*, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2009. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-8-11>

HUGHES, A. T. L.; GUILDING, C.; PIGGINS, H.D. . Neuropeptide signaling differentially affects phase maintenance and rhythm generation in SCN and extra-SCN circadian oscillators. *PLoS One*, v. 6, e18926, p. 1-10, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018926>

ITOH, S.; HIROTA, R.; KATSUURA, G. Effect of cholecystokinin octapeptide and vasoactive intestinal polypeptide on adrenocortical secretion in the rat. *The Japanese Journal of Physiology*, v. 32, n.4, p. 553-560,1982. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.32.553>

JHANWAR-UNIYAL, M.; BECK, B.; BURLET, C.; LEIBOWITZ, S. F. Diurnal rhythm of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the suprachiasmatic, arcuate and paraventricular nuclei and other hypothalamic sites. *Brain Research*, v. 536, n. 1-2, p. 331-334, 1990. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90045-D](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90045-D)

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, p. 388–413, 2004. <https://doi.org/10.1002/cne.20231>

KENNETT, J. E.; POLETINI, M. O.; FREEMAN, M. E. Vasoactive intestinal polypeptide modulates the estradiol-induced prolactin surge by entraining oxytocin neuronal activity. *Brain Research*, v. 1196, p. 65-73, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.061>

KITAY, J. I. Pituitary-adrenal function in the rat after gonadectomy and gonadal hormone replacement. *Endocrinology*, v. 73, n. 2, p. 253-260, 1963. <https://doi.org/10.1210/endo-73-2-253>

KOCHO-SHELLENBERG, M.; LEZAK, K. R.; HARRIS, O. M.; ROELKE, E.; GICK, N.; CHOI, I.; EDWARDS, S.; WASSERMAN, E.; TOUFEXIS, D. J.; BRAAS, K. M.; MAY, V.; HAMMACK, S. E. PACAP in the BNST produces anorexia and weight loss in male and female rats. *Neuropsychopharmacology* v. 39, p. 1614-1623, 2014. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.8>

KOHNO, D.; YADA, T. Arcuate NPY neurons sense and integrate peripheral metabolic signals to control feeding. *Neuropeptides*, v. 46, n. 6, p. 315-319, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.09.004>

LARA-GALVÃO, M. O. *Efeito do peptídeo ativador da adenilciclase hipofisária no controle do metabolismo periférico e da ingestão alimentar*. [Monografia de Bacharelado em Biomedicina – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR], Londrina, 35p, 2003.

LEZAK, K. R.; ROELKE, E.; HARRIS, O. M.; CHOI, I.; EDWARDS, S.; GICK, N.; COCCHIARO, G.; MISSIG, G.; ROMAN, C. W.; BRAAS, K. M.; TOUFEXIS, D. J.; MAY, V.; HAMMACK, S. E. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) increases corticosterone in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, v. 45, p. 11-20, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.03.007>

LITWAK, S. A.; WILSON, J. L.; CHEN, W.; GARCIA-RUDAZ, C.; KHAKSARI, M.; COWLEY, M. A.; ENRIORI, P. J. Estradiol prevents fat accumulation and overcomes leptin resistance in female high-fat diet mice. *Endocrinology*, v. 155, n. 11, p. 4447-4460, 2014. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1342>

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

MacDONALD, T. L.; MacPHERSON, R.; CASTELLANI, L.; CERVONE, D.; ANDERSON, E.; WRIGHT, D. C.; DYCK, D. J. Estradiol does not directly regulate adipose lipolysis. *Adipocyte*, v. 6, n. 2, p. 76-86, 2017. <https://doi.org/10.1080/21623945.2017.1287638>

MAGISTRETTI, P. J.; MORRISON, J. H.; SHOEMAKER, W. J.; SAPIN, V.; BLOOM, F. E. Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices: a possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 78, n. 10, p. 6535-6539, 1981. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6535>

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, n. 1, p. 177-183, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3106-x>

MATYŠKOVÁ, R.; ŽELEZNÁ, B.; MAIXNEROVA, J.; KOUTOVA, D.; HALUZIK, M.; MALETINSKA, L. Estradiol supplementation helps overcome central leptin

resistance of ovariectomized mice on a high fat diet. *Hormone and Metabolic Research*, v. 42, n. 3, p. 182-186, 2010. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1243250>

MESSINA, M. M.; BOERSMA, G.; OVERTON, J. M.; ECKEL, L. A. Estradiol decreases the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone in ovariectomized rats. *Physiology and Behavior*, v. 88, n. 4-5, p. 523-528, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.05.002>

MIYATA, A.; ARIMURA, A.; DAHL, R. R.; MINAMINO, N.; UEHARA, A.; JIANG, L.; CULLER, M. D.; COY, D. H. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 164, p. 567-574, 1989. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91757-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91757-9)

MIZUNO, Y.; KONDO, K.; TERASHIMA, Y.; ARIMA, H.; MURASE, T.; OISO, Y. Anorectic effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rats: lack of evidence for involvement of hypothalamic neuropeptide gene expression. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 10, n. 8, p. 611-616, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1998.00244.x>

MOORE JR, J. P.; BURGER, L. L.; DALKIN, A. C.; WINTERS, S. J. 2005. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide messenger RNA in the paraventricular nucleus and anterior pituitary during the rat estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v. 73, n. 3, p. 491-499. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041624>

MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends in Neurosciences*, v. 12, n. 11, p. 459-462, 1989. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90096-9](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90096-9)

MORIN, A.; MOYSE, E.; DENOROY, L.; JOUVET, M. VIP binding sites in adult rat hypothalamus: nuclear distribution and daily variations. *Peptides*, v. 15, n. 1, p. 117-123, 1994. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)90179-1](https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)90179-1)

MORLEY, J. E.; HOROWITZ, M.; MORLEY, P. M.; FLOOD, J. F. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) reduces food intake in mice. *Peptides*, v. 13, n.6, p. 1133-1135, 1992. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(92\)90019-Y](https://doi.org/10.1016/0196-9781(92)90019-Y)

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, n. 1, 155-163, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.07.022>

MOUNIEN, L.; DO REGO, J. C.; BIZET, P.; BOUTELET, I.; GOURCEROL, G.; FOURNIER, A.; JÉGOU, S.. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits food intake in mice through activation of the hypothalamic melanocortin system. *Neuropsychopharmacology*, v. 34, n.2, p. 424-435, 2009. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.73>

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, n.1, p. 29-34, 1994.
<https://doi.org/10.3164/jcbrn.17.29>

NEMETH, J.; TAMAS, A.; JOZSA, R.; HORVATH, J. E.; JAKAB, B.; LENGVARI, I.; REGLODI, D. Changes in PACAP levels in the central nervous system after ovariectomy and castration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1070, n.1, p. 468-473, 2006. <https://doi.org/10.1196/annals.1317.063>

OLOFSSON, L. E.; PIERCE, A. A.; XU, A. W. Functional requirement of AgRP and NPY neurons in ovarian cycle-dependent regulation of food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n.37, p. 15932-15937, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904747106>

PARK, J. I.; KIM, W. J.; WANG, L.; PARK, H. J.; LEE, J.; PARK, J. H.; CHUN, S. Y. Involvement of progesterone in gonadotrophin-induced pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene expression in pre-ovulatory follicles of rat ovary. *Molecular Human Reproduction*, v. 6, n. 3, p. 238-245, 2000. <https://doi.org/10.1093/molehr/6.3.238>

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York, NY: Academic Pres, 2009.

PISEGNA, J. R.; WANK, S. A. Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, n. 13, p. 6345-6349, 1993. doi: 10.1073/pnas.90.13.6345

PHILLIPS, J. G.; POOLSANGUAN, W. A method to study temporal changes in adrenal activity in relation to sexual status in the female laboratory rat. *Journal of Endocrinology*, v. 77, n. 3, p. 283-291, 1978. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0770283>

POLLARD, I.; WHITE, B. M.; BASSETT, J. R.; CAIRNCROSS, K. D. Plasma glucocorticoid elevation and desynchronization of the estrous cycle following unpredictable stress in the rat. *Behavioral Biology*, v. 14, n. 1, p. 103-108, 1975. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(75\)90374-0](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(75)90374-0)

RESCH, J. M.; MAUNZE, B.; GERHARDT, A. K.; MAGNUSON, S. K.; PHILLIPS, K. A.; CHOI, S. J. Intrahypothalamic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates energy balance via site-specific actions on feeding and metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 305, p. E1452-E1463, 2013. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00293.2013>

RHODES, C. H.; MORRELL, J. I.; PFAFF, D. W. Distribution of estrogen-concentrating, neurophysin-containing magnocellular neurons in the rat hypothalamus as demonstrated by a technique combining steroid autoradiography and immunohistology in the same tissue. *Neuroendocrinology*, v. 33, n. 1, p. 18-23, 1981. <https://doi.org/10.1159/000123195>

RHODES, C. H.; MORRELL, J. I.; PFAFF, D. W. Estrogen-concentrating neurophysin-containing hypothalamic magnocellular neurons in the vasopressin-

deficient (Brattleboro) rat: a study combining steroid autoradiography and immunocytochemistry. *Journal of Neuroscience*, v. 2, n. 12, p. 1718-1724, 1982. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.02-12-01718.1982>

RIANT, E.; WAGET, A.; COGO, H.; ARNAL, J. F.; BURCELIN, R.; GOURDY, P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology*, v. 150, n.5, p. 2109-2117, 2009. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0971>

ROPERO, A. B.; ALONSO-MAGDALENA, P.; QUESADA, I.; NADAL, A. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids*, v. 73, n. 9-10, p. 874-879, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.12.018>

SAID, S. I.; MUTT, V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*, v. 169, n. 3951, p. 1217-1218, 1970. <https://doi.org/10.1126/science.169.3951.1217>

SANTOLLO, J.; ECKEL, L. A. Estradiol decreases the orexigenic effect of neuropeptide Y, but not agouti-related protein, in ovariectomized rats. *Behavioural Brain Research*, v. 191, n. 2, p. 173-177, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.019>

SEGAL, J. P.; STALLINGS, N. R.; LEE, C. E.; ZHAO, L.; SOCCI, N.; VIALE, A.; HARRIS, T. M.; SOARES, M. B.; CHILDS, G.; ELMQUIST, J. K.; PARKER, K. L.; FRIEDMAN, J. F. Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 4181-4188, 2005. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0158-05.2005>

SHARP, F. R.; SAGAR, S. M.; HICKS, K.; LOWENSTEIN, D.; HISANAGA, K. c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress. *Journal of Neuroscience*, v. 11, n.8, p. 2321-2331, 1991. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-08-02321.1991>

SILVA, L. E. C. M.; CASTRO, M.; AMARAL, F. C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. K. Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 43, p. 759-766, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500059>

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W.; CHANG, C.; MURAMATSU, M. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology*, v. 294, n.1, p. 76-95, 1990. <https://doi.org/10.1002/cne.902940107>

SLONAKER, J. R. The effect of copulation, pregnancy, pseudopregnancy and lactation on the voluntary activity and food consumption of the albino rat. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, v. 71, n. 2, p. 362-394, 1925. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1925.71.2.362>

SIMS, J. S.; LORDEN, J. F. Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels. *Behavioural Brain Research*, v. 22, n. 3, 265-281, 1986. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(86\)90071-9](https://doi.org/10.1016/0166-4328(86)90071-9)

SPENGLER, D.; WAEBER, C.; PANTALONI, C.; HOLSBOER, F.; BOCKAERT, J.; SEEBURG, P. H.; JOURNOT, L. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature*, v. 365, p. 170-175, 1993. <https://doi.org/10.1038/365170a0>

STUBBINS, R. E.; HOLCOMB, V. B.; HONG, J.; NÚÑEZ, N. P. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. *European Journal of Nutrition*, v. 51. n. 7, p. 861-870, 2012a. <https://doi.org/10.1007/s00394-011-0266-4>

STUBBINS, R. E.; NAJJAR, K.; HOLCOMB, V. B.; HONG, J.; NÚÑEZ, N. P. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 14, n. 1, p. 58-66, 2012b. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01488.x>

TARTTELIN, M. F.; GORSKI, R. A. The effects of ovarian steroids on food and water intake and body weight in the female rat. *European Journal of Endocrinology*, v. 72, n. 3, p. 551-568, 1973. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0720551>

TAYLOR, D. P.; PERT, C. B. Vasoactive intestinal polypeptide: specific binding to rat brain membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 76, n. 2, p. 660-664, 1979. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.660>

TITOLO, D.; CAI, F.; BELSHAM, D. D. Coordinate regulation of neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression by estrogen depends on the ratio of estrogen receptor (ER) α to ER β in clonal hypothalamic neurons. *Molecular Endocrinology*, v. 20, n. 9, p. 2080-2092, 2006. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0027>

THAMMACHAROEN, S.; LUTZ, T. A.; GEARY, N.; ASARIAN, L. Hindbrain administration of estradiol inhibits feeding and activates estrogen receptor- α -expressing cells in the nucleus tractus solitarius of ovariectomized rats. *Endocrinology*, v. 149, n. 4, p. 1609-1617, 2008. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0340>

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 6, n. 1, 24-27, 1969.

USDIN, T. B.; BONNER, T. I.; MEZEY, E. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology*, v. 135, p. 2662-2680, 1994. <https://doi.org/10.1210/endo.135.6.7988457>

VAUDRY, D.; FALLUEL-MOREL, A.; BOURGAULT, S.; BASILLE, M.; BUREL, D.; WURTZ, O.; FOURNIER, A.; CHOW, B. K. C.; HASHIMOTO, H.; GALAS, L.; VAUDRY, H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacology Review*, v. 61, 2830357, 2009. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>

VIAU, V.; MEANEY, M. J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*, v. 129, n. 5, p. 2503-2511, 1991. <https://doi.org/10.1210/endo-129-5-2503>

WADE, G. N.; GRAY, J. M. Cytoplasmic 17β -[3H] estradiol binding in rat adipose tissues. *Endocrinology*, v. 103, n. 5, p. 1695-1701, 1978. <https://doi.org/10.1210/endo-103-5-1695>

WADE, G. N.; GRAY, J. M. Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiology and Behavior*, v. 22, n. 3, p. 583-593, 1979. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(79\)90028-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(79)90028-3)

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. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00612-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00612-6)

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. <https://doi.org/10.1126/science.280.5368.1378>

WORTLEY, K. E.; CHANG, G. Q.; DAVYDOVA, Z.; FRIED, S. K.; LEIBOWITZ, S. F. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript in the arcuate nucleus stimulates lipid metabolism to control body fat accrual on a high-fat diet. *Regulatory Peptides*, v. 117, n. 2, p. 89-99, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2003.08.005>

YI, C. X.; SUN, N.; ACKERMANS, M. T.; ALKEMADE, A.; FOPPEN, E.; SHI, J.; SERLIE, M. J.; BUIJS, R. M.; FLIERS, E.; KALSBECK, A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates glucose production via the hepatic sympathetic innervation in rats. *Diabetes*, v. 59, p. 1591-1600, 2010. <https://doi.org/10.2337/db09-1398>

ZHU, L.; BROWN, W. C.; CAI, Q.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; MCGUINNESS, O. P.; STAFFORD, J. M. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diabetes*, v. 62, n. 2, p. 424-434, 2013. <https://doi.org/10.2337/db11-1718>

ZHU, L.; MARTINEZ, M. N.; EMFINGER, C. H.; PALMISANO, B. T.; STAFFORD, J. M. Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 306, n. 10, p. E1188-E1197, 2014. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00579.2013>

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

Em machos:

- VIP e PACAP atuam no ARC induzindo hipofagia, redução da hiperfagia induzida pelo jejum, aumento das concentrações plasmáticas de glicose e ácidos graxos livres, associadas a menores concentrações de triglicerídeos, colesterol e lipídeos totais;
- Aumento do número de neurônios FRA-ir no ARC indicando que ele pode ser um sítio de ação importante para os efeitos do VIP e PACAP.

Em fêmeas:

- VIP e PACAP reduziram a ingestão alimentar em ratas OVX e OVX+E;
- VIP foi capaz de promover hiperglicemia nos animais OVX e OVX+E, mas PACAP promoveu hiperglicemia apenas em animais OVX;

Os resultados obtidos mostram o ARC como uma região satélite para a ação do VIP e PACAP, tanto para machos quanto para fêmeas, e os estrógenos têm participação direta na ação do PACAP e do VIP, além disso, vale ressaltar a hipótese de que possivelmente, o sistema da melanocortina, esteja associado às ações desempenhadas no controle de ingestão alimentar e metabolismo energético destes dois peptídeos.

ANEXO 1 Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL



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.

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 necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Waldiceu Ap. 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.

ANEXO 2 Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 12/2018

Londrina, 09 de Fevereiro de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "**Peptídeo intestinal vasoativo, galanina e polipeptídeo hipofisário ativador de adenilciclase na homeostase energética: papel dos estrógenos**" protocolo n° 21997.2017.34, sob a responsabilidade de **Cássia Thaís 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 n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 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 **09/02/2018**.

O objetivo do projeto é avaliar a influência dos estrógenos sobre efeitos da microinjeção intracerebroventricular (ICV) de peptídeo intestinal vasoativo, polipeptídeo hipofisário ativador de adenilciclase e galanina sobre parâmetros plasmáticos, ingestão alimentar e na ativação neuronal nos núcleos ARC, PVN, VMH e NTS. Grau de invasividade=3

Vigência do Projeto	1º semestre de 2018 a 2º semestre de 2020
Espécie/linhagem	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	480
Peso/Idade	200gr.
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue, 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
 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a). Cássia Thaís B. Vieira Zaia

Responsável pelo projeto

Departamento de Ciências Fisiológica/CCB

C/C para Biotério do CCB

C/C para a Chefia do Depto do CCB

C/C para a Direção de Centro/ CCB

APÊNDICE 1 Artigo Publicado

Martins, A. B.; Brownlow, M. L.; Araújo, B. B.; Garnica-Siqueira, M. C.; Zaia, D. A. M.; Leite, C. M.; Zaia, C. T. B. V.; Uchoa, E. T. Arcuate nucleus of the hypothalamus contributes to the hypophagic effect and plasma metabolic changes induced by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neurochemistry International*, v. 155, art.105300, p. 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105300>.

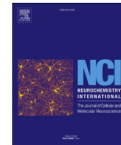
Neurochemistry International 155 (2022) 105300



Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

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



Arcuate nucleus of the hypothalamus contributes to the hypophagic effect and plasma metabolic changes induced by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

Andressa Buseti Martins^{a,1}, Milene Lara Brownlow^{b,1}, Bruno Blanco Araújo^{b,1}, Marcela Cristina Garnica-Siqueira^a, Dimas Augusto Morozin Zaia^c, Cristiane Mota Leite^d, Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia^{a,b,*}, Ernane Torres Uchoa^{a,b,**}

^a Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

^b Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

^d Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Glucose
Free fatty acids
Corticosterone
ARC neurons
Food intake

ABSTRACT

The arcuate nucleus of hypothalamus (ARC) integrates circulating factors that signal energy status. The vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) are widely distributed in the periphery and central nervous systems (CNS) and play important roles on energy balance. The present study aimed to investigate the responses of microinjection of VIP and PACAP in the ARC on metabolic changes and food intake. In addition, the activity of neurons in the ARC following intracerebroventricular (ICV) microinjection of these peptides was also evaluated. Microinjection of VIP or PACAP in the ARC decreased fasting-induced hyperphagia and food intake, decreased total lipids, and increased free fatty acids plasma concentrations. VIP microinjection in the ARC induced hyperglycemia and decreased total cholesterol level; and PACAP reduced triglycerides concentration. ICV microinjection of VIP and PACAP enhanced neuronal activation in the ARC, associated with lower fasting-induced hyperphagia and plasma metabolic changes (only VIP). These results suggest that VIP and PACAP play important roles in ARC, inducing hypophagia and peripheral metabolic changes, as hyperglycemia, increased free fatty acids and decreased total lipids plasma levels.

1. Introduction

The arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus participates in the control of food intake and body weight (Kohno and Yada, 2012; Bouret et al., 2004) and is responsive to hormones and nutrients such as insulin, leptin, and glucose (Cone et al., 2001). These signals lead to changes in the expression of neuropeptides associated with the regulation of food intake and lipid metabolism (Wortley et al., 2004; Cone et al., 2001; Hahn et al., 1998; Jhanwar-Uniyal et al., 1990).

Vasoactive intestinal peptide (VIP), a peptide with 28 amino acid residues, belongs to glucagon-secretin family (Said and Mutt, 1970;

Taylor and Pert, 1979). Although VIP was first isolated from the gastrointestinal system, it is widely distributed in the central nervous system (CNS), such as the cortex, hippocampus, amygdala, thalamus, and hypothalamus, mainly in suprachiasmatic nucleus (SCN) (Harding et al., 2020; Kingsbury and Wilson, 2016; Jones et al., 2018). VIP receptors, VPAC1, and VPAC2, are G-coupled protein receptors expressed in CNS areas associated with neuroendocrine functions (Hughes et al., 2011; Usdin et al., 1994), being these areas: ARC, SCN, supraoptic, and paraventricular (PVN) hypothalamic nuclei (Köves et al., 1991; Sims et al., 1980; De Souza et al., 1985). In addition, microinjection of VIP into PVN of rats stimulated the release of corticotrophin-releasing

* Corresponding author. 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.

** Corresponding author. 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: ctbvzaia@uel.br (C.T.B.V. Zaia), uchoa@uel.br (E.T. Uchoa).

¹ Authors (ABM, MLB, and BBA) contribute equally to this paper.

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105300>

Received 4 February 2021; Received in revised form 20 January 2022; Accepted 31 January 2022

Available online 10 February 2022

0197-0186/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.