RENATO DUARTE ALVISI

Aspectos endócrinos e funcionais da expressão do
hormônio concentrador de melanina (MCH)
durante a lactação

São Paulo

2013

RENATO DUARTE ALVISI

Aspectos endócrinos e funcionais da expressão do
hormônio concentrador de melanina (MCH)
durante a lactação

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia Experimental e
Comparada da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio

De acordo: _____
Orientador

São Paulo
2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2853
FMVZ

Alvisi, Renato Duarte
Aspectos endócrinos e funcionais da expressão do hormônio concentrador de melanina (MCH) durante a lactação. / Renato Duarte Alvisi. -- 2013.
75 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Freitas Felício.

1. Sucção. 2. MCH. 3. Fos. 4. MPOA. 5. LHA. 6. IHy. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Aspectos endócrinos e funcionais da expressão do Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) durante a lactação", protocolado sob o nº 2185/2011, utilizando 92 (noventa e dois) ratos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Endocrine and functional aspects of Melanin-concentrating hormone (MCH) expression during lactation", protocol number 2185/2011, utilizing 92 (ninety-two) rats, under the responsibility Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 17 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALVISI, Renato Duarte

Título: Aspectos endócrinos e funcionais da expressão do hormônio concentrador de melanina (MCH) durante a lactação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria Aparecida Duarte pelo inestimável zelo e melhor definição da maternidade, agradeço por toda a força, amor, apoio e disposição, sendo muito sábia e singela ao me ensinar a melhor forma de se viver.

À minha irmã, Marília Duarte Alvisi pela parceria e ajuda nos momentos mais difíceis na execução do mestrado, pelo apoio incondicional frente a qualquer obstáculo.

À minha avó, Marlene Boleta Duarte pelo imenso suporte, dedicação e amor à minha mãe, minha irmã e a mim.

À minha namorada, Juliana Santos Barbosa por me auxiliar nos momentos que me afastei das metas, fazendo com que eu recobrasse a clareza dos pensamentos e jamais deixasse de seguir meus sonhos.

Ao meu avô, Wilson Santos Duarte (in memoriam) pela criação dos valores mais tenros e essenciais para a formação do meu caráter.

Dedico este projeto a todos os homens e mulheres que morreram pelo desenvolvimento científico da humanidade, e que pela grandiosidade de seus inventos e descobertas pagaram pela ignorância e arrogância de outros.

Por fim, dedico a todos os pesquisadores que “respiram” ciência e que conseguiram se manter em um sistema que valoriza o volume de artigos e rejeita a meritocracia, e mesmo assim não perderam o encanto pela pesquisa

e conhecem a real importância de seus estudos para a formação de novos pesquisadores e novos profissionais sem deixar de lado os valores humanos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio pelo apoio, dedicação e confiança, sendo que estes valores ultrapassaram o limite científico, e além de ter ganhado um orientador, conquistei um grande amigo.

Ao Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt pela dedicação em me fazer compreender os processos e procedimentos que envolvem a neurociência e a neuroanatomia, agradeço pela conversa amigável e pela forma louvável de conduzir suas pesquisas.

À Prof. Dra. Erica Zimmerknopf por ter confiado em mim durante a iniciação científica e ter passado sua confiança ao Prof. Dr. Luciano.

À Joelcimar M. da Silva pela dedicação em me ensinar cada procedimento e técnica abordada por este projeto.

À Me. Marianne O. Klein por ter acompanhado cada etapa deste projeto e ter me auxiliado por diversas vezes, sempre serei grato.

À Magali Caetano por acompanhar todos os passos e por me auxiliar durante esta caminhada.

À Dra. Aline de M. Cruz pelo apoio e prontidão ao resolver algum empecilho que aparecesse ao longo da execução do projeto, e pela similaridade na forma que vemos o mundo, me fez perceber meus defeitos e permitiu que eu confessasse-os a mim.

À Prof. Dra. Elizabeth Teodorov e juntamente com sua orientada de mestrado, Renata Ruggier por cada sorriso, cada gargalhada que fizeram os dias mais penosos passarem de maneira mais amena, sou grato pelas inúmeras e divertidas conversas.

À Luana Cezar, Jullie Hernandes, Lucas Pereira, Wesley Cruz e Carla Nappo pelos momentos de descontração no laboratório e durante as referatas.

À Me. Julieta Ochoa pela confiança em todas as minhas ações, agradeço por me reaproximar dos valores humanos.

Ao Giovanne Baroni, que me fez perceber e reafirmar a ideia de que a ciência ainda vive e pulsa em algumas pessoas, de maneira que se torna impossível dissociá-los.

À Me. Daniela S. Batagello pelos momentos de descontração, pelas divertidas conversas e pelo apoio no Laboratório de Neuroanatomia Química.

À Profa. Dra. Luciane Valéria Sita, ao Me. Helder C. da Costa e à Me. Renata J. da Silva pelo apoio à minha pesquisa e pelos momentos de descontração.

Às secretárias e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, especialmente aos funcionários do Biotério do Departamento de Patologia, sem o trabalho diário que exerceram não seria possível nem mesmo começar este projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fornecimento da bolsa de mestrado (2010/14469-2), fundamental para o desenvolvimento técnico e intelectual deste projeto.

*"Saber muito não lhe torna inteligente.
A inteligência se traduz na forma que
você recolhe, julga, maneja e, sobretudo,
onde e como aplica esta informação."*

Carl Sagan

RESUMO

ALVISI, R. D. **Aspectos endócrinos e funcionais da expressão do hormônio concentrador de melanina (MCH) durante a lactação.** [Endocrine and functional aspects of melanin-concentrating hormone (MCH) expression during lactation]. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) está associado ao controle da ingestão de alimentos, peso corporal e homeostase da energia. Além disso, a lactação é um modelo fisiológico importante para estudar a integração do hipotálamo com os sinais sensoriais periféricos, como a sucção e também aqueles relacionados ao balanço energético. Concentrações mais elevadas de mRNA de MCH têm sido encontrados durante a lactação na área preóptica medial (MPOA) e na parte anterior do núcleo paraventricular do hipotálamo, especialmente em torno do 19º dia de lactação, quando este hormônio revela o seu pico mais alto de expressão do mRNA. O significado fisiológico desse fenômeno não é muito bem compreendido. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi contribuir para a investigação dos fatores que influenciam os sistemas endócrinos e sensoriais na expressão da MCH e a sua relação com alterações neuroendócrinas e comportamentais que envolvem o final da lactação, o desmame e a perpetuação do ciclo reprodutivo. Ratas Wistar (n = 56), foram divididas em subgrupos de quatro animais, as quais foram sacrificadas do 15º ao 21º dia de lactação, com (CS) ou sem (SS) sucção. O MCH e a proteína Fos foram avaliados na área hipotalâmica lateral (LHA), MPOA e área incerto-hipotalâmica (IH_y). A MPOA mostrou uma relação inversa existente entre Fos e MCH. Além disso, observou-se um aumento da proteína Fos no grupo CS, o qual foi

menos intensa durante o 18º dia de lactação quando comparado com o 15º dia. Além disso, duplas marcações para MCH e Fos não foram encontradas. Nossos resultados sugerem que a sucção é capaz de influenciar o MCH ao redor do 19º dia de lactação na LHA. Portanto, as áreas que foram encontradas com marcações para Fos podem ser capazes de se comunicarem com as regiões que possuem neurônios produtores de MCH, ou os mecanismos de ativação da expressão de MCH não são repassados via Fos. Sendo assim, parece existir uma relação indireta entre as áreas de ativação neuronal e MCH durante a sucção.

Palavras-chave: Sucção. MCH. Fos. MPOA. LHA. IHy.

ABSTRACT

ALVISI, R. D. **Endocrine and functional aspects of melanin-concentrating hormone (MCH) expression during lactation.** [Aspectos endócrinos e funcionais da expressão do hormônio concentrador de melanina (MCH) durante a lactação]. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Melanin-Concentrating Hormone (MCH) has been largely implicated in the control of food intake, body weight and energy homeostasis. Moreover, lactation is an important physiological model to study hypothalamic integration to peripheral sensory signals, such as suckling stimulus and also those related to energy balance. Higher concentrations of MCH mRNA have been found during lactation in the medial preoptic area (MPOA) and in the anterior part of the paraventricular nucleus of hypothalamus, especially around the 19th day of lactation when this hormone reveals its highest peak of mRNA expression, and decrease after weaning. The physiological significance of this phenomenon is unclear. In this sense, the aim of the present study was to contribute to the investigation of sensory and endocrine factors influencing in the expression of MCH and its relationship to neuroendocrine and behavioural changes involving the end of lactation, weaning and perpetuating reproductive cycle. Wistar female rats (n= 56), divided in subgroups of four animals, were sacrificed every day from 15th to 21st day of lactation, with (CS) or without (SS) suckling stimulus. MCH and Fos immunoreactivity (MCH/Fos) was evaluated in the lateral hypothalamic area (LHA), MPOA and incerto-hypothalamic area (IH_y). The MPOA showed an inverse relationship between Fos and MCH. Also, we observed an

increase in the Fos of the group CS, which was less intense on 18th day when compared to 15th day, while MCH was increased. Besides, no colocalization between MCH and Fos was found. Our results suggest that suckling stimulus is able to influence the MCH around the 19th day of lactation in LHA. Therefore, the areas where we found Fos might have stimulated MCH-producing neurons. Hence, an indirect relationship between the areas of neuronal activation and MCH during suckling stimulus seems likely.

Keywords: Suckling stimulus. MCH. Fos. MPOA. LHA. IHy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - População dos neurônios envolvidos na regulação da leptina. Legenda: Organização das projeções que ligam os neurônios sensíveis à leptina no núcleo arqueado (ARH) com as populações efetoras no núcleo paraventricular (PVH) e na área hipotalâmica lateral (LHA), que se encontram numa posição para mediar respostas neuroendócrinas, autônomas e comportamentais.....	28
Figura 2 - Delineamento experimental	34
Figura 3 - Tela principal do software Stereo Investigator, MBF. Legenda: Marcações para MCH e Fos são vistas na MPOA como círculos amarelos ou triângulos verdes respectivamente	42
Figura 4 - Counting Frame. Legenda: Estruturas do tecido sobrepostas pelas linhas vermelhas não foram contadas. Fonte: Tutorial Stereo Investigator, MBF.....	43
Figura 5 - Organização das vibrissas dos coxins do focinho do rato.....	44
Figura 6 - Número de marcações para MCH na LHA. Legenda: Comparação entre fêmeas que receberam o estímulo de sucção (CS) e fêmeas que não receberam o estímulo de sucção (SS)	48
Figura 7 - Número de marcações para Fos no LHA. Legenda: Comparação entre fêmeas que receberam o estímulo de sucção (CS) e fêmeas que não receberam o estímulo da sucção (SS). No 19º dia de lactação, o grupo CS apresentou um pico na expressão de Fos, porém não gerou diferença	49
Figura 8 - Número de marcações para MCH na MPOA. Legenda: Comparação entre fêmeas que receberam o estímulo de sucção (CS) e fêmeas que não receberam o estímulo de sucção (SS)	51
Figura 9 - Número de marcações para Fos na MPOA. Legenda: Comparação entre fêmeas que receberam o estímulo de sucção (CS) e fêmeas que não receberam o estímulo de sucção (SS)	52
Figura 10 - Número de marcações para Fos na IHy	53

Figura 11 - Número de marcações para MCH na IHy	54
Figura 12 - Dupla marcação. Legenda: Núcleo escuro imunorreativo para Fos, e citoplasma marrom imunorreativo para MCH.....	56
Figura 13 - Área Preóptica Medial (MPOA). Legenda: Células imunorreativas para Fos no núcleo (seta vermelha) e células imunorreativas para MCH no citoplasma celular (seta azul).....	56
Figura 14 - Área Hipotalâmica Lateral (LHA). Legenda: Células imunorreativas para Fos no núcleo (seta vermelha) e células imunorreativas para MCH no citoplasma celular (seta azul)	57
Figura 15 - Área Incerto Hipotalâmica (IHy). Legenda: Células imunorreativas para MCH no citoplasma celular (seta azul)	57
Figura 16 - Neurônios marcados para Fos e MCH na região do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH). Legenda: LHA – Área Hipotalâmica Lateral; MPOA – Área Preóptica Medial; IHy – Área Incerto Hipotalâmica; CS – Com Sucção; e SS – Sem Sucção. n total= 56, n por grupo= 4. Cada animal utilizado foi avaliado nas três regiões estudadas. *p≤0,01.....	58
Figura 17 - Área Incerto Hipotalâmico (IHy). Legenda: Células imunorreativas para Fos no núcleo (seta vermelha) e células imunorreativas para MCH no citoplasma celular (seta azul)	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Indicadores gerados pela ANOVA com relação à comparação dos grupos com sucção (CS) e sem sucção (SC) no LHA para marcação do MCH.....	49
Tabela 2 - Indicadores gerados pela ANOVA com relação à comparação dos grupos com sucção (CS) e sem sucção (SC) no LHA para marcação de Fos	50
Tabela 3 - Indicadores gerados pela ANOVA com relação à comparação dos grupos com sucção (CS) e sem sucção (SC) na MPOA para marcação da MCH.....	51
Tabela 4 - Indicadores gerados pela ANOVA com relação à comparação dos grupos com sucção (CS) e sem sucção (SC) na MPOA para marcação da Fos.....	52
Tabela 5 - Indicadores gerados pela ANOVA com relação à comparação dos grupos com sucção (CS) e sem sucção (SC) na IHy para marcação da Fos.....	53
Tabela 6 - Indicadores gerados pela ANOVA com relação à comparação dos grupos com sucção (CS) e sem sucção (SC) no IHy para as marcações do MCH.....	54
Tabela 7 - Médias $\pm$ EPM de todos os grupos, divididos por regiões, marcação de MCH ou Fos e pelo tratamento utilizado, com sucção (CS) ou sem sucção (SS). Legenda: LHA – Área Hipotalâmica Lateral; MPOA – Área Preóptica Medial; IHy – Área Incerto Hipotalâmica; CS – Com Sucção; e SS – Sem Sucção. n total= 56, n por grupo= 4. Cada animal utilizado foi avaliado nas três regiões estudadas. *p $\leq$ 0,01	59

LISTA DE SIGLAS

3V – Terceiro Ventrículo
AcbSh – Núcleo Acumbens
ACTH – Hormônio Adrenocorticotrópico
AGRP – Peptídeo Relacionado à Proteína Agouti
ARC – Núcleo Arqueado
CART – Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina
CRF – Fator Liberador de Corticotrofina
CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina
CS – Grupo Experimental ‘Com Sucção’
DAB – Tetrahidrocloreto de 3-3'Diaminobenzidina
DMH - Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo
EPM – Erro Padrão da Media
Fos – Proteína de ativação neuronal imediata
GABA – Ácido Gama-Aminobutírico
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HF – Formação Hipocampal
IHy – Área Incerto Hipotalâmica
IL2 – Interleucina Tipo 2
IML – Coluna Celular Intermediolateral
JAK/STAT – Via de sinalização bioquímica
KPBS – Solução de Tampão Fosfato de Potássio
LH – Hormônio Luteinizante
LHA – Área Hipotalâmica Lateral
MCH – Hormônio Concentrador de Melanina
ME – Eminencia Mediana
ML – Porção Lateral do Núcleo Mamilar Médio
MPOA – Área Preóptica Medial
mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro
MS – Núcleo Septo-Medial
NAS – Níquel Amônio Sulfato
NEI – Neuropeptídeo Ácido Glutâmico-Isoleucina
NGE – Neuropeptídeo Glicina-Ácido Glutâmico NPY – Neuropeptídeo Y

OCT – Ocitocina

PAG – Matéria Cinzenta Periarquedutal

PC – Pro-hormônios Convertases

PC1 – Pro-hormônio Convertase Tipo 1

PC2 – Pro-hormônio Convertase Tipo 2

PF – Área Perifornical

PfCx – Córtex Pré-frontal

POMC – Pró-opiomelanocortina

ppMCH – Pré-Pro Hormônio Concentrador de Melanina

PSIA – Peptídeo de Sinalização Agouti

PVH – Hipotálamo Paraventricular

SC – Administração de Fármacos por via Subcutânea

SNC – Sistema Nervoso Central

SS – Grupo Experimental ‘Sem Sucção’

TRH – Hormônio Liberador de Tireotrofina

ZI – Zona Incerta

α-MSH – Alfa-Hormônio Estimulador de Melanócitos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	HORMÔNIO CONCENTRADOR DE MELANINA (MCH)	23
1.2	NEUROPEPTÍDEO ÁCIDO GLUTÂMICO-ISOLEUCINA (NEI)	24
1.3	NEUROPEPTÍDEO GLICINA-ÁCIDO GLUTÂMICO (NGE)	24
1.4	LEPTINA	25
1.5	NEUROPEPTÍDEO Y (NPY)	26
1.6	PEPTÍDEO RELACIONADO À PROTEÍNA AGOUTI (AgRP)	26
1.7	TRANSCRITO REGULADO PELA COCAÍNA E ANFETAMINA (CART)	26
1.8	ALFA-HORMÔNIO ESTIMULADOR DE MELANÓCITOS (α -MSH) E PRO-OPIOMELANOCORTINA (POMC)	27
1.9	MCH E SUAS INTERAÇÕES.....	27
2	OBJETIVO	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
3.2	ANIMAIS.....	35
3.2.1	Acasalamento.....	36
3.2.2	Nascimento e padronização da ninhada	37
3.3	PERFUSÃO.....	38
3.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA FOS E MCH	39
3.5	AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA DAS AMOSTRAS	41
3.6	BLOQUEIO DA SUCÇÃO	44
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4	RESULTADOS.....	48

5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 HORMÔNIO CONCENTRADOR DE MELANINA (MCH)

O hormônio concentrador de melanina (MCH) é um nonadecapeptídeo descoberto nos peixes da classe teleostei (RANCE; BAKER, 1979; KAWAUCHI et al., 1983) e posteriormente descrito nos mamíferos (NAHON et al., 1989; VAUGHAN et al., 1989). No encéfalo dos mamíferos é sintetizado principalmente nos corpos celulares da área hipotalâmica lateral (LHA), na área perifornical (PF) e em menor grau na área adjacente incerto-hipotalâmica (IH_y) (BITTENCOURT, et al., 1992; MORGANSTERN et al., 2010). As concentrações de mRNA de MCH têm sido encontrados durante a lactação na área preóptica medial (MPOA) e na parte anterior do núcleo paraventricular do hipotálamo, especialmente em torno do 19º dia de lactação, quando este hormônio revela o seu pico mais alto de expressão do mRNA, e logo após, começa a diminuir (RONDINI et al., 2010). As projeções dos neurônios hipotalâmicos que expressam MCH são amplas, alcançando a eminência mediana (ME), a formação hipocampal (HF), o córtex pré-frontal (PFCx), a matéria cinzenta periarquedutal (PAG), a porção lateral do núcleo mamilar médio (ML), o núcleo acumbens (AcbSh) e núcleo septo-medial (MS), sendo assim, pode-se considerar a LHA e IH_y centros integrativos, posicionados para influenciar uma ampla gama de sistemas e funções, e não apenas como moduladores diretos de funções efetoras e motoras (BITTENCOURT, 2011).

O MCH está envolvido na regulação do peso corporal (COOK; SHUM; PORTWOOD, 2010) agindo em receptores ligados a proteína G de maneira similar a outros peptídeos centrais e periféricos, tais como a orexina, a bombesina e a colecistocinina (QU et al., 1996; BEINFELD et al., 2001) e, além disto, estimula o comportamento sexual e a liberação do hormônio luteinizante (LH) quando administrado na área preóptica medial (MPOA) (GONZALEZ; BAKER; WILSON, 1997; GONZALEZ et al., 1997), além de modificar as concentrações de monoaminas na MPOA (GONZALEZ; BAKER; WILSON, 1997; GONZALEZ et al., 1997).

O MCH é proveniente de um hormônio pré-pró MCH (ppMCH) de 165 aminoácidos (NAHON et al., 1989; BITTENCOURT; CELIS, 2008), que também é

capaz de codificar para duas moléculas biologicamente ativas, o neuropeptídeo ácido glutâmico-isoleucina (NEI) e neuropeptídeo glicina-ácido glutâmico (NGE) (NAHON et al., 1989; BITTENCOURT et al., 1992).

1.2 NEUROPEPTÍDEO ÁCIDO GLUTÂMICO-ISOLEUCINA (NEI)

O NEI é expresso predominantemente na área hipotalâmica lateral (LHA) e pela área incerto hipotalâmica (IH_y) (anteriormente chamada de Zona Incerta rostromedial - ZI) (BITTENCOURT; ELIAS, 1998), e distribuído para todo o sistema nervoso central (SNC) (BITTENCOURT et al., 1992). Também é relatada a co-expressão e co-secreção entre o NEI e o MCH (PARKES; VALE, 1992; VIALE et al., 1999). O NEI pode gerar diferentes efeitos nos neurônios como o aumento do comportamento de limpeza e da atividade motora (SANCHEZ; BAKER; CELIS, 1997; SANCHEZ; CREMER; CELIS, 1999). Injeções de NEI modificam os níveis de noradrenalina e dopamina 35 e 60 minutos após a administração (SANCHEZ et al., 2001), enquanto efeitos antagonistas exibidos pelo NEI e MCH durante a indução de estresse liberaram ACTH nos ratos (BLUET-PAJOT et al., 1995). O comportamento de limpeza induzido pelo NEI é inibido quando este é simultâneo ao administrado com MCH (BITTENCOURT; CELIS, 2008). O NEI, assim como o MCH na MPOA pode induzir a secreção do hormônio luteinizante por diversos mecanismos (ATTADEMO et al., 2006).

1.3 NEUROPEPTÍDEO GLICINA-ÁCIDO GLUTÂMICO (NGE)

Poucas publicações relatam com precisão a atividade do NGE, portanto sabe-se que ele aumenta os neurofilamentos e a produção de sinaptofisina – uma glicoproteína de vesículas sinápticas - nos ratos com 18 dias de idade (KISTLER-HEER; SCHLUMPF; LICHTENSTEIGER, 1998) e também aumentam a produção de

AMPC nas células de melanoma (HINTERMANN et al., 2001), podendo estar associado ao comportamento exploratório, dificuldades para reconhecer novos objetos e à redução no aprendizado espacial (SCHMITT et al., 2009).

1.4 LEPTINA

Após a descoberta dos efeitos orexígenos do MCH (QU et al., 1996) tornou-se necessário compreender a ação de um hormônio dos adipócitos, a leptina, que entre diversas funções é responsável pelo estoque de lipídeos e balanço energético. A leptina é uma proteína composta por 167 aminoácidos, que possui uma estrutura semelhante às citocinas, do tipo interleucina 2 (IL-2), produzida principalmente no tecido adiposo (RESELAND et al., 2001).

A leptina se liga a receptores específicos no cérebro, informando saciedade, refletindo a quantidade existente de energia em forma de gordura no organismo. Por intermédio de receptores que fazem uso da via JAK/STAT de transdução do sinal intracelular, a leptina modifica a expressão e a atividade de inúmeros peptídeos hipotalâmicos que regulam o apetite e o gasto de energia (NEGRÃO; LICINIO, 2000).

A interação da leptina com seu receptor se dá no contexto dos neurônios produtores de neuropeptídeos e neurotransmissores que aumentam (orexígenos) ou diminuem (anorexígenos) a ingestão alimentar (NEGRÃO; LICINIO, 2000). A leptina age de maneira distinta em quatro peptídeos produzidos em neurônios do núcleo arqueado: o neuropeptídeo Y (NPY); o peptídeo relacionado à proteína agouti (AgRP); a pró-opiomelanocortina (POMC); e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). Acredita-se que o NPY e AgRP sejam orexígenos, enquanto POMC e CART anorexígenos (SCHWARTZ et al., 2000) (Figura 1).

1. 5 NEUROPEPTÍDEO Y (NPY)

O sistema núcleo arqueado – neuropeptídeo Y (NPY) é ativado por projeções do tronco cerebral estimuladas especificamente pela sucção e pela redução de leptina em resposta a drenagem metabólica decorrente da produção de leite. Os neurônios NPY do núcleo arqueado fazem contato direto com o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular (PVH), e também com neurônios do hipotálamo lateral que contêm orexina e MCH. Estes neurônios, por sua vez, estão em contato com neurônios secretores do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Assim, o sistema arqueado-NPY forma uma rede neuroanatômica que integra mudanças no consumo de alimentos e balanço de energia com o ciclo reprodutivo (GONZALEZ; VAZIRI; WILSON, 1996; SMITH; GROVE, 2002).

1.6 PEPTÍDEO RELACIONADO À PROTEÍNA AGOUTI (AgRP)

O peptídeo relacionado à proteína agouti (AgRP) é composto por 132 aminoácidos, identificado a partir do peptídeo de sinalização Agouti (PSIA), responsável pela cor da pelagem, e muito similar na sequência dos aminoácidos. Sendo co-expressa com o NPY, o AgRP tem ação orexígena, aumentando o apetite e diminuindo o metabolismo e gasto energético (OLLMANN et al., 1997; SHUTTER et al., 1997).

1.7 TRANSCRITO REGULADO PELA COCAÍNA E ANFETAMINA (CART)

O transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) é amplamente distribuído no cérebro de muitas espécies. No hipotálamo, os peptídeos CART possuem diversas funções, como o balanço energético, a resposta ao estresse e à temperatura, além de ações endócrinas (VALERA et al., 2006; CAVALCANTE et al., 2011). O CART é principalmente expresso no núcleo arqueado, no núcleo dorsomedial, no núcleo paraventricular (PVH), e na LHA (KOYLU et al., 1997). Os

neurônios que expressam o peptídeo CART co-expressam diferentes neuropeptídeos e neurotransmissores, tais como o POMC no núcleo arqueado, GABA (ácido gama-aminobutírico), o MCH na LHA, o TRH (hormônio liberador de tireotrofina) e a ocitocina no núcleo paraventricular do hipotálamo (BROBERGER, 1999; VRANG et al., 1999; ELIAS et al., 2001).

1.8 ALFA-HORMÔNIO ESTIMULADOR DE MELANÓCITOS (α -MSH) E PRO-OPIOMELANOCORTINA (POMC)

Por sua vez, torna-se necessário compreender o α -MSH (alfa-hormônio estimulador de melanócitos), um neuropeptídeo derivado do pro-opiomelanocortina (POMC), um pro-hormônio polipeptídico expressado pelo cérebro e tecidos periféricos (D'AGOSTINO; DIANO, 2010), que em conjunto com o NPY e a AgRP estão associados a regulação da leptina mediando respostas neuroendócrinas, autônomas e comportamentais (SAWCHENKO, 1998). O processamento do POMC está envolvido com diversos pro-hormônios convertases. No cérebro o POMC é expresso no núcleo arqueado do hipotálamo. A clivagem feita através da pro-hormônio convertase tipo 1 (PC1) gera a produção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e através da ação da pro-hormônio convertase tipo 2 (PC2) pequenos peptídeos são gerados como o α -MSH e a b-endorfina (BICKNELL, 2008). Muitas interações entre o MCH, NEI, NGE, e o α -MSH (e seus respectivos receptores) são descritas (HINTERMANN et al., 2001).

1.9 MCH E SUAS INTERAÇÕES

O mRNA para MCH apresenta-se elevado em camundongos obesos (QU et al., 1996), e quando este hormônio é administrado nos ventrículos cerebrais ou em núcleos específicos do hipotálamo que expressam o receptor MCH (MCHR1) induz hiperfagia e aumento de peso corporal (QU et al., 1996; ROSSI et al., 1997;

LUDWIG et al., 1998; SAHU, 2002; ABBOTT et al., 2003; GOMORI et al., 2003) comprovando a relação orexígena do MCH.

É possível que o MCH module os efeitos da leptina na redução do apetite e no gasto energético com implicações na maturação sexual e na fertilidade. De fato, o MCH parece agir na MPOA estimulando tanto a liberação de LH quanto promovendo o comportamento sexual. Sendo assim, o aumento da liberação de MCH na MPOA atuaria sobre a leptina promovendo a atividade reprodutiva (MURRAY et al., 2000; MURRAY et al., 2006; ELIAS et al., 2008).

A LHA apresenta grande quantidade de células que expressam MCH, e que parecem desempenhar um papel no equilíbrio energético. O tratamento com MCH aumenta o consumo alimentar e o mRNA do MCH tem sua expressão aumentada em camundongos com deficiência de leptina (HUANG et al., 1999 ; RONDINI et al., 2007; SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007; RONDINI et al., 2010).

Figura 1 – População dos neurônios envolvidos na regulação da leptina

Legenda: Organização das projeções que ligam os neurônios sensíveis à leptina no núcleo arqueado (ARH) com as populações efetoras no núcleo paraventricular (PVH) e na área hipotalâmica lateral (LHA), que se encontram numa posição para mediar respostas neuroendócrinas, autônomas e comportamentais.

A lactação é um modelo fisiológico importante no qual é possível estudar como o hipotálamo integra sinais periféricos sensoriais, como a sucção e aqueles relacionados ao equilíbrio energético, que alteraram a função hipotalâmica, regulando o equilíbrio entre consumo de alimentos, balanço energético e reprodução. A lactação consome muita energia e tem como características principais a alta demanda de água e comida, interrupção do ciclo estral e expressão do comportamento maternal.

Durante a lactação o mRNA para MCH está aumentado na MPOA e no núcleo paraventricular anterior do hipotálamo. Os neurônios MCH na MPOA de ratas funcionam através de complexos sistemas compostos por neuropeptídeos que controlam o equilíbrio energético dinâmico recebendo sinais de neurônios do núcleo arqueado que contém diversos peptídeos, entre eles o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) e o neuropeptídeo Y (NPY). A densidade de fibras contendo MCH imunorreativo aumenta ao longo da lactação e parece ser modificado pela alteração dos níveis de neuropeptídeos envolvidos no controle metabólico. Esses neurônios MCH poderiam, por sua vez, participar da supressão do ciclo reprodutivo e do comportamento sexual durante a lactação por meio de projeções para áreas de controle (KNOLLEMA et al., 1992; RONDINI et al., 2007; RONDINI et al., 2010).

Especificamente durante a lactação, especialmente ao redor do 19º dia, as concentrações de mRNA para MCH aumentam na MPOA apresentando o seu maior pico de expressão, e diminuem após o desmame (KNOLLEMA et al., 1992; RONDINI et al., 2010). O significado fisiológico desse fenômeno é pouco conhecido, porém torna-se necessária a exploração desse acontecimento, que pode estar associado com as atividades realizadas pelos neuropeptídeos que regulam o balanço energético. Nesse sentido, a investigação da influência de fatores sensoriais, como a sucção, e endócrinos na expressão do MCH deverá somar conhecimentos a essa intrincada sequência de eventos e interações endócrinas, neurofisiológicas e comportamentais que envolvem o final da lactação, o desmame e a reativação do repertório comportamental que culmina na perpetuação do ciclo reprodutivo e, conseqüentemente, em novos acasalamentos.

2 OBJETIVO

Avaliar o número de células imunorreativas ao MCH e Fos, assim como a possível colocalização entre ambos, na LHA, MPOA e na IHy, e além disso, avaliar as áreas que são imunorreativas a Fos e eventualmente relacionadas ao controle do comportamento maternal, tanto nos animais submetidos à sucção quanto nos animais que não passaram por este estímulo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Influência da sucção ou ausência da sucção na expressão do MCH e da Fos no LHA, MPOA e IHy

Ratas Wistar adultas (n = 56) foram acasaladas e no segundo dia após o parto tiveram suas ninhadas padronizadas em oito filhotes (4 fêmeas e 4 machos). Dois subgrupos (n= 28) foram formados, sendo um com animais que tiveram a sucção bloqueada pela anestesia das vibrissas dos filhotes e outro grupo que foi submetido normalmente à este estímulo. Em ambos os grupos, novos subgrupos foram formados onde as fêmeas foram perfundidas do 15° ao 21° dia de lactação. Após a perfusão foi realizada a imuno-histoquímica para MCH e Fos. As perfusões foram realizadas com um intervalo de 90 minutos após a sucção (Figura 2), permitindo assim a expressão da proteína Fos, para posterior análise estereológica no tecido.

O grupo no qual a sucção ocorreu normalmente foi nomeado como grupo 'com sucção' (CS) e o grupo no qual a sucção foi bloqueado por intermédio da anestesia tópica de lidocaína foi nomeado grupo 'sem sucção' (SS).

Dez minutos antes da fase de lactação iniciar, os filhotes pertencentes aos grupos experimentais que não fariam sucção nas mães foram anestesiados com Lidocaína, justamente para bloquear tal estímulo. Os filhotes pertencentes aos grupos onde a sucção seria permitida passaram pela mesma manipulação, mas não foram submetidos à administração tópica de lidocaína.

Figura 2 – Delineamento experimental

3.2 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar, virgens, com aproximadamente 90 dias de idade, obtidas no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno medindo, 30x40x18cm, em salas com sistema de ventilação ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz de 12h (06h00min – 18h00min). Água e ração foram oferecidas ad libitum durante todos os procedimentos experimentais.

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FMVZ/USP, para aprovação dos procedimentos utilizados (processo n° 2185/2011).

3.2.1 Acasalamento

No final do período claro do dia (18h00min), ratas que estavam no período de transição da fase proestro para estro, foram colocadas na gaiola de um macho sexualmente experiente para o acasalamento na proporção de duas fêmeas para um macho. Logo no início do período claro do dia seguinte foi realizada análise de citologia vaginal para confirmar a presença de espermatozoides, considerando este o dia 1 da prenhez. As ratas foram mantidas individualmente até o momento do parto.

3.2.2 Nascimento e padronização da ninhada

As ocorrências de nascimentos foram monitoradas diariamente até as 14h00min e após este horário foram consideradas como tendo ocorrido no dia seguinte (dia 0 de lactação). No dia 2, as ratas foram pesadas e foi realizada a contagem e sexagem dos filhotes. As ninhadas foram padronizadas para que permanecessem 4 machos e 4 fêmeas, pois como a sucção seria avaliada, o excesso de filhotes por mães poderia interferir na distribuição das glândulas mamárias e consequentemente na lactação.

3.3 PERFUSÃO

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de solução composta de xilazina 2% (5mg/Kg/SC) e quetamina 5% (30mg/Kg/SC). Em seguida, através de uma bomba peristáltica (Cole Parmer®) os animais foram perfundidos por via trans-aórtica inicialmente com 165 ml de uma solução salina 0,9% por cinco minutos, seguida de 825 ml de uma solução fixadora de formaldeído a 4% (obtida a partir de paraformaldeído aquecido a 60-65°C) e diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4) por 25 minutos. A bomba foi calibrada para bombear 33 ml/minuto.

Os encéfalos permaneceram na caixa craniana por 1 hora antes de serem removidos e transferidos para uma solução de pós-fixação (sacarose 20%) em tampão fosfato de potássio 0,02M, onde permaneceram por aproximadamente 12 horas.

A seguir, cortes frontais seriados, com 30µm de espessura foram obtidos utilizando-se um micrótomo de congelação (Leica®). Os cortes foram colhidos sequencialmente em cinco compartimentos de forma que a distância entre os cortes num mesmo compartimento fosse de 150µm, e acondicionados em solução anticongelante (20% de glicerol, 30% de etilenoglicol diluído em dietilpirocarbonato (DEPC) / salina tamponada com fosfato (PBS).

3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA FOS E MCH

Após o processo de perfusão os cortes encefálicos previamente tratados foram submetidos à imuno-histoquímica realizada em colaboração com o Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt no Laboratório de Neuroanatomia Química do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para detecção de Fos e MCH.

Para evitar a sobreposição das colorações nas marcações, a imuno-histoquímica para o MCH foi realizada após a realização da imuno-histoquímica para Fos.

Os neurônios são capazes de responder aos estímulos extracelulares através de certos genes de resposta imediata, sendo que a transcrição da proteína Fos a partir do gene c-Fos está entre as primeiras proteínas que aparecem (CÉSPEDES, 2007). Com isso o rápido acúmulo desta proteína combinado com métodos imuno-histoquímica pode oferecer a possibilidade de detecção de atividade celular (CHAUDHURI, 1997), e nas circunstâncias deste estudo, torna a proteína Fos um importante marcador de atividade neuronal (BULLITT, 1990).

Dessa forma, a Fos foi detectada através da imuno-histoquímica objetivando determinar as regiões que estariam sendo ativadas durante os procedimentos experimentais envolvendo a sucção, e em associação outra imuno-histoquímica foi realizada, desta vez para o MCH. Sendo assim, quando uma célula apresentasse imunorreatividade à Fos e simultaneamente imunorreatividade ao MCH poderia afirmar que aquela determinada célula estava produzindo o MCH durante os tratamentos utilizados, no caso a sucção ou ausência de sucção.

Após uma série de lavagens com tampão fosfato de potássio (KPBS) 0,02M e peróxido de hidrogênio os cortes foram incubados em uma solução de tampão fosfato de potássio (KPBS) 0,02M contendo Triton X-100 a 0,3%, soro normal de cabra a 2% (Jackson Laboratories®) e anticorpo primário anti-Fos obtido em coelho (Oncogene Research Products®) numa diluição de 1:70.000, sob agitação constante e temperatura ambiente durante 24 horas.

Para localização do complexo antígeno-anticorpo os cortes foram incubados por 1 hora no anticorpo secundário biotinizado feito em cabra (Biotinylated anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories®) na diluição 1:200.

O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado usando-se a técnica de imunoperoxidase com o complexo biotina-avidina (ABC Elite Kit, Vector Laboratories®) para ligar a peroxidase ao complexo antígeno-anticorpo, seguindo o protocolo de Itoh et al. (1979).

Após lavagens sucessivas, os cortes foram incubados em uma solução tampão de acetato de sódio, contendo NAS (Níquel Amônio Sulfato) a 5%, 50mg de tetrahydrocloreto de 3-3'diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio 30% por 10 minutos. Após a reação imuno-histoquímica, os cortes foram montados em lâminas recobertas com gelatina, desidratados e recobertos com DPX (Aldrich Chemical Co®).

Após a reação imuno-histoquímica, os cortes foram montados em lâminas recobertas com gelatina, desidratados e recobertos com DPX (Aldrich Chemical Co®).

3.5 AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA DAS AMOSTRAS

Os cortes histológicos que apresentavam as regiões de interesse (MPOA, LHA e IHy) foram selecionados e suas imagens foram enviadas para o software Stereo Investigator (MicroBrightField, MBF Bioscience, Inc, Colchester, VT, USA) permitindo a contagem dos neurônios marcados para Fos ou MCH.

Através de um padrão previamente estabelecido, o qual delimitava regiões de interesse levando em consideração um conjunto de estruturas que permitiram afirmar ser a região estudada, foi possível contornar e mostrar para o software tais regiões (Figura 3). Após o início da contagem o charriot motorizado do microscópio permitiu a correta sobreposição da grade virtual do programa, do quadro de contagem (counting frame) (Figura 4), dos contornos e da imagem do tecido, que foi enviada pela câmera de captura para o computador em tempo real, e permitiu que a contagem das marcações fosse realizada.

Com base na área e na massa do tecido nas regiões previamente delimitadas para a contagem, o software Stereo Investigator desenvolveu cálculos estatísticos internos que informaram ao final da contagem um determinado valor de erro de Scheaffer e Gundersen. Sendo assim, neste experimento não foram utilizados valores de erro nas contagem das marcações para MCH e Fos que ultrapassaram $P < 0,05$.

Foram contados apenas neurônios que apresentaram claramente marcações para MCH ou Fos. Neurônios que geraram dúvidas ou ficaram sobre as linhas vermelhas do quadro de contagem ou fora dos contornos previamente estabelecidos foram excluídos da contagem.

Figura 3 – Tela principal do software *Stereo Investigator*, MBF

Legenda: Marcações para MCH e Fos são vistas na MPOA como círculos amarelos ou triângulos verdes respectivamente

Figura 4 – *Counting Frame*

Legenda: Estruturas do tecido sobrepostas pelas linhas vermelhas não foram contadas.

Fonte: Tutorial *Stereo Investigator*, MBF.

3.6 BLOQUEIO DA SUCÇÃO

A sucção é uma ação complexa que envolve diversos fatores, sendo o estímulo sensorial tátil do filhote na procura pela glândula mamária da fêmea lactante um dos fatores mais importantes.

Esta busca pela glândula mamária é realizada através de vibrissas situadas nos coxins ao redor do focinho dos roedores. Os coxins do focinho dos roedores contêm um sistema sensorial e motor que é controlado através do nervo facial e do nervo trigêmeo. Cada coxim é uma estrutura complexa que contém 35 grandes vibrissas (bigode) que são usadas como sensores táteis (Figura 6). Os músculos dos coxins são responsáveis pela movimentação das vibrissas, e nos roedores compõem um grupo facial superficial, conhecido como musculatura orbitonasal (HAIDARLIU et al., 2010).

Figura 5 – Organização das vibrissas dos coxins do focinho do rato

Sendo assim, o bloqueio da sensibilidade das vibrissas através da anestesia local com a finalidade de obstruir a sucção revelou ser uma alternativa viável sendo relatado com sucesso tal procedimento por Lonstein (2005). De tal forma, o bloqueio bilateral da sensibilidade das vibrissas através da Lidocaína 5% (50mg/g, Via tópica,

pomada, AstraZeneca®) tornou possível o bloqueio da busca pela glândula mamária da fêmea e, conseqüentemente impossibilitou a sucção.

Os filhotes foram contidos fisicamente e a Lidocaína foi levemente aplicada sobre os coxins direito e esquerdo na região das vibrissas.

As mães dos filhotes que não apresentaram bloqueio total da busca pela glândula mamária e pertenciam ao grupo sem sucção foram excluídas do experimento.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a um teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) de medidas repetidas, seguido do teste de Bonferroni.

O nível de significância usado em todos os testes foi $p \leq 0,01$. A variação dos resultados observados foi apresentada nas tabelas na forma de média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism, GraphPad Software, La Jolla, California, USA.

4 RESULTADOS

A análise estatística dos dados obtidos através das contagens das marcações imunorreativas para MCH ou de *Fos* revelou diferença significativa ($F_{1,7} = 4,105$; $p \leq 0,01$) apenas no 19º de lactação na LHA quando comparado animais que passaram pela sucção (CS) e animais que não passaram por este estímulo (SS) (Figura 6 e Tabela 1).

Figura 6 – Número de marcações para MCH na LHA

Legenda: Comparação entre fêmeas que receberam o estímulo de sucção (CS) e fêmeas que não receberam o estímulo de sucção (SS).

As marcações imunorreativas para *Fos* no LHA (Figura 8) embora não tenha sido significativa apresentaram grande diferença na contagem quando comparada entre os grupos CS e SS, dentre os quais, o grupo CS apresentou os valores mais elevados (Tabela 2).

Tabela 1 - Indicadores gerados pela ANOVA com relação à comparação dos grupos com sucção (CS) e sem sucção (SS) no LHA para marcação do MCH

Dias	Diferença entre os grupos CS e SS	F	Valor de p	Significância
15	-15,50	0,2091	$p > 0,05$	ns
16	-25,75	0,3474	$p > 0,05$	ns
17	94,50	1,275	$p > 0,05$	ns
18	14,75	0,1990	$p > 0,05$	ns
19	-304,3	4,105	$p < 0,01$	**
20	-162,5	2,192	$p > 0,05$	ns
21	-54,50	0,7353	$p > 0,05$	ns

Figura 7 - Número de marcações para *Fos* no LHA

Legenda: Comparação entre fêmeas que receberam o estímulo de sucção (CS) e fêmeas que não receberam o estímulo da sucção (SS). No 19º dia de lactação, o grupo CS apresentou um pico na expressão de *Fos*, porém não gerou diferença significativa.

Tabela 2 - Indicadores gerados pela ANOVA com relação à comparação dos grupos com sucção (CS) e sem sucção (SC) no LHA para marcação de Fos

Dias	Diferença entre os grupos	F	Valor de p	Significância
15	-149,0	2,405	p > 0,05	ns
16	-137,0	2,211	p > 0,05	ns
17	-91,50	1,477	p > 0,05	ns
18	-23,25	0,3753	p > 0,05	ns
19	-177,8	2,869	p > 0,05	ns
20	-65,00	1,049	p > 0,05	ns
21	-88,50	1,428	p > 0,05	ns

Na MPOA a expressão do MCH (Figura 8) apresentou queda em ambos os grupos, CS e SS. Curiosamente, foi observado um pico na expressão do MCH no 18º dia de lactação no grupo CS, enquanto o grupo SS apresentou uma pequena queda no número de células a expressarem esse peptídeo (Tabela 3). A expressão da Fos na MPOA (Figura 10) apresentou queda no grupo CS no 18º dia de lactação enquanto o grupo SS permaneceu estável ao dia anterior (Tabela 5).

Figura 9 – Número de marcações para MCH na MPOA

Legenda: Comparação entre fêmeas que receberam o estímulo de sucção (CS) e fêmeas que não receberam o estímulo de sucção (SS).

Tabela 3 - Indicadores gerados pela ANOVA com relação à comparação dos grupos com sucção (CS) e sem sucção (SC) na MPOA para marcação da MCH

Dias	Diferença entre os grupos	F	Valor de p	Significância
15	3,000	0,1785	p > 0,05	ns
16	36,75	2,187	p > 0,05	ns
17	-12,75	0,7586	p > 0,05	ns
18	-45,50	2,707	p > 0,05	ns
19	-1,750	0,1041	p > 0,05	ns
20	12,50	0,7437	p > 0,05	ns
21	-3,250	0,1934	p > 0,05	ns

Figura 9 – Número de marcações para Fos na MPOA

Legenda: Comparação entre fêmeas que receberam o estímulo de sucção (CS) e fêmeas que não receberam o estímulo de sucção (SS).

Tabela 4 - Indicadores gerados pela ANOVA com relação à comparação dos grupos com sucção (CS) e sem sucção (SC) na MPOA para marcação da Fos

Dias	Diferença entre os grupos	F	Valor de p	Significância
15	-451,5	2,504	p > 0,05	ns
16	-317,8	1,762	p > 0,05	ns
17	-244,3	1,355	p > 0,05	ns
18	-46,75	0,2593	p > 0,05	ns
19	-303,0	1,681	p > 0,05	ns
20	-369,3	2,048	p > 0,05	ns
21	-413,0	2,291	p > 0,05	ns

Na IHy fêmeas que foram submetidas à sucção apresentaram queda na expressão da Fos no 18º dia de lactação (Figura 10), quando comparada ao grupo SS (Tabela 5). A expressão do MCH na IHy (Figura 11) apresentou um pico no 17º dia de lactação no grupo que estimulado com a sucção, enquanto o grupo SS apresentou queda no 19º dia de lactação (Tabela 6).

Figura 10 – Número de marcações para Fos na IHy

Tabela 5 - Indicadores gerados pela ANOVA com relação à comparação dos grupos com sucção (CS) e sem sucção (SC) na Z para marcação da Fos

Dias	Diferença entre os grupos	F	Valor de p	Significância
15	-66,00	0,8448	p > 0,05	ns
16	-181,8	2,326	p > 0,05	ns
17	-76,25	0,9760	p > 0,05	ns
18	-8,500	0,1088	p > 0,05	ns
19	-129,3	1,654	p > 0,05	ns
20	-151,8	1,942	p > 0,05	ns
21	-104,0	1,331	p > 0,05	ns

Figura 11 – Número de marcações para MCH na IHy

Tabela 6 - Indicadores gerados pela ANOVA com relação à comparação dos grupos com sucção (CS) e sem sucção (SC) no IHy para as marcações do MCH

Dias	Diferença entre os grupos	F	Valor de p	Significância
15	44,00	1,049	p > 0,05	ns
16	29,25	0,6971	p > 0,05	ns
17	-7,000	0,1668	p > 0,05	ns
18	81,50	1,942	p > 0,05	ns
19	-60,00	1,430	p > 0,05	ns
20	-40,00	0,9532	p > 0,05	ns
21	40,50	0,9652	p > 0,05	ns

Foram encontradas marcações para Fos nas mesmas regiões das marcações para MCH, no entanto duplas marcações ou colocalizações (Figura 12) foram raras, e em alguns grupos não foram encontradas impossibilitando a comparação. Neurônios marcados para MCH foram encontrados na área preóptica medial (MPOA; Figura 13), área hipotalâmica lateral (LHA; Figura 14), área incerto hipotalâmico (IH; Figura 15 e Figura 17), e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH; Figura 16).

Na tabela 7 são exibidas todas as média $\pm$ o erro padrão da média, seguido do n utilizado na amostra.

Figura 12 - Dupla marcação

Legenda: Núcleo escuro imunorreativo para Fos, e citoplasma marrom imunorreativo para MCH.

Figura 13 - Área Preóptica Medial (MPOA)

Legenda: Células imunorreativas para Fos no núcleo (seta vermelha) e células imunorreativas para MCH no citoplasma celular (seta azul).

Figura 14 – Área Hipotalâmica Lateral (LHA)

Legenda: Células imunorreativas para *Fos* no núcleo (seta vermelha) e células imunorreativas para MCH no citoplasma celular (seta azul).

Figura 15 – Área Incerto Hipotalâmica (IHy)

Legenda: Células imunorreativas para MCH no citoplasma celular (seta azul).

Figura 16 - Neurônios marcados para Fos e MCH na região do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH)

Legenda: Células imunorreativas para *Fos* no núcleo (seta vermelha) e células imunorreativas para MCH no citoplasma celular (seta azul).

Figura 17 – Área Incerto Hipotalâmico (IHy)

Legenda: Células imunorreativas para *Fos* no núcleo (seta vermelha) e células imunorreativas para MCH no citoplasma celular (seta azul).

Tabela 7 – Médias $\pm$ EPM de todos os grupos, divididos por regiões, marcação de MCH ou Fos e pelo tratamento utilizado, com sucção (CS) ou sem sucção (SS)

Dias	LHA				MPOA				IHy			
	MCH		Fos		MCH		Fos		MCH		Fos	
	CS	SS	CS	SS	CS	SS	CS	SS	CS	SS	CS	SS
15	604 $\pm$ 99 (n=4)	589 $\pm$ 41 (n=4)	211 $\pm$ 208 (n=4)	62 $\pm$ 98 (n=4)	73 $\pm$ 55 (n=4)	76 $\pm$ 43 (n=4)	726 $\pm$ 656 (n=4)	275 $\pm$ 261 (n=4)	229 $\pm$ 61 (n=4)	273 $\pm$ 34 (n=4)	179 $\pm$ 247 (n=4)	113 $\pm$ 135 (n=4)
16	523 $\pm$ 110 (n=4)	497 $\pm$ 150 (n=4)	217 $\pm$ 63 (n=4)	80 $\pm$ 130 (n=4)	57 $\pm$ 30 (n=4)	94 $\pm$ 14 (n=4)	652 $\pm$ 300 (n=4)	335 $\pm$ 175 (n=4)	202 $\pm$ 75 (n=4)	231 $\pm$ 64 (n=4)	273 $\pm$ 195 (n=4)	91 $\pm$ 71 (n=4)
17	454 $\pm$ 151 (n=4)	549 $\pm$ 78 (n=4)	126 $\pm$ 169 (n=4)	35 $\pm$ 11 (n=4)	53 $\pm$ 25 (n=4)	40 $\pm$ 23 (n=4)	482 $\pm$ 500 (n=4)	238 $\pm$ 221 (n=4)	278 $\pm$ 72 (n=4)	271 $\pm$ 52 (n=4)	148 $\pm$ 147 (n=4)	71 $\pm$ 45 (n=4)
18	572 $\pm$ 106 (n=4)	587 $\pm$ 81 (n=4)	69 $\pm$ 66 (n=4)	45 $\pm$ 45 (n=4)	73 $\pm$ 24 (n=4)	28 $\pm$ 29 (n=4)	297 $\pm$ 84 (n=4)	250 $\pm$ 93 (n=4)	195 $\pm$ 27 (n=4)	276 $\pm$ 46 (n=4)	104 $\pm$ 43 (n=4)	96 $\pm$ 54 (n=4)
19	664 $\pm$ 122 (n=4)	359 $\pm$ 179 (n=4)	194 $\pm$ 100 (n=4)	16 $\pm$ 24 (n=4)	37 $\pm$ 16 (n=4)	35 $\pm$ 28 (n=4)	533 $\pm$ 180 (n=4)	230 $\pm$ 104 (n=4)	211 $\pm$ 34 (n=4)	151 $\pm$ 60 (n=4)	193 $\pm$ 94 (n=4)	63 $\pm$ 87 (n=4)
20	657 $\pm$ 104 (n=4)	495 $\pm$ 76 (n=4)	80 $\pm$ 129 (n=4)	15 $\pm$ 15 (n=4)	23 $\pm$ 18 (n=4)	35 $\pm$ 33 (n=4)	532 $\pm$ 463 (n=4)	163 $\pm$ 109 (n=4)	257 $\pm$ 19 (n=4)	217 $\pm$ 43 (n=4)	199 $\pm$ 280 (n=4)	47 $\pm$ 35 (n=4)
21	618 $\pm$ 135 (n=4)	563 $\pm$ 51 (n=4)	96 $\pm$ 133 (n=4)	8 $\pm$ 3 (n=4)	19 $\pm$ 13 (n=4)	16 $\pm$ 16 (n=4)	572 $\pm$ 564 (n=4)	159 $\pm$ 144 (n=4)	239 $\pm$ 41 (n=4)	280 $\pm$ 35 (n=4)	151 $\pm$ 168 (n=4)	47 $\pm$ 44 (n=4)

Legenda: LHA – Área Hipotalâmica Lateral; MPOA – Área Preóptica Medial; IHy – Área Incerto Hipotalâmica; CS – Com Sucção; e SS – Sem Sucção. n total= 56, n por grupo= 4. Cada animal utilizado foi avaliado nas três regiões estudadas. *p $\leq$ 0,01.

5 DISCUSSÃO

O estudo da expressão do MCH e da Fos durante a lactação e sua relação com a sucção mostrou-se fortemente interligada à LHA, onde no 19º dia de lactação observamos um pico na expressão do MCH no grupo CS quando comparado ao grupo SS, de maneira que este foi o único momento e região no qual apresentaram valores estatisticamente significantes. Este resultado aparentemente corrobora com estudos anteriores de Knollema et al. (1992) e Rondini et al. (2010), que indicam um aumento na expressão de MCH no 19º, no entanto, este aumento é evidenciado na MPOA, região na qual não observamos diferenças relativas à expressão do MCH e da Fos neste mesmo dia. Na MPOA as contagens das marcações para Fos foram maiores quando comparados os grupos CS e SS.

Concomitantemente a esta expressão do MCH na LHA a Fos também aumentou sua expressão apontando um robusto, mas não estatisticamente significativo aumento no grupo CS comparado ao grupo SS também na LHA. No entanto, a expressão do MCH e Fos embora aumentem de maneira simultânea na LHA não foram colocalizados nos mesmos neurônios, e sendo assim a expressão da Fos indica uma atividade neuronal como descrito por (BULLITT, 1990), mas não indica uma específica expressão do MCH.

A LHA mostrou-se entre todas as regiões estudadas ser a que mais expressa MCH, confirmando os estudos anteriores de Bittencourt et al. (1992); Sawchenko (1998); Swanson (2004) e Goto et al. (2005) que afirmam que a LHA está associada com uma ampla gama de funções, que vão desde a informação sensorial, processamento de respostas somatomotoras, e a regulação de comportamentos motivacionais, além de ser definida como um local de síntese de peptídeos reguladores da ingestão alimentar e balanço energético (SCHWARTZ et al., 2000; MORTON et al., 2006; COLL; FAROOQI; O'RAHILLY, 2007) dentre os quais encontra-se o MCH. Sabendo que as adaptações fisiológicas durante a lactação são provenientes de pelo menos dois estímulos distintos: sucção e o gasto energético para a produção e secreção do leite (SMITH; GROVE, 2002), o estímulo sensorial provocado pela sucção ou pela ausência desta na LHA está associado diretamente com a expressão do MCH.

A segunda região que apresentou a maior expressão de MCH foi o IHy estando de acordo com estudos realizados por Sita; Elias; Bittencourt (2007) e Bittencourt (2011) embora não seja estatisticamente significativa a marcação, ambos os grupos CS e SS apresentaram valores semelhantes ao longo dos dias avaliados.

Ao analisar os dados obtidos percebe-se que na MPOA a expressão de Fos é superior a expressão de MCH e parece não haver relação direta entre as duas populações, por outro lado, na LHA a expressão de MCH supera a quantidade de Fos. Embora não tenha sido evidenciada colocalização nas regiões da MPOA e da LHA, pode-se sugerir que ocorra interações entre as regiões que expressam Fos, ou seja, regiões que tenham atividade neuronal, e regiões que expressam o MCH, podendo estar envolvidas apenas estas duas regiões ou além destas, outras que merecem novos estudos.

Outro aspecto que se acredita ocorrer de acordo com os resultados obtidos é a expressão do MCH ocorrendo por outra via, que não seja via proteína Fos, sendo este o motivo de não se encontrar colocalizações nos neurônios.

A expressão do MCH também pode estar associada a outros peptídeos além dos conhecidos, pois como já se sabe, a densidade de fibras contendo MCH imunorreativo aumenta ao longo da lactação e pode ser modificado pela alteração dos níveis de neuropeptídeos envolvidos no controle metabólico, sendo assim, esses neurônios MCH poderiam participar da supressão do ciclo reprodutivo e do comportamento sexual durante a lactação por meio de projeções para áreas de controle como descrito por Rondini et al. (2007); Rondini et al. (2010) e Knollema et al. (1992), e fortalecendo esta hipótese foi verificado neste estudo uma quantidade maior de células que expressam MCH durante a sucção no 19º dia de lactação quando comparado com fêmeas privadas da sucção.

De tal maneira, dentre os neuropeptídeos que podem estar envolvidos com a expressão do MCH durante a sucção destaca-se a orexina, intimamente relacionada ao balanço energético e à regulação do consumo alimentar, além de diversas outras ações como o ciclo vigília-sono, resposta ao estresse, recompensa-vício, e analgesia (KUKKONEN, 2013) e principalmente associada ao comportamento motivados concentrados na LHA (BITTENCOURT, 2011).

Por integrar diversos fatores sensoriais, e por estar associada a LHA, a sucção parece interferir na expressão do MCH de maneira indireta, ativando regiões que se comunicam por via Fos ou através de outra proteína de ativação neuronal

sendo capaz de promover a liberação deste hormônio. Em associação à estes fatores, o balanço energético e o controle da ingestão alimentar também estão envolvidos. É possível que a sucção seja capaz de alterar a expressão do MCH no LHA pela ativação de neuropeptídeos produzidos nas regiões periféricas onde aparecem as marcações para Fos. Esses peptídeos poderiam sinalizar para as células MCH, permitindo assim a expressão do MCH, confirmando assim a hipótese de não haver uma correlação direta entre a expressão da Fos e do MCH na MPOA, fato esse, comprovado pela ausência de células com dupla marcação nesta região.

Por fim, a avaliação do número de células imunorreativas ao MCH e à Fos, assim como a ausência de colocalização entre ambos, na LHA, MPOA e na IHy juntamente com a localização de regiões imunorreativas à Fos durante a sucção, regiões estas que são eventualmente relacionadas ao controle do comportamento maternal, balanço energético, controle da ingestão alimentar especialmente durante o final da lactação, demonstram e confirmam a importância do estudo do MCH para melhor compreender o funcionamento dos eixos orexígenos e a sua contribuição para a manutenção da homeostase da mãe e da prole.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Devido à diferença estatisticamente significativa para células imunorreativas ao MCH entre os grupos CS e SS na LHA, onde o grupo CS apresentou valores superiores ao grupo SS no 19º dia de lactação, tais valores foram acompanhados pela quantidade de células imunorreativas à Fos, e em associação a estas informações o fato da colocalização ou dupla marcação de Fos e MCH ter sido raramente encontrada ou nula na LHA, MPOA e IHy, conclui-se que: A sucção é capaz de modular a expressão do MCH na LHA no 19º dia de lactação.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, C. R.; KENNEDY, A. R.; WREN, A. M.; ROSSI, M.; MURPHY, K. G.; SEAL, L. J.; TODD, J. F.; GHATEI, M. A.; SMALL, C. J.; BLOOM, S. R. Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. **Journal of Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3943-3949, 2003.
- ATTADEMO, A. M.; RONDINI, T. A. R.; RODRIGUES, B. C.; BITTENCOURT, J. C.; CELIS, M. E.; ELIAS, C. F. Neuropeptide glutamic acid-isoleucine may induce luteinizing hormone secretion via multiple pathways. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 83, n. 5-6, p. 313-324, 2006.
- BEINFELD, M. C.; BITTENCOURT, J. C.; BRIDGES, R. S.; FARIS, P. L.; LUCION, A. B.; NASELLO, A. G.; WELLER, A.; FELICIO, L. F. The brain decade in debate: VIII. Peptide hormones and behavior: cholecystokinin and prolactin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 11, p. 1369-1377, 2001.
- BICKNELL, A. B. The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 692-699, 2008.
- BITTENCOURT, J. C. Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. **General and Comparative Endocrinology**, v. 172, n. 2, p. 185-197, 2011.
- BITTENCOURT, J.; CELIS, M. E. Anatomy, function and regulation of neuropeptide EI (NEI). **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1441-1450, 2008.
- BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI projections from the lateral hypothalamic area and zona incerta to the medial septal nucleus and spinal cord: a study using multiple neuronal tracers. **Brain Research**, v. 805, n. 1-2, p. 1-19, 1998.
- BITTENCOURT, J. C.; PRESSE, F.; ARIAS, C.; PETO, C.; VAUGHAN, J.; NAHON, J. L.; VALE, W.; SAWCHENKO, P. E. The melanin-concentrating hormone system of

the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. **Journal of Comparative Neurology**, v. 319, n. 2, p. 218-245, 1992.

BLUET-PAJOT, M. T.; PRESSE, F.; VOKO, Z.; HOEGER, C.; MOUNIER, F.; EPELBAUM, J.; NAHON, J. L. Neuropeptide-E-I antagonizes the action of melanin-concentrating hormone on stress-induced release of adrenocorticotropin in the rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 7, n. 4, p. 297-303, 1995. 70

BROBERGER, C. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. **Brain Research**, v. 848, n. 1-2, p. 101-113, 1999.

BULLITT, E. Expression of C-Fos-Like Protein as a Marker for Neuronal-Activity Following Noxious-Stimulation in the Rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 296, n. 4, p. 517-530, 1990.

CAVALCANTE, J. C.; CANDIDO, P. L.; SITA, L. V.; DO NASCIMENTO, E. S.; CAVALCANTE J. DE, S.; DE OLIVEIRA COSTA, M. S.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Comparative distribution of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the hypothalamus of the capuchin monkey (*Cebus apella*) and the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Brain Research**, v. 1425, n., p. 47-61, 2011.

CÉSPEDES, I. C. **Presença da proteína Fos em regiões do sistema nervoso central de roedores submetidos ou não ao alprazolam após choque e restrição**. 2007. 93 f. (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo,

CHAUDHURI, A. Neural activity mapping with inducible transcription factors. **Neuroreport**, v. 10, n. 8(16), p. v-ix, 1997.

COLL, A. P.; FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. The hormonal control of food intake. **Cell**, v. 129, n. 2, p. 251-262, 2007.

COOK, L. B.; SHUM, L.; PORTWOOD, S. Melanin-concentrating hormone facilitates migration of preadipocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 320, n. 1-2, p. 45-50, 2010.

D'AGOSTINO, G.; DIANO, S. Alpha-melanocyte stimulating hormone: production and degradation. **Journal of Molecular Medicine**, v. 88, n. 12, p. 1195-1201, 2010.

ELIAS, C. F.; LEE, C. E.; KELLY, J. F.; AHIMA, R. S.; KUCHAR, M.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 432, n. 1, p. 1-19, 2001.

ELIAS, C. F.; SITA, L. V.; ZAMBON, B. K.; OLIVEIRA, E. R.; VASCONCELOS, L. A.; BITTENCOURT, J. C. Melanin-concentrating hormone projections to areas involved in somatomotor responses. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 35, n. 2, p. 188-201, 2008. 71

GOMORI, A.; ISHIHARA, A.; ITO, M.; MASHIKO, S.; MATSUSHITA, H.; YUMOTO, M.; TANAKA, T.; TOKITA, S.; MORIYA, M.; IWAASA, H.; KANATANI, A. Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice melaninconcentrating hormone. **Endocrinology and Metabolism: American Journal of Physiology**, v. 284, n., p. E583-E588, 2003.

GONZALEZ, M. I.; BAKER, B. I.; WILSON, C. A. Stimulatory effect of melanin-concentrating hormone on luteinising hormone release. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 66, n. 4, p. 254-262, 1997.

GONZALEZ, M. I.; KALIA, V.; HOLE, D. R.; WILSON, C. A. alpha-Melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) and melanin-concentrating hormone (MCH) modify monoaminergic levels in the preoptic area of the rat. **Peptides**, v. 18, n. 3, p. 387-392, 1997.

GONZALEZ, M. I.; VAZIRI, S.; WILSON, C. A. Behavioral effects of alpha-MSH and MCH after central administration in the female rat. **Peptides**, v. 17, n. 1, p. 171-177, 1996.

GOTO, M.; CANTERAS, N. S.; BURNS, G.; SWANSON, L. W. Projections from the subfornical region of the lateral hypothalamic area. **Journal of Comparative Neurology**, v. 493, n. 3, p. 412-438, 2005.

HAIDARLIU, S.; SIMONY, E.; GOLOMB, D.; AHISSAR, E. Muscle architecture in the mystacial pad of the rat. **The Anatomical Record (Hoboken)**, v. 293, n. 7, p. 1192-1206, 2010.

HINTERMANN, E.; TANNER, H.; TALKE-MESSERER, C.; SCHLUMBERGER, S.; ZUMSTEG, U.; EBERLE, A. N. Interaction of melanin-concentrating hormone (MCH), neuropeptide E-I (NEI), neuropeptide G-E (NGE), and alpha-MSH with melanocortin and MCH receptors on mouse B16 melanoma cells. **Journal of Receptors and Signal Transduction Research**, v. 21, n. 1, p. 93-116, 2001.

HUANG, Q.; VIALE, A.; PICARD, F.; NAHON, J.; RICHARD, D. Effects of leptin on melanin-concentrating hormone expression in the brain of lean and obese lep(ob)/lep(ob) mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 69, n. 3, p. 145-153, 1999.

ITO, Y.; KIN, K.; KASAHARA, T.; SAKURABAYASHI, I.; KAWAI, T.; SHIORI-NAKANO, K.; TAKAGI, K. Synthesis and secretion of alpha 1-microglobulin by human lymphocytes. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 37, n. 1, p. 134-139, 1979.

KAWAUCHI, H.; KAWAZOE, I.; TSUBOKAWA, M.; KISHIDA, M.; BAKER, B. I. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. **Nature**, v. 305, n. 5932, p. 321-323, 1983.

KISTLER-HEER, V.; SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W. Melanocortin and MCH precursor-derived NEI effects on striatum-midbrain co-cultures. **Peptides**, v. 19, n. 8, p. 1317-1327, 1998.

KNOLLEMA, S.; BROWN, E. R.; VALE, W.; SAWCHENKO, P. E. Novel hypothalamic and preoptic sites of prepro-melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic Acid and Peptide expression in lactating rats. **Journal of**

Neuroendocrinology, v. 4, n. 6, p. 709-717, 1992.

KOYLU, E. O.; COUCEYRO, P. R.; LAMBERT, P. D.; LING, N. C.; DESOUZA, E. B.; KUHAR, M. J. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 9, n. 11, p. 823-833, 1997.

KUKKONEN, J. P. Physiology of the orexinergic/hypocretinergic system: a revisit in 2012. **Cell Physiology: American Journal of Physiology**, v. 304, n. 1, p. C2-32, 2013.

LONSTEIN, J. S. Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. **Hormones and Behavior**, v. 47, n. 3, p. 241-255, 2005.

LUDWIG, D. S.; MOUNTJOY, K. G.; TATRO, J. B.; GILLETTE, J. A.; FREDERICH, R. C.; FLIER, J. S.; MARATOS-FLIER, E. Melanin-concentrating hormone: a functional melanocortin antagonist in the hypothalamus. **American Journal of Physiology**, v. 274, n. 4 Pt 1, p. E627-633, 1998.

MORGANSTERN, I.; CHANG, G. Q.; CHEN, Y. W.; BARSON, J. R.; ZHIYU, Y.; HOEBEL, B. G.; LEIBOWITZ, S. F. Role of melanin-concentrating hormone in the control of ethanol consumption: Region-specific effects revealed by expression and injection studies. **Physiology & Behavior**, v. 101, n. 4, p. 428-437, 2010.

MORTON, G. J.; CUMMINGS, D. E.; BASKIN, D. G.; BARSH, G. S.; SCHWARTZ, M. W. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289-295, 2006.

MURRAY, J. F.; MERCER, J. G.; ADAN, R. A.; DATTA, J. J.; ALDAIRY, C.; MOAR, K. M.; BAKER, B. I.; STOCK, M. J.; WILSON, C. A. The effect of leptin on luteinizing hormone release is exerted in the zona incerta and mediated by melanin-concentrating hormone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, n. 11, p. 1133-1139, 2000.

MURRAY, J. F.; HAHN, J. D.; KENNEDY, A. R.; SMALL, C. J.; BLOOM, S. R.; HASSELL-LUEVANO, C.; COEN, C. W.; WILSON, C. A. Evidence for a stimulatory action of melanin-concentrating hormone on luteinising hormone release involving MCH1 and melanocortin-5 receptors. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, n. 3, p. 157-167, 2006.

NAHON, J. L.; PRESSE, F.; BITTENCOURT, J. C.; SAWCHENKO, P. E.; VALE, W. The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus. **Journal of Endocrinology**, v. 125, n. 4, p. 2056-2065, 1989.

NEGRÃO, A. B.; LICINIO, J. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 3, p. 205-214, 2000.

OLLMANN, M. M.; WILSON, B. D.; YANG, Y. K.; KERNS, J. A.; CHEN, Y.; GANTZ, I.; BARSH, G. S. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 135-138, 1997.

PARKES, D.; VALE, W. Secretion of melanin-concentrating hormone and neuropeptide-EI from cultured rat hypothalamic cells. **Journal of Endocrinology**, v. 131, n. 4, p. 1826-1831, 1992.

QU, D.; LUDWIG, D. S.; GAMMELTOFT, S.; PIPER, M.; PELLEYMOUNTER, M. A.; CULLEN, M. J.; MATHES, W. F.; PRZYPEK, R.; KANAREK, R.; MARATOS-FLIER, E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. **Nature**, v. 380, n. 6571, p. 243-247, 1996.

RANCE, T.; BAKER, B. I. The teleost melanin-concentrating hormone -- a pituitary hormone of hypothalamic origin. **General and Comparative Endocrinology**, v. 37, n. 1, p. 64-73, 1979.

RESELAND, J. E.; ANDERSSSEN, S. A.; SOLVOLL, K.; HJERMANN, I.; URDAL, P.; HOLME, I.; DREVON, C. A. Effect of long-term changes in diet and exercise on

plasma leptin concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 240-245, 2001.

RONDINI, T. A.; DONATO, J. JR.; RODRIGUES, B. DE C.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Chemical identity and connections of medial preoptic area neurons expressing melanin-concentrating hormone during lactation. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 39, n. 1, p. 51-62, 2010.

RONDINI, T. A.; RODRIGUES, B. DE C.; DE OLIVEIRA, A. P.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Melanin-concentrating hormone is expressed in the laterodorsal tegmental nucleus only in female rats. **Brain Research Bulletin**, v. 74, n. 1, p. 21-28, 2007.

ROSSI, M.; CHOI, S. J.; O'SHEA, D.; MIYOSHI, T.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding but chronic administration has no effect on body weight. **Journal of Endocrinology**, v. 138, n., p. 351-355, 1997.

SAHU, A. Interactions of neuropeptide Y hypocretin-I (orexin A) and melaninconcentrating hormone on feeding in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 944, n., p. 232-238, 2002.

SANCHEZ, M.; BAKER, B. I.; CELIS, M. Melanin-concentrating hormone (MCH) antagonizes the effects of alpha-MSH and neuropeptide E-I on grooming and locomotor activities in the rat. **Peptides**, v. 18, n. 3, p. 393-396, 1997.

SANCHEZ, M. S.; CREMER, M. C.; CELIS, M. E. Effects and interactions between alpha-MSH and MCH/NEI upon striatal cAMP levels. **Peptides**, v. 20, n. 5, p. 611-614, 1999.

SANCHEZ, M. S.; SALVATIERRA, N. A.; VETTORI, G.; CELIS, M. E. Effect of neuropeptide-EI on the binding of [3H]SCH 23390 to the dopamine D1 receptor in rat striatal membranes. **Neurochemical Research**, v. 26, n. 5, p. 533-537, 2001.

SAWCHENKO, P. E. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. **Journal of Comparative Neurology**, v. 402, n. 4, p. 435-441, 1998.

SCHMITT, U.; TANIMOTO, N.; SEELIGER, M.; SCHAEFFEL, F.; LEUBE, R. E. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. **Neuroscience**, v. 162, n. 2, p. 234-243, 2009.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D., JR.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-671, 2000.

SHUTTER, J. R.; GRAHAM, M.; KINSEY, A. C.; SCULLY, S.; LUTHY, R.; STARK, K. L. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. **Genes & Development**, v. 11, n. 5, p. 593-602, 1997.

SITA, L. V.; ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system. **Neuroscience**, v. 21, n. 148, p. 949-969, 2007.

SMITH, M. S.; GROVE, K. L. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 23, n. 1, p. 225-256, 2002.

SWANSON, L. W. **Brain maps: structure of the rat brain**. San Diego: Academic Press, 2004

VALERA, A. G.; CAVALCANTE, J. C.; ELIAS, C. F.; FELICIO, L. F. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript is overexpressed in the anteroventral periventricular nucleus of pregnant rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, n. 9, p. 711-714, 2006.

VAUGHAN, J. M.; FISCHER, W. H.; HOEGER, C.; RIVIER, J.; VALE, W.

Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. **Journal of Endocrinology**, v. 125, n. 3, p. 1660-1665, 1989.

VIALE, A.; ORTOLA, C.; HERVIEU, G.; FURUTA, M.; BARBERO, P.; STEINER, D. F.; SEIDAH, N. G.; NAHON, J. L. Cellular localization and role of prohormone convertases in the processing of pro-melanin concentrating hormone in mammals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 10, p. 6536-6545, 1999.

VRANG, N.; TANG-CHRISTENSEN, M.; LARSEN, P. J.; KRISTENSEN, P. Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. **Brain Research**, v. 818, n. 2, p. 499-509, 1999.