

Ingestão alimentar e reprodução: efeitos da dieta sobre marcadores hipotalâmicos relacionados ao comportamento alimentar e sexual em camundongos.

Palavras-Chave: Restrição calórica, Ingestão alimentar, Obesidade, reprodução, hipotálamo, marcadores reprodutivos.

Autoras:

ANA LAURA DE OLIVEIRA CARVALHO [PROFIS- UNICAMP]; ARIANE MARIA ZANESCO [FCM-UNICAMP]

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso (orientador) [FCM- UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

A busca por acasalamento e a busca por nutrientes são dois comportamentos fisiológicos intimamente ligados ao sucesso evolutivo das espécies (Millar, 1977; Widdowson, 1981). Ambos são controlados por sinais homeostáticos dependentes da atividade de neurônios hipotalâmicos e são integrados do ponto de vista funcional (Dupont *et al.*, 2014; Scheneider, 2004).

A obesidade é uma doença pandêmica com diversas comorbidades associadas. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade triplicou desde 1975, sendo que, em 2016, 39% da população adulta estavam acima do peso e 13% era obesa. Ademais, diversos estudos recentes têm correlacionado o aumento no índice de gordura corporal com o aumento de distúrbios no eixo reprodutivo, tanto comportamental, quanto fisiológico (Mohammadi Roushadeh *et al.*, 2015; Ghanayem *et al.*, 2010; Kort *et al.*, 2006; Farias *et al.*, 2017). Embora um circuito completo envolvido no comportamento sexual ainda não seja totalmente compreendido, esses dados conotam que fatores que regulam metabolismo, sejam eles hormonais ou nutricionais possuem um impacto na regulação da reprodução.

De fato, acredita-se que a sinalização de estrogênio na linhagem POMC limita a ingestão de alimentos, ao inibir o receptor de estrogênio alpha ($ER\alpha$). A maioria dos neurônios Kiss1 no ARC também expressa $ER\alpha$ e regula a puberdade e a fertilidade em camundongos machos e fêmeas (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2007) assim como em humanos (Topaloglu *et al.*, 2012). Em ovelhas ovariectomizadas a expressão de Kiss1 foi aumentada, retornando aos níveis similares aos animais intactos com tratamento de estradiol. O tratamento com progesterona restaurou parcialmente a expressão de Kiss1 (Smith *et al.*, 2007).

O estado nutricional do organismo tem forte impacto sobre sua capacidade reprodutiva. A carência nutricional, por exemplo, pode comprometer os ciclos estrais das fêmeas e reduzir a espermatogênese nos machos (Schneider, 2004; Sermondade *et al.*, 2013).

Da mesma forma, estados de hipernutrição levando ao desenvolvimento da obesidade podem reduzir a fertilidade (Kort *et al.*, 2006; Fernandez, 2011; Shukla *et al.*, 2014; Pasquali *et al.*, 2007; Sermondade *et al.*, 2013). Em parte, este efeito se deve a alterações na regulação hipotalâmica de hormônios gonadotrópicos (Bellver *et al.*, 2010; Hyland *et al.*, 2018; Bertoldi *et al.*, 2011; Farkas *et al.*, 2013; Fontana, Della Torre, 2016). Por estes motivos alternativas que revertam o quadro da obesidade têm sido adotadas com maior frequência, muitas delas se baseiam na redução da ingestão alimentar, como a restrição calórica. Tal medida visa reverter o fenótipo obeso, bem como as alterações metabólicas associadas.

Objetivos

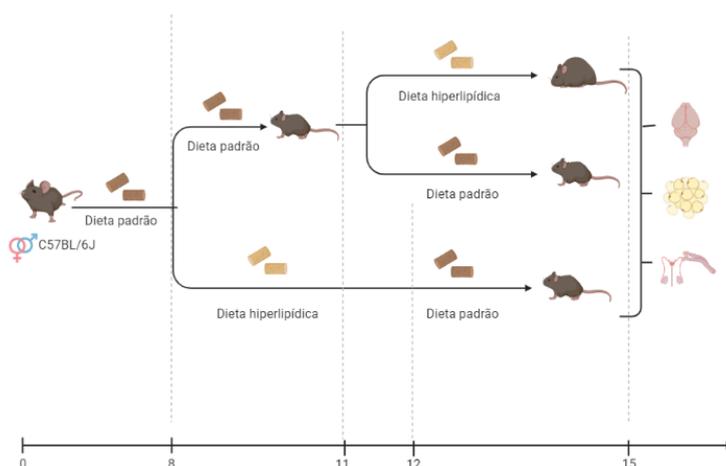
Analisar a relação dos efeitos deletérios promovidos pela dieta, com a variação de transcritos hipotalâmicos relacionados ao comportamento sexual, reprodutivo e controle da ingestão alimentar em camundongos.

METODOLOGIA:

Animais:

Foram utilizados camundongos C57BL/6J-Unib machos e fêmeas fornecidos pelo Centro de Experimentação Animal da UNICAMP (CEMIB) com seis semanas de vida. Os animais ficaram sob condições controladas, temperatura ambiente de 22 ± 2 °C e ciclos claro-escuro de 12/12 horas, a fim de mimetizar as condições naturais e manter o ciclo circadiano, e receberam água e dieta padrão para roedores *ad libitum*. Ao completarem 8 semanas, os camundongos foram divididos em: controle (CT), obesidade induzida por dieta (OID) e obesidade induzida por dieta seguida de restrição calórica (RC). Todos os protocolos terão a duração de seis semanas.

Os animais OID receberam, por 3 semanas, dieta padrão *ad libitum* e, em seguida, foi oferecido a alimentação hiperlipídica, composta por 45% de gordura; ao grupo RC, após a dieta rica em gordura, foi oferecido dieta padrão *ad libitum* durante 21 dias e o grupo CT continuará recebendo a dieta padrão durante todo o período experimental. Ao final, os animais serão anestesiados com



100mg/Kg de ketamina (Saúde *Fort Dodge Animal*, EUA) e 10mg/Kg de xilazina (*Lloyd Laboratories*, EUA) intraperitoneal, eutanasiados e os tecidos de interesse serão extraídos, pesados e analisados por PCR em tempo real. O uso dos animais de experimentação neste projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de **Figura 1: desenho experimental** Ética no Uso de Animais da Unicamp (CEUA), sob o protocolo (5805-1/2021).

Extração de RNA e PCR em tempo real:

A extração de RNA dos tecidos será realizada conforme a rotina usual do laboratório, utilizando o reagente Trizol (*Invitrogen Corporation*, CA, USA), e usaremos o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) para a síntese de cDNA. Os genes de interesse serão quantificados utilizando o sistema *TaqMan™* (*Applied Biosystem*) e o aparelho *7500 sequence detection system* (*Applied Biosystem*). Primers específicos para os genes: *Glp-1*, *Kiss-1*, *Pomc*, *Cart*, *Agrp*, *Npy*, *Gnrh*, *Il-6*, *Tgfβ*, *Tnfα* e *Nlrp3* serão utilizados e como controle endógeno utilizaremos *Gapdh Mouse* (*TaqMan™ – Applied Biosystems*)

Análises metabólicas:

Dados metabólicos de cada grupo serão obtidos a partir da pesagem semanal, bem como cálculo de ingestão calórica e medição da glicemia de jejum no início, na troca de dieta e no final do experimento. Para tal, todos os camundongos serão individualizados.

Análise estatística:

As análises estatísticas serão feitas através do teste "t" student e One-way ANOVA. Dessa forma, considerando a diferença entre os grupos e a variabilidade biológica entre eles, para um "n" significativo ($p < 0.005$) utilizaremos um N de 6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Após 4 semanas em seus respectivos protocolos, os animais RC, machos e fêmeas, não apresentaram ganho de massa corpórea significativa quando comparados aos demais grupos, alimentados com dieta padrão (gráfico 1). Entretanto, a glicemia de jejum do grupo RC, após a dieta rica em gordura, se mostrou significativamente maior, se comparado ao grupo controle (gráfico 2). Tal resultado pode ser causado pelo aumento da adiposidade, que será posteriormente analisada.

Ademais, ao comparar o peso dos animais e a glicemia de jejum basal, os machos apresentaram valores maiores do que as fêmeas que seguem o mesmo protocolo. Contudo, a glicemia de jejum das fêmeas RC após intervenção alimentar se equiparou aos seus

correspondentes machos. Esses dados acordam com os achados de Zore *et al* (2018) e Link e Reue (2017), que descrevem a genética por trás dessas diferenças.

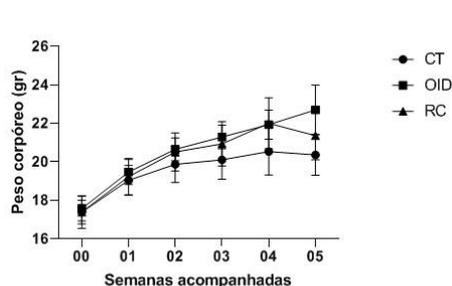


Gráfico 1- Peso corpóreo médio por semana/ Fêmeas

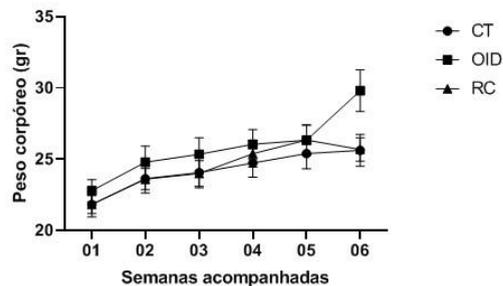


Gráfico 2- Peso corpóreo médio por semana/ Machos

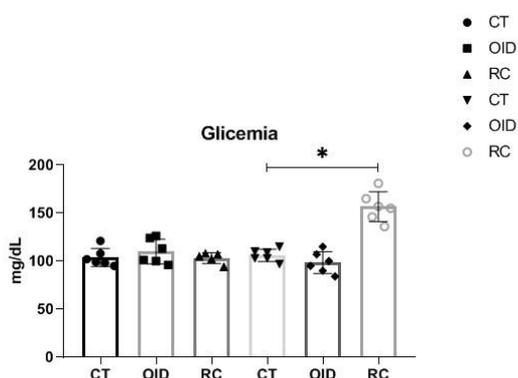


Gráfico 3- Glicemia de jejum/ Fêmeas

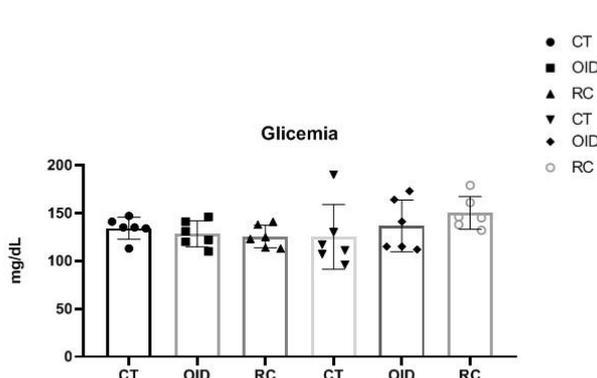


Gráfico 4- Glicemia de jejum/ Machos

BIBLIOGRAFIA

- Antzoulatos E, Magorien J, Wood R (2008). Cell proliferation and survival in the mating circuit of adult male hamsters: Effects of testosterone and sexual behavior. *Hormones and Behavior* 54(5):735–740.
- Bellver, J.; Ayllon, Y.; Ferrando, M.; Melo, M.; Goyri, E.; Pellicer, A.; Remohi, J.; Meseguer, M.(2010) Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil. Steril.*, 93, 447–454
- Bertoldi, M. L., Luque, E. M., Carlini, V. P., Vincenti, L. M., Stutz, G., Santillán, M. E., Ruiz, R. D., Fiol del Cueno, M., Martini, A. C. (2011). Inhibitory Effects of Ghrelin on Sexual Behavior: Role of the Peptide in the Receptivity Reduction Induced by Food Restriction in Mice. *Hormone and Metabolic Research*, 43(07), 494–499.
- Bless EP, Reddy T, Acharya KD, Beltz BS, Tetel MJ (2014). Oestradiol and Diet Modulate Energy Homeostasis and Hypothalamic Neurogenesis in the Adult Female Mouse. *Journal of Neuroendocrinology* 26(11):805–816.
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH (2007). Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci*. 104(25):10714-9.
- Farias LT, Sabóia RCB, Lima CHR.(2017) Obesidade e infertilidade: uma revisão sistemática da literatura. *Revista Interdisciplinar*. 10(3):141-149.

- Farkas I, Vastagh C, Sárvári M, Liposits Z (2013) Ghrelin Decreases Firing Activity of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons in an Estrous Cycle and Endocannabinoid Signaling Dependent Manner. *PLOS ONE* 8(10): e78178
- Fontana R, Della Torre S. (2016) The Deep Correlation between Energy Metabolism and Reproduction: A View on the Effects of Nutrition for Women Fertility. *Nutrients*. Feb 11;8(2):87.
- Fowler CD, Liu Y, Wang Z (2008). Estrogen and adult neurogenesis in the amygdala and hypothalamus. *Brain Res. Rev.* 57 (2):342–351.
- Ghanayem BI, Bei R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U (2010). Diet-Induced Obesity in Male Mice Is Associated with Reduced Fertility and Potentiation of Acrylamide-Induced Reproductive Toxicity. *Biology of Reproduction* ;82(1):96-104.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE (2005). Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J. Neurosci.* 25:11349–11356.
- Hyland, L., Rosenbaum, S., Edwards, A., Palacios, D., Graham, M. D., Pfaus, J. G., Woodside, B. Abizaid, A. (2018). Central ghrelin receptor stimulation modulates sex motivation in male rats in a site-dependent manner. *Hormones and Behavior*, 97, 56–66.
- Kort, H., Massey, B., Elsner, C., Mitchell-Leef, D., Shapiro, D., Witt, M. and Roudebush, W., (2006). Impact of Body Mass Index Values on Sperm Quantity and Quality. *Journal of Andrology*, 27(3), pp.450-452.
- Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG. (2013) The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism*. ;62(4):457-78.
- Millar JS (1977). Adaptive features of mammalian reproduction. *Evolution*. 31:370-386.
- Schneider, J.E.(2004) Energy balance and reproduction. *Physiology & Behavior*. 81, 289–317.
- Sermondade N., Faure C., Fezeu, L., Shayeb, AG, Bonde, JP, Jensen, TK, Van Wely M., Cao J., Martini AC, Eskandar M, Chavarro JE, Koloszar S, Twigt JM, Ramlau-Hansen CH, Borges E, Lotti, F., Steegers-Theunissen, R. P., Zorn, B., Polotsky, A. J., La Vignera, S., Eskenazi, B., Tremellen, K., Magnusdottir, E.V., Fejes, I., Hercberg, S., Lévy, R., Czernichow, S. (2013). BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Human reproduction update*, 19(3), 221–231.
- Mohammadi Roushandeh A, Salehi I & Mortazavi M (2015) Protective effects of restricted diet and antioxidants on testis tissue in rats fed with high-fat diet. *Iran Biomedical Journal* 19 96–101
- Smith JT, Clay CM, Caraty A, Clarke IJ (2007). KiSS-1 Messenger Ribonucleic Acid Expression in the Hypothalamus of the Ewe Is Regulated by Sex Steroids and Season. *Endocrinology*. 148(3):1150–1157.
- Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, et al. (2012). Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N. Engl. J. Med.* 366, 629–635.
- Widdowson EM (1981). The role of nutrition in mammalian reproduction. *Environmental factors in mammal reproduction*.