Renata Juliana da Silva

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO INTENSO E DA
RESTRIÇÃO ALIMENTAR SOBRE A AÇÃO DA LEPTINA
MEDIADA PELO HORMÔNIO CONCENTRADOR DE
MELANINA NO EIXO REPRODUTOR DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo
2011**

Renata Juliana da Silva

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO INTENSO E DA
RESTRIÇÃO ALIMENTAR SOBRE A AÇÃO DA LEPTINA
MEDIADA PELO HORMÔNIO CONCENTRADOR DE
MELANINA NO EIXO REPRODUTOR DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt

Versão original

**São Paulo
2011**

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

© reprodução total

Silva, Renata Juliana da.

Efeitos do treinamento físico intenso e da restrição alimentar sobre a ação da leptina mediada pelo hormônio concentrador de melanina no eixo reprodutor de ratas / Renata Juliana da Silva. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Jackson Cioni Bittencourt.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Análise morfológica, neuroquímica e funcional dos sistemas neurais envolvidos na organização dos comportamentos motivados.

Versão do título para o inglês: Effects of intense physical training and food restriction on the action of leptin mediated by melanin concentrating hormone in the reproductive axis in female rats.

Descritores: 1. Exercício físico 2. Desnutrição 3. Hormônio concentrador de melanina 4. Leptina 5. Ciclo estral animal 6. Neuroendocrinologia I. Bittencourt, Jackson Cioni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0144/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renata Juliana da Silva.

Título da Dissertação: Efeitos do treinamento físico intenso e da restrição alimentar sobre a ação da leptina mediada pelo hormônio concentrador de melanina no eixo reprodutor de ratas.

Orientador(a): Jackson Cioni Bittencourt.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **105** nas fls. **61** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Jockson Cioni Bittencourt, Coordenador(a) da Linha de pesquisa ***"Efeitos do treinamento físico intenso e da restrição alimentar sobre a ação da leptina mediada pelo hormônio concentrador de melanina no eixo reprodutor de ratas"*** do qual participou(aram) o(s) ***Renata Juliana da Silva e a pesquisadora Marília Cerqueira Leite Seelaender***, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA)** em **19.11.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 24 de novembro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEAA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEAA – ICB/USP

Aos meus pais Valdir Pereira da Silva e Selma Aparecida da Silva, e meus avôs, João Imorino Mendonça e Luzia de Paula Mendonça (in memoriam), pelo exemplo de vida, pelo amor e incentivo constantes a minha formação pessoal e profissional.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Eis o momento de externar em palavras os meus sinceros agradecimentos a todos e tantos, que fizeram parte dessa longa jornada, que está apenas começando. Gostaria de dizer em palavras o que sinto agora. São tantos a agradecer!

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, ou a uma força maior, que muitos denominam como Deus, por conceder-nos a vida e a oportunidade do aprendizado constante em todas as esferas evolutivas da humanidade e por permitir a realização desse trabalho. Da mesma forma, agradeço cada “pedra no caminho”, cada dificuldade vivida e vencida, que me fez uma pessoa melhor tanto pessoal como profissionalmente.

Gostaria de deixar claro meu agradecimento e respeito aos animais utilizados na pesquisa, suas vidas são utilizadas no intuito de melhorar de algo.

Agradeço o apoio e carinho da minha família, aqueles que às vezes sem entender minha vocação, mesmo assim a respeitam e incentivam sempre! Meus amados pais, Valdir Pereira da Silva e Selma Aparecida da Silva, por me dar à vida, pelo convívio diário, pelo exemplo, amor e carinho, por tudo que as palavras somente não seriam capazes de expressar. Meus irmãos Rodrigo Pereira da Silva e Rinaldo Diego da Silva, pelo exemplo, amor, carinho e irmandade. A minhas cunhadas Verônica Freires e Sílvia Quaresma, irmãs de coração, muito obrigada pela amizade e apoio. Ao meu mais que amado sobrinho João Otávio, uma das maiores alegrias em minha vida, meu amor obrigada por fazer da vida da tia mais feliz! Aos meus demais familiares, tias e tios, em especial meus avós João Imorino Mendonça e Luzia de Paula Mendonça (in memoriam), pelo exemplo de vida, pela doçura, colo e apoio constantes, por me ensinar que nada perdemos quando somos honestos e fazemos o que amamos. Vovozinha amada, infelizmente a vida não permitiu que a senhora acompanhasse esse momento de realização de corpo presente, mas sei que sempre estás comigo, te amo e sinto imensamente sua falta todos os dias da minha vida! Aos meus padrinhos (segundos pais) Laércio Zavarise e Sandra Zavarise, pelo amor, incentivo e carinho constantes, amo muito vocês! Aos meus primos (irmãos) Tatiane Zavarise, Tiago Zavarise e Tamires Zavarise, não precisam dizer o quanto eu os amo e o quanto vocês são importantes em minha vida!

Agradeço imensamente ao meu orientador (chefe) Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt, sobretudo, pela confiança depositada em mim desde o primeiro momento. Pelo exemplo de ser humano e profissional, pela honestidade e educação de sempre. O senhor tem me ensinado, sobretudo, como ter humildade não apenas nas palavras, mas principalmente nas atitudes, e acima de tudo, respeitar o próximo como a si mesmo, sabendo ouvir e a respeitar a opinião alheia, mesmo quando essa não é a mesma que a nossa. Sinto-me lisonjeada por poder dizer que fui (sou) orientada pelo senhor.

Aos professores Coordenadores da Pós Graduação do Departamento de Anatomia do ICB USP, prof. Dr. Newton Canteras e profa. Dra. Maria Luiza Chaves, pelos valores, apoio e ensinamentos durante o curso.

A todos os professores do Departamento de Anatomia e do ICB, que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Não poderia deixar de agradecer também, as profas. Dra. Sandra M. L. Ribeiro (USJT/EACH-USP) e Kátia de Angelis (USJT/INCOR), minhas iniciadoras no mundo acadêmico e científico, as quais eu devo os valores e ensinamentos aprendidos e perpetuados em minha vida pessoal e profissional.

A prof.Dra. Carol F. Elias pela ajuda constante, e pelo exemplo de pessoa e profissional.

Ao amigo José Donato Jr, pela ajuda e apoio constantes, pelas conversas científicas proveitosas.

A professora e acima de tudo amiga Luciane V. Sita, queria ter palavras para traduzir o sentimento de amizade e cumplicidade que tenho contigo. Mais que professora, orientadora, pesquisadora, a considero minha amiga, quem sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, seja bons ou ruins, me apoiando e dando broncas quando necessário, muito obrigada de coração por tudo que sempre fez e faz por mim.

A Jo (mãe postiça/adotiva) por toda amizade, carinho, apoio, por me fazer uma pessoa melhor, seja através de conselhos ou broncas, sei que nossa amizade é verdadeira. Obrigada pelos meninos Luis Guilherme e João Lucas, anjinhos que sempre me alegam, amo meus chuchus!

Aos profs. Dr. Celso Franci pelas dosagens dos hormônios LH e FSH, prof. Dr. Antunes, profa. Dra. Sílvia Lacchini pela ajuda na histologia ovariana e uterina, assim como a prof. Dra. Telma Zorn, pela atenção de sempre.

Ao prof. João Bosco Pesquero, pelo auxílio na análise das concentrações de leptina do segundo experimento.

A prof. Dra. Marília Seelaender, pela ajuda em técnicas, apoio, incentivo e discussões científicas. Pela atenção e carinho comigo!

As professoras Dra. Patrícia Castelucci e Janete Franci que gentilmente participaram do exame de Qualificação deste trabalho.

Aos todos os colegas/amigos do LNQ que de forma direta ou indireta contribuíram como meu crescimento pessoal e profissional: Débora Bueno, Helder Cravo, Fernando Vale, Carlos Alexandre, André Valério, Daniela Batagello, Kelly Torres, Isabel Céspedes, Amanda Ribeiro.

Aos amigos do laboratório de Lipídes do ICB-I: Fábio Lira, Robson Eder, Daniela Caetano, Fernando Rosa, Michele Alves, e em especial A técnica Emília Ribeiro, a Renata Silvério e Luiz Carnevali, pelo carinho, apoio e incentivos constantes, uma das conquistas nesses dois anos e meio foi ter conhecido vocês.

Aos amigos do Laboratório de Biologia da Reprodução de Mamíferos do ICB-I: Rodolfo Favaro e a técnica Fernanda Barrence, pela ajuda no processamento histológico dos ovários e útero, pela atenção e carinho constantes.

Aos amigos do antigo Laboratório do Movimento Humano, da USJT: Michele Sartori, Paula Dalvio, Emy Suelen, Janaína Brito, Nathália Bernardes, Íris Callado, pela amizade sincera e de tempos.

Aos meus amigos Marília Malta, Daniel Taniguchi, Renato D'Arrigo, Juliana Ramos, Igor Fernandes, Sabrina Soares, Cintia Homa, Andréia Satiko, Caio Daiky e Andressa Baldissarelli, pelos momentos bons, ruins, conselhos, por estarem comigo em todos os sentidos.

Aos colegas da Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, estamos na luta!

Ao meu terapeuta Rafael que me ajudou a segurar os momentos difíceis, encarar a vida de outras formas e a me auto-conhecer.

A todos os funcionários do ICB, principalmente os da biblioteca, pelo carinho e atenção constantes.

Ao pessoal do biotério do Departamento de Anatomia, Renivaldo, Rodrigo, Ricardo e Fábio, sem a ajuda de vocês esse trabalho não seria possível, muito obrigada pela atenção!

As secretárias do Departamento de Anatomia, Cristiane, Patrícia e a Luciana.

A Cristiane Freire pelo suporte técnico.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro e ao CNPQ.

A todos que de maneira direta ou indireta participaram e ajudaram na execução desta dissertação.

MUITO OBRIGADA!

*E as frustrações resistiram ao tempo.
A descoberta do novo move os meus dias!
Não escolhi a ciência.
A ciência me escolheu!!*

(Renata J. Silva)

RESUMO

Silva RJ. Efeitos do treinamento físico intenso e da restrição alimentar sobre a ação da leptina mediada pelo hormônio concentrador de melanina no eixo reprodutor de ratas. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

O treinamento físico intenso (TFI) associado à restrição alimentar (RA) é uma prática comum entre atletas profissionais do sexo feminino, ocasionando amenorréia hipotalâmica funcional. Foi demonstrado que a leptina pode atuar em neurônios GnRH via ação do hormônio concentrador de melanina (MCH). Dessa forma, objetivamos avaliar o efeito do TFI e da RA em parâmetros do eixo reprodutor e na expressão do RNAm do MCH em ratas fêmeas. Para tanto 67 ratas fêmeas foram distribuídas em: sedentárias alimentadas (SA), sedentárias com restrição alimentar (SR), treinadas alimentadas (TA) e treinadas com restrição alimentar (TR). As ratas treinadas realizaram treinamento aeróbio em esteira a 85% VO₂max. Os grupos SR e TR consumiriam 50% de ração em relação ao consumo dos animais controles alimentados. As variáveis avaliadas foram: peso corporal (PC), peso do tecido adiposo branco (TAB), peso dos ovários e útero, ciclo estral (esfregaço vaginal) e a expressão do RNAm do ppMCH na área incerto hipotalâmica (IH_y) e área hipotalâmica lateral (LHA). O grupo TR entrou em anestro a partir da quarta semana de experimento. Os grupos SR e TR apresentaram redução de PC, no peso dos ovários, úteros e TAB, quando comparados aos SA e TA. Houve redução sérica de leptina nos grupos SR e TR, sendo que no grupo TR, a relação leptina/TAB mostrou-se aumentada. Os grupos SR e TR apresentaram alterações histomorfométricas nos ovários e úteros, sendo que os grupos TA, SR e TR apresentaram cistos ovarianos. A expressão do ppMCH na IH_y foi menor nos animais em restrição alimentar e nos animais alimentados *ad libitum* em proestro, e na LHA foi maior nos animais em restrição alimentar e nos animais alimentados *ad libitum* em proestro. Conclui-se que a leptina exerce forte influência no eixo reprodutor feminino, tal ação parece ter envolvimento do MCH, sobretudo o proveniente da IH_y, uma vez que o MCH oriundo da LHA tem relação com o estímulo a busca de alimento. Ainda, parecem existir diferenças na ação biológica do TAB quando o organismo é exposto a um balanço energético negativo drástico.

Palavras chaves: Exercício físico. Desnutrição. Hormônio concentrador de melanina. Leptina. Ciclo estral animal. Neuroendocrinologia.

ABSTRACT

Silva RJ. Effects of intense physical training and food restriction on the action of leptin mediated by melanin concentrating hormone in the reproductive axis in female rats. [Masters thesis (Morphofunctional Science)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Intense physical training (ITF) associated with food restriction (FR) is a common practice among professional female athletes, resulting in functional hypothalamic amenorrhea. It has been shown that leptin can act on GnRH neurons via the action of melanin-concentrating hormone (MCH). This was aimed at evaluating the effect of the ITF and the FR axis parameters and the player of the MCH mRNA expression in female rats. For this purpose 67 female rats were divided into: sedentary fed (SF), sedentary food-restricted (SR), trained fed (TF) and trained with food restriction (TR). The trained rats performed aerobic training on a treadmill at 85% VO₂max. SR and TR groups consume 50% of feed intake in relation to control animals fed. The variables evaluated were: body weight (BW), weight of white adipose tissue (WAT), weight of ovaries and uterus, estrous cycle (vaginal smear) and mRNA expression of uncertainty in the hypothalamic ppMCH (IH_y) and the lateral hypothalamic area (LHA). The group entered anestrus TR from the fourth week of the experiment. SR and TR groups showed a reduction of PC, the weight of the ovaries, uterus and WAT, when compared with SF and TF. There was a reduction of serum leptin in groups SR and TR, and TR group, the ratio leptin/WAT showed increased. SR and TR groups showed histomorphometric changes in the ovaries and uterus, and the TA groups, SR and TR had ovarian cysts. The expression of the IH_y ppMCH was lower in animals on restricted food and animals fed *ad libitum* in proestrus, and LHA were higher in animals on restricted food and animals fed *ad libitum* in proestrus. It is concluded that leptin exerts a strong influence on female reproductive axis, such action appears to have involvement of MCH, especially from the IH_y, since the MCH of the LHA is related to the motivational behavior associated to the search for food. Still, there appear to be differences in the biological action of the WAT when the body is exposed to a drastic negative energy balance.

Keywords: Physical exercise. Malnutrition. Melanin-concentrating hormone. Leptin. Animal estrous cycle. Neuroendocrinology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo estral e menstrual. Comparação entre as alterações hormonais durante o ciclo estral de ratas e o ciclo menstrual de mulheres.....	32
Figura 2: Desenho experimental. Ilustração esquemática do estudo, 2009.	41
Figura 3: Ratos na esteira ergométrica.....	45
Figura 4: Diferença final de peso corporal. Variação do peso corporal dos grupos experimentais ao final do experimento, 2009.....	58
Figura 5: Peso corporal. Evolução do peso corporal dos grupos experimentais durante o experimento, 2009.....	59
Figura 6: Consumo médio de ração. Consumo de ração dos grupos experimentais durante o experimento, 2009.....	61
Figura 7: Consumo de ração de acordo com as fases do ciclo estral. Consumo de ração dos grupos experimentais durante o experimento, 2009.....	62
Figura 8: Ciclo estral. Representação gráfica do ciclo estral durante a última semana de experimento, 2009.....	63
Figura 9: Dosagens hormonais, 2009.....	64
Figura 10: Dosagens hormonais de acordo com as fases do ciclo estral, 2009.....	66
Figura 11: Diferença final de peso corporal. Variação do peso corporal dos grupos experimentais ao final do experimento, 2011.....	67
Figura 12: Peso corporal. Evolução do peso corporal dos grupos experimentais durante o experimento, 2011.....	68
Figura 13: Consumo médio de ração. Consumo de ração dos grupos experimentais durante o experimento, 2011.....	69
Figura 14: Consumo médio de ração. Consumo de ração dos grupos experimentais durante o experimento, 2011.....	70
Figura 15: Ciclo estral. Representação gráfica do ciclo estral durante a última semana de protocolo experimental, 2011.....	71
Figura 16: Dosagem hormonal, 2011. Concentração sérica de leptina.....	72

Figura 17: Corte transversal de ovários entre os grupos experimentais em diestro.....	74
Figura 18: Úteros dos grupos experimentais, 2011.....	75
Figura 19: Corte transversal de úteros entre os grupos experimentais em diestro.....	77
Figura 20: Hibridização <i>in situ</i> para o ppMCH.....	79
Figura 21: Expressão do RNAm de MCH na IHy dos grupos experimentais em diestro e proestro.....	80
Figura 22: Hibridização <i>in situ</i> para o RNAm do ppMCH na IHy.....	81
Figura 23: Expressão do RNAm de MCH na LHAt dos grupos experimentais em diestro e proestro.....	82
Figura 24: Hibridização <i>in situ</i> para o RNAm do ppMCH na LHAt.....	83
Figura 25: Expressão do RNAm de MCH na LHAp dos grupos experimentais em diestro e proestro.....	84
Figura 26: Hibridização <i>in situ</i> para o RNAm do ppMCH na LHAp.....	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Correlação entre o ciclo estral de ratas e o ciclo menstrual da mulher, com a descrição microscópica das fases. Adaptado de Marcondes, 2002.....	33
Quadro 2: Descrição do desenho experimental.....	42
Quadro 3: Protocolo de treinamento físico realizado pelos animais treinados (TA e TR) durante o protocolo experimental.....	141
Quadro 4: Desenho experimental, 2011.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Peso absoluto e relativo do TAB, ovários e útero dos grupos experimentais, 2009.....	60
Tabela 2- Dados de variação de peso corporal final e consumo de ração nos grupos experimentais (*), 2009.....	60
Tabela 3- Dados de variação de peso corporal final e consumo de ração nos grupos experimentais (*), 2011.....	68
Tabela 4- Peso absoluto e relativo dos ovários e útero dos grupos experimentais, 2011.....	73
Tabela 5- Parâmetros histomorfométricos do ovário dos grupos experimentais em diestro, 2011.....	73
Tabela 6- Parâmetros uterinos dos grupos experimentais em diestro, 2011...	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3v	Terceiro ventrículo
α -MSH	Hormônio estimulante de melanócitos alfa
ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
Arc	Núcleo arqueado
AgRP	Proteína relacionada ao agouti
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CEA	Coeficiente de Eficácia Alimentar
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
Fx	Fórnice
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
GPR54	Receptor da kisspepitina
HE	Hematoxilina/Eosina
Ic	Cápsula interna
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
Icv	Intracerebroventricular
IHy	Área Incerto Hipotalâmica
IOD	Densidade óptica integrada
JAK	Proteína janus-kinase
Kiss1	Kisspepitina
LH	Hormônio Luteinizante
LHA	Área Hipotalâmica Lateral
MCH	Hormônio Concentrador de Melanina
MCHR1	Receptor 1 do Hormônio Concentrador de Melanina
MC5-R	Receptor de melanocortina
mPOA	Área pré-óptica medial
NaCl	Cloreto de sódio
NPY	Neuropeptídeo Y
Opt	Trato Óptico

ORX	Orexina
OVLT	Órgão vascular da lâmina terminal
PBS	Tampão fosfato de sódio e cloreto de sódio
POMC	Pró-opiomelanocortina
ppMCH	prepro-hormônio concentrador de melanina
RIA	Radioimunoensaio
RNA _m	RNA mensageiro
rPOA	Área pré-óptica rostral
SA	Sedentário Alimentado
SAFF	Sedentário Alimentado Fase Folicular
sMCH	Hormônio Concentrador de Melanina do salmão
SSC	Tampão cloreto de sódio/citrato de sódio
SR	Sedentário Restrito
SRFL	Sedentário Restrito Fase Lútea
STATs	Signal transducer and activator of transcription
TA	Treinado Alimentado
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAFL	Treinado Alimentado Fase Lútea
TAFO	Treinado Alimentado Fase Ovulatória
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TMA	Tríade de Mulher Atleta
TR	Treinado Restrito
TRFL	Treinado Restrito Fase Lútea
VDB	Núcleo da banda diagonal de Broca
VO _{2máx}	Consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
1.1 Justificativa.....	25
1.2 Hipótese	25
1.3 Objetivos.....	25
<u>1.3.1 Objetivo Geral.....</u>	<u>25</u>
<u>1.3.2 Objetivos Específicos.....</u>	<u>26</u>
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1 Regulação do sistema reprodutor feminino humano.....	28
2.2 Ciclo menstrual e ciclo estral.....	31
2.3 Alterações no eixo reprodutor feminino decorrentes do exercício físico e dieta.....	33
2.4 Relação entre leptina, hormônio concentrador de melanina e eixo reprodutor feminino.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 Animais de experimentação.....	41
3.2 Experimento I: Efeitos dos tratamentos (TFI x RA).....	43
3.3 Monitoramento do consumo de ração.....	44
3.4 Treinamento físico.....	44
3.5 Peso corporal.....	46
3.6 Determinação do ciclo estral.....	46
3.7 Sacrifício dos animais e preparação dos tecidos.....	47
3.8 Radioimunoensaio (RIA).....	48
3.9 Hibridização <i>in situ</i> com enxofre radioativo (³⁵S).....	49
3.10 Experimento II: Efeitos dos tratamentos (TFI x RA) em animais na fase lútea do ciclo estral.....	51
3.11 Coloração com Hematoxilina e Eosina (Ovários e Úteros).....	53
3.12 Análise dos dados.....	53
4 RESULTADOS.....	58
4.1 Experimento I: Efeitos dos tratamentos (TFI x RA).....	58
<u>4.1.1 Parâmetros biométricos.....</u>	<u>58</u>

4.1.1.1 <i>Variação total de peso corporal</i>	58
4.1.1.2. <i>Evolução do peso durante as semanas do experimento</i>	58
4.1.1.3 <i>Peso dos tecidos (TAB, TAM, ovários e útero) em valores percentuais (%) e absolutos (g)</i>	59
<u>4.1.2 Parâmetros dietéticos</u>	61
4.1.2.1 <i>Consumo de ração durante as semanas do experimento</i>	61
4.1.2.2 <i>Consumo de ração de acordo com fase do ciclo estral</i>	61
<u>4.1.3 Parâmetros do eixo reprodutor</u>	62
4.1.3.1 <i>Ciclo estral</i>	62
<u>4.1.3.2 Concentrações hormonais</u>	63
4.1.3.2.1 <i>Efeito dos tratamentos experimentais (TFI x RA)</i>	63
4.1.3.2.2 <i>Efeito dos tratamentos de acordo com ciclo estral</i>	65
4.2 Efeito dos tratamentos experimentais (TFI x RA) de acordo com as fases do ciclo estral	67
<u>4.2.1 Parâmetros biométricos</u>	67
4.2.1.1 <i>Variação total de peso corporal</i>	67
4.2.1.2 <i>Evolução do peso durante as semanas do experimento</i>	67
<u>4.2.2 Parâmetros dietéticos</u>	69
4.2.2.1 <i>Consumo de ração</i>	69
4.2.2.2 <i>Consumo de ração de acordo com fase do ciclo estral</i>	69
<u>4.2.3 Parâmetros do eixo reprodutor</u>	70
4.2.3.1 <i>Ciclo estral</i>	70
<u>4.2.4 Concentrações séricas de leptina</u>	71
<u>4.2.5 Parâmetros anatômicos e histológicos (macro e microscópicos)</u>	72
4.2.5.1 <i>Peso dos tecidos (ovários e útero) em valores percentuais (%) e</i>	73

absolutos (g).....	
4.2.5.2 Ovários.....	73
4.2.5.3 Úteros.....	75
4.2.6 Parâmetro de expressão gênica.....	78
4.2.6.1 Hibridização <i>in situ</i> para RNAm do ppMCH.....	78
4.2.6.2 RNAm ppMCH na IHy.....	80
4.2.6.3 RNAm ppMCH na LHAt.....	82
4.2.6.4 RNAm ppMCH na LHAp.....	84
4.3 <u>Sumarização dos resultados</u>	86
5 DISCUSSÃO	89
5.1 Considerações metodológicas.....	89
5.2 Parâmetros biométricos.....	90
5.3 Parâmetros dietéticos.....	91
5.4 Parâmetros do eixo reprodutor.....	93
5.5 Parâmetros anatômicos e histológicos.....	97
5.6 Parâmetros da expressão gênica (RNAm ppMCH).....	100
6 CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS	114
ANEXOS	139
ANEXO A – Treinamento físico.....	140
ANEXO B – Desenho experimental.....	142
ANEXO C – Artigo científico publicado I.....	144
ANEXO D – Artigo científico publicado II.....	145
ANEXO E – Artigo científico publicado III.....	146
ANEXO F – Resumo de artigo aceito.....	147

ANEXO G – Capítulo de livro publicado I.....	148
ANEXO H – Capítulo de livro publicado II.....	149

1 INTRODUÇÃO

De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!

(Fernando Sabino)

Atualmente, a obesidade pode ser classificada como uma pandemia (Benatti e Lancha Junior, 2007; Niswender et al., 2004). Torna-se cada vez mais alarmante o número de indivíduos obesos no mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde (Margetts, 2003) estimam que haja no mundo mais de um bilhão de adultos com sobrepeso, dos quais 300 milhões são obesos.

Sabe-se que a obesidade é uma doença que pode predispor ao desenvolvimento de outras co-morbidades como: *diabetes mellitus*, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, dislipidemias, entre outras. Podemos ter uma diminuição da expectativa de vida nas populações em decorrência desses fatores de risco (Margetts, 2003).

Isto se deve, sobretudo, a um fenômeno denominado transição nutricional, o qual integra os processos de transição demográfica e epidemiológica, envolvendo mudanças nos hábitos alimentares e estilo de vida, processo o qual ainda não se concluiu (Pinheiro et al., 2004; Popkin, 2001).

De acordo com a Estratégia Global para a Alimentação Saudável, Atividade Física e Saúde (Margetts, 2003) as principais mudanças no estilo de vida que devem ser estimuladas são:

- Adoção de uma dieta saudável e equilibrada que forneça todos os nutrientes indispensáveis para um perfeito funcionamento do organismo, de acordo com o gasto requerido pelo mesmo;
- A prática regular e diária de exercícios físicos na frequência e intensidade necessárias a fim de promover adaptações no condicionamento físico como um todo.

Embora a prática de exercício físico e a nutrição adequada tragam benefícios fisiológicos, metabólicos e psicológicos, a busca de todos esses benefícios pode gerar efeitos contrários, sem um planejamento alimentar e de treinamento físico adequados. Uma das respostas indesejáveis à combinação de dieta inadequada e exercícios físicos é a alteração no eixo reprodutor, que pode culminar em amenorréia hipotalâmica funcional, um mal que atinge, sobretudo, atletas de grande desempenho, como corredoras e ginastas (Williams et al., 2001; Ribeiro et al., 2007).

A leptina, um hormônio produzido e liberado pelo tecido adiposo, tem sido alvo de diversos estudos, principalmente no que diz respeito aos mecanismos de

controle da fome e saciedade, logo, no controle de peso e gasto energético e eixo reprodutor (Trayhurn et al., 1995).

Estudos recentes como o de Williamson-Hughes et al. (2005) sugeriram que a leptina possa atuar no eixo reprodutor, em neurônios GnRH (hormônio liberador das gonadotrofinas), via neurônios que expressam o hormônio concentrador de melanina (MCH), sugerindo que este seja um circuito neuroanatômico potencial, pelo qual a leptina regula a atividade do GnRH.

Com base nessas argumentações, fica claro que, para se avaliar o impacto do treinamento físico e da restrição alimentar no eixo reprodutor, se mostra necessário aliar informações sobre a interação das vias neuroquímicas entre leptina e o MCH.

1.1 Justificativa

O presente estudo visa suprir com mais dados a literatura atual sobre os circuitos neurais envolvidos em situações de desequilíbrio energético, hormonal e do ciclo reprodutor, uma vez que o MCH parece ser um mediador importante da ação da leptina na atividade dos neurônios GnRH.

1.2 Hipótese

O desequilíbrio energético ocasionado pela somatória do treinamento físico intenso (TFI) e restrição alimentar (RA) gera alterações no eixo reprodutor feminino. Teria o MCH um papel mediador da ação da leptina no eixo reprodutor?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

- Analisar os efeitos do TFI e da RA sobre a ação da leptina mediada pelo MCH no eixo reprodutor de ratas.

1.3.2 Objetivos específicos

1.3.2.1 Experimento I: Efeitos dos tratamentos (TFI x RA)

- Verificar e comparar as possíveis alterações em parâmetros biométricos, dietéticos, anatômicos decorrentes do TFI e da RA.
- Verificar as possíveis alterações hormonais (leptina, estradiol, progesterona, LH e FSH) decorrentes do TFI e da RA.

1.3.2.2 Experimento II: Efeitos dos tratamentos (TFI x RA) em animais na fase lútea do ciclo estral

- Verificar e comparar as possíveis alterações em parâmetros biométricos, dietéticos, anatômicos e histológicos decorrentes do TFI e da RA.
- Verificar as possíveis alterações na concentração sérica de leptina decorrentes do TFI e da RA;
- Avaliar a possível alteração da expressão do RNAm do ppMCH na área incerto hipotalâmica (IH_y) e área hipotalâmica lateral (LHA) na sua porção tuberal (LHA_t) e posterior (LHA_p);
- Avaliar a relação da leptina e do MCH com os parâmetros identificados acima.

2 REVISÃO DA LITERATURA

*"He who loves practice without
theory is like the sailor who boards
ship without a rudder and compass
and never knows where he may cast."*

(Leonardo da Vinci)

2.1 Regulação do sistema reprodutor feminino humano

O ciclo menstrual pode ser dividido em três fases: fase folicular, essencialmente estrogênica, ovulação e fase lútea, predominantemente progestagênica. Para que ocorram todas as fases se faz necessária uma integração perfeita dos hormônios e de fatores liberadores hipotalâmicos, hipofisários e ovarianos (Bullen et al., 1985).

A secreção da maioria dos hormônios da hipófise anterior é controlada por fatores liberadores/inibidores sintetizados no hipotálamo, e liberados na eminência mediana sendo transportados até a hipófise anterior por meio do sistema porta hipotálamo-hipofisário. No caso das gonadotrofinas, pelo menos um hormônio liberador, o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) é importante. Neurônios do hipotálamo não secretam o GnRH de maneira contínua, mas sim em pulsos que duram alguns minutos e que ocorrem a intervalos de uma a três horas. A liberação pulsátil do GnRH também causa produção pulsátil de hormônio luteinizante (LH). Em menor escala, a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) também se eleva e se reduz, acompanhando os pulsos hipotalâmicos do GnRH (Zelevnik e Pohl, 2006).

Em mulheres, a concentração de LH e FSH aumenta rapidamente logo no primeiro dia da menstruação. O LH então permanece mais ou menos constante durante a maior parte da fase proliferativa, enquanto o FSH fica, durante os sete primeiros dias do ciclo, em níveis mais elevados e, logo após, começa a decair gradativamente. A diminuição na concentração plasmática de FSH, observada neste segundo período da fase proliferativa, depende dos níveis de estrógenos, que exercem o mecanismo de retroalimentação negativa sobre hipotálamo e adeno-hipófise. Os níveis de LH e FSH decrescem durante a fase progestacional do ciclo atingindo valores próximos da metade daqueles encontrados durante a fase proliferativa. A secreção destes hormônios nas duas fases do ciclo não se faz de uma forma constante, mas sim sob forma pulsátil, com uma a duas horas de duração. A amplitude e frequência destes pulsos se acentuam com o elevar dos níveis de estrógenos (Zelevnik e Pohl, 2006).

A secreção pulsátil de GnRH estimula a produção hipofisária do LH e FSH. Esses hormônios, por sua vez, estimulam os ovários a produzir estrógeno e

progesterona. O ciclo normal requer a manutenção da liberação pulsátil de GnRH em frequência e amplitude (Ferin, 1996).

Há dois tipos de hormônios sexuais ovarianos: os estrógenos e as progestinas. A estrutura folicular do ovário produz preferencialmente os estrógenos e uma relativamente pequena quantidade de andrógenos. O mais importante dos estrógenos é o hormônio estradiol, e a progestina mais importante é a progesterona. A concentração de estrógeno é baixa na infância (menor que 10pg/ml), eleva-se, gradativamente, durante a puberdade, atingindo concentrações estáveis no indivíduo adulto após a menarca (primeira menstruação (Frankovich e Lebrun, 2000).

A função principal dos estrógenos no ciclo menstrual consiste em estimular o crescimento do endométrio uterino, provocando um aumento tanto no número de células (hiperplasia) como no tamanho das mesmas (hipertrofia) (Zelevnik e Pohl, 2006).

Os hormônios ovarianos, especialmente os estrógenos, exercem ações sobre a maioria dos tecidos orgânicos, tais como: órgãos ou tecidos diretamente relacionados com as funções reprodutoras, sistema nervoso central, sistema cardiovascular, hematopoiético e outros não diretamente relacionados com o mecanismo de reprodução (Sampaio, 2002).

Além de exercerem função sobre os tecidos alvos, os estrógenos controlam, por mecanismo de retroalimentação negativa, a secreção de FSH e LH (Soldani et al., 1994).

2.2 Ciclo menstrual e ciclo estral

A vida sexual normal de uma mulher adulta caracteriza-se por alterações rítmicas mensais na velocidade de secreção dos hormônios sexuais e modificações correspondentes nos próprios órgãos sexuais. Este padrão rítmico chama-se ciclo sexual feminino. A duração média do ciclo é de 28 dias, podendo ser de apenas 20 ou atingir 45 dias mesmo em mulheres completamente normais (Frankovich e Lebrun, 2000).

Em ratas o ciclo reprodutor é denominado ciclo estral e é constituído de quatro fases obedecendo à seguinte ordem: proestro, estro, metaestro e diestro.

A rata, assim como a mulher, tem ciclo poliéstrico de ovulação espontânea, com ciclo completo de quatro a cinco dias (Freeman, 2006; Marcondes et al., 2002; Westwood, 2008).

Um ciclo estral típico é caracterizado por duas fases fundamentais: a fase proliferativa ou folicular e a progestacional ou secretora. As características celulares do esfregaço vaginal variam de acordo com a fase do ciclo. Na rata não há uma fase progestacional típica (a menos que haja fecundação ou coito) (Marcondes et al., 2002).

Considerando-se que o rato é um modelo de experimentação muito empregado em estudos metabólicos, é importante discutir a possível extrapolação de dados de alterações reprodutivas neste animal. A Figura 1 demonstra a ação dos hormônios no ciclo reprodutor da mulher e o ciclo estral de ratas. O quadro 1 detalha e faz a relação entre ciclo menstrual e ciclo estral.

Figura 1: Ciclo estral e menstrual.

Comparação entre as alterações hormonais durante o ciclo estral de ratas e o ciclo menstrual de mulheres.

FONTE: Adaptado de (Staley e Scharfman, 2005).

Quadro 1: Correlação entre o ciclo estral de ratas e o ciclo menstrual da mulher, com a descrição microscópica das fases. Adaptado de Marcondes, 2002.

Fase/ Caracterização	DIESTRO É a fase de repouso, não sofrendo o epitélio vaginal ação hormonal: duração de 28-50hs.	PROESTRO Fase preparatória ou construtiva, secreção elevada de estrógeno e síntese de progesterona: duração 12-18hs. Na tarde do proestro ocorre o pico de LH/FSH/progesterona.	ESTRO Fase ovulatória, período anabólico, (nessa fase a fêmea está receptiva ao macho), duração: 25-30hs.	METAESTRO Fase luteínica: 24-30hs, período catabólico. Fase secretória que antecede o diestro. Se houver fecundação este aspecto permanece.
Descrição comparativa com a mulher	Corresponde na mulher à fase menstrual.	Corresponde na mulher a fase proliferativa.	Corresponde na mulher a ovulação.	Corresponde na mulher, a fase gestacional.
Descrição microscópica após esfregaço vaginal	Predominância grande de leucócitos, raras células epiteliais (pequenas) de muco abundante.	Desaparecimento dos leucócitos, células epiteliais grandes, nucleadas e redondas.	Apenas células corneificadas.	Reaparecem os leucócitos, entremeados, de algumas células corneificadas e outras epiteliais.

2.3 Alterações no eixo reprodutor feminino decorrentes do exercício físico e dieta

A secreção pulsátil do GnRH pode ser alterada ocasionando diminuição da produção de LH e FSH que por sua vez acarreta decréscimo da produção dos esteróides ovarianos. Esta situação pode ocorrer quando as mulheres se encontram em estado de amenorréia (Andrico et al., 2002; Cumming et al., 1994). Pode-se definir amenorréia como a ausência de menstruação por um período superior a 90 dias, podendo ser classificada em amenorréia primária: quando há ausência de menarca; amenorréia secundária: ausência de menstruação por 3 ciclos consecutivos ou 6 meses em mulheres que já apresentaram ciclo normal e amenorreia fisiológica: quando não constitui qualquer problema, pois corresponde à ausência de menstruação durante a infância, em caso de gravidez e amamentação ou após a menopausa, situações em que a inexistência de menstruação é absolutamente normal (Lo et al., 2003).

A probabilidade de ocorrer a amenorréia depende de fatores associados como: perda rápida de peso, baixo peso corporal, baixo percentual de gordura,

rotina de treinamento físico extenuante, períodos menstruais irregulares antes do aumento do volume de treinos, estresse emocional ou ainda uma dieta restritiva (Warren, 1992). Evidências indicam que o estresse fisiológico, metabólico e nutricional pode ser a base do surgimento da amenorréia. Desta forma, o exercício físico pode ser incluído nesses fatores (Mantoanelli et al., 2002).

Em mulheres envolvidas com treinamento físico intenso, tem sido bastante estudada a chamada “tríade da mulher atleta (TMA)”. Segundo o Colégio Americano de Medicina Esportiva (Yeager et al., 1993), trata-se de uma síndrome que engloba: desordens alimentares, menstruais e osteoporose (Hulver e Houmard, 2003; Pardini, 2001). A amenorréia pelo exercício tem incidência que pode atingir 44% das atletas competitivas, comparada com a incidência de 1 a 5% entre a população geral (Thong e Graham, 1999).

Vários estudos associam a prática de exercícios físicos extenuantes com baixo peso e reservas diminuídas de gordura corporal em atletas como causa do desenvolvimento de amenorréia. A ingestão alimentar deficiente resulta em um balanço energético negativo, e a combinação de alto gasto energético provocado pelo treinamento físico pode ser a causa de uma desordem na pulsatilidade de GnRH, refletindo em baixos níveis de LH e FSH resultando em distúrbios menstruais (Loucks e Heath, 1994; Loucks et al., 1998; Warren, 1992).

Diante do exposto fica claro que as causas das desordens mentruais na mulher atleta são múltiplas e não completamente entendidas.

2.4 Relação entre leptina, hormônio concentrador de melanina e eixo reprodutor

Desde 1953 já se supunha a existência da leptina, sendo Kennedy (1953 *apud* (Soares e Guimarães, 2001) o primeiro a propor a teoria lipostática da regulação do peso corporal. Tal teoria relatava que, quando a massa adiposa se expandia, a concentração circulante da “molécula sinal” poderia aumentar e esta substância poderia atuar nos circuitos neurais do cérebro, controlando o consumo e o balanço de energia.

Em 1994, Zhang et al., descobriram tanto em ratos como em humanos, a posição do gene da obesidade, chamando-o *ob/ob*, e pouco tempo depois se caracterizou o produto desse gene, denominando-o leptina.

A leptina é sintetizada principalmente no tecido adiposo branco (TAB), e em menor proporção no estômago, na placenta, e nas glândulas mamárias (Bado et al., 1998; Masuzaki et al., 1997; Zhang et al., 1994).

A leptina é um hormônio de origem protéica, isolado a partir do TAB como produto da transcrição do gene *ob*, sendo composto por 167 aminoácidos, com peso molecular 16 KDa, cujo nome deriva do grego *leptos*, que significa magro, e 84% de sua seqüência de aminoácidos é idêntica entre humanos e camundongos, enquanto que há 67% de homologia quando comparado com outras espécies de primatas (Carretero et al., 2001; Houseknecht et al., 1998; Mantzoros, 1999).

A compreensão do mecanismo de ação da leptina incluiu a identificação de seus receptores, membros da família dos receptores de citocinas, cujo gene é transcrito e clivado em pelo menos 5 diferentes isoformas: o receptor longo (Ob-Rb), os receptores curtos (Ob-Ra, c e d), além do receptor solúvel (Ob-Re). O receptor longo tem um domínio intracelular de 302 aminoácidos, é expresso em algumas regiões do cérebro, e responde às ações centrais da leptina. A isoforma curta do receptor, Ob-Ra, é amplamente distribuída nos diferentes tecidos corporais (Houseknecht et al., 1998; Huang et al., 2001; Hulver e Houmard, 2003).

No que diz respeito ao receptor longo, o mecanismo de sinalização intracelular, da mesma forma que para as citocinas, ocorre por mecanismos de fosforilação, ativação da proteína janus-kinase (JAK) e de fatores de transcrição chamados de STATs (*signal transducer and activator of transcription*), especialmente o STAT-3. Estes se translocam para o núcleo celular, regulando a expressão dos genes alvos da leptina (Hegyi et al., 2004).

Além da via JAK-STAT, atualmente sabe-se que a leptina é capaz de ativar a sinalização celular por outros mecanismos, sendo que a ativação da proteína fosfatidilinositol-3-kinase merece destaque, por ser um ponto de convergência (*cross-talk*) entre a sinalização da leptina e da insulina. Essa ligação demonstra uma importante relação entre os dois hormônios, com destaque para a regulação hipotalâmica do peso corporal (Hegyi et al., 2004). Os receptores *Ob-Ra*, *c* e *d*

possuem domínio intracelular incapaz de sinalizar pelas vias STATs, e por isso ainda são obscuros os mecanismos de sinalização (Huang e Li, 2000; Yamashita et al., 1998).

A leptina leva informações para o cérebro sobre a quantidade de energia armazenada em forma de gordura e também determina mudanças no comportamento alimentar e gasto energético, a fim de manter a homeostase energética e a quantidade de reservas compatíveis com a vida (Negrão et al., 1998; Ahima et al., 1996).

Nesse sentido, a leptina age no hipotálamo, provavelmente através de duas vias: uma através do órgão subfornicial e outra através do núcleo arqueado (Arc) (Elmqvist et al., 1999; Schwartz et al., 2000; Smith et al., 2009). O Arc é provido de duas populações de neurônios: os orexígenos (subpopulação 1), que basicamente secretam o NPY (neuropeptídeo Y) e o AgRP (proteína relacionada ao agouti); e os anorexígenos (subpopulação 2), que secretam o CART (transcrito regulado por cocaína e anfetamina) e o α -MSH (hormônio estimulante de melanócitos alfa), derivado do POMC (pró-opiomelanocortina). Uma série de sinais em resposta à ingestão ou à privação de alimentos é capaz de se ligar a receptores nessas duas populações de neurônios, de forma a regular a ingestão de alimentos e/ou o gasto energético. A leptina exerce diferentes ações nessas regiões hipotalâmicas (Bouret e Simerly, 2004). A ligação da leptina ao Ob-Rb nos neurônios orexígenos inibe a atividade dessas células e reduz a liberação de NPY e AgRP; por outro lado, a leptina estimula a atividade dos neurônios anorexígenos, aumentando a liberação de α -MSH e CART. Dessa forma, situações que aumentam a concentração plasmática de leptina levam à inibição dos neurônios NPY/AgRP e à estimulação dos neurônios α -MSH/CART, causando diminuição da ingestão alimentar. Já situações em que ocorre diminuição na concentração de leptina os neurônios anorexígenos não suficientemente estimulados e os neurônios orexígenos deixam de ser inibidos, levando ao aumento da ingestão alimentar (Bouret e Simerly, 2004).

Tanto neurônios orexígenos (NPY e AgRP), como os anorexígenos (POMC e CART) projetam-se para células contendo MCH ou orexina (ORX) na área hipotalâmica lateral (LHA), que modula os comportamentos necessários para a manutenção do equilíbrio energético, dentre os quais inclui-se o comportamento

de busca de água e alimentos. Assim, o MCH mostra-se como via final da ação da leptina sobre o neuro-eixo, informando-o das necessidades energéticas do indivíduo (Elias et al., 1999; Elias et al., 1998a; Sawchenko, 1998).

Estudos recentes como o de Williamson-Hughes et al., (2005) sugeriram que a leptina poderia atuar no eixo reprodutor, em neurônios GnRH, via neurônios que expressam o MCH, que por sua vez, também expressam receptores Ob-Rb, ao contrário dos neurônios GnRH que não expressam esse tipo de receptor para leptina. Dessa forma, o MCH indiretamente pode ser um circuito neuroanatômico potencial pelo qual a leptina regula a atividade do GnRH.

O MCH é um potente neuropeptídeo orexígeno (Qu et al., 1996; Rossi et al., 1997; Tritos e Maratos-Flier, 1999), produzido por neurônios localizados na LHA e na área incerto-hipotalâmica (IHx) (Bittencourt et al., 1992; Sita et al., 2007), sendo um potencial sinal de integração entre estado energético e função reprodutiva (Kokkotou et al., 2001; Thong e Graham, 1999; Tritos e Maratos-Flier, 1999).

Nahon et al. (1989) e Vaughan et al. (1989) através do isolamento do MCH do hipotálamo do rato delimitaram as regiões imunorreativas ao MCH e definiram sua estrutura como sendo cíclica e composta por 19 aminoácidos, diferenciando do MCH do salmão (sMCH) em dois aminoácidos da porção amino-terminal e quatro substituições.

Quanto a sua distribuição temos que todo o neuro-eixo, com exceção do cerebelo e a maioria dos núcleos motores do tronco encefálico, recebem em maior ou menor grau, fibras ir MCH oriundas de pericários localizados no diencéfalo, cuja distribuição é feita por meio do fascículo prosencefálico medial (Bittencourt e Elias, 1992; Bittencourt et al., 1990; Nahon et al., 1989).

Ainda o MCH pode ser encontrado em vários outros órgãos, como: pulmão, tireóide, baço, trato gastrointestinal e em destaque no encéfalo que é responsável pela expressão de 98% do peptídeo (Nahon et al., 1993).

Desde sua descoberta atribui-se ao MCH uma ampla gama de funções. Dentre elas podemos citar: mudanças adaptativas na pigmentação em peixes, anfíbios e répteis (Kawauchi et al., 1983), modulação da liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Bluet-Pajot et al., 1995), regulação osmótica (Presse e Nahon, 1993), regulação de água e eletrólitos do meio interno (Parkes e Vale,

1993; Presse et al., 1996), modulação da retenção de memória (Monzon et al., 1999), redução da ansiedade (Monzon et al., 2001), envolvimento na integração sensório-motora (Miller et al., 1993), integração de processos complexos associados à resposta emocional, cognição e excitação geral (Baker, 1994; Nahon, 1994), participação no controle da ingestão alimentar e do balanço energético (Bahjaoui-Bouhaddi et al., 1994; Flier e Maratos-Flier, 1998; Presse et al., 1996; Qu et al., 1996), participação da regulação do peso corporal mediando mudanças nos níveis de hormônios circulantes (Kokkotou et al., 2001; Tritos e Maratos-Flier, 1999), participação nos circuitos que controlam o comportamento de procura de alimentos (Casatti et al., 2002), participação em circuitos autonômicos e somatomotores (Elias e Bittencourt, 1997), envolvimento no controle de comportamentos motivados (Elias et al., 2008; Sita et al., 2007) e participação nas funções materna e reprodutiva (Chiocchio et al., 2001; Knollema et al., 1992; Parkes e Vale, 1993).

Em relação a função reprodutiva, estudos apontam que fibras imunorreativas ao MCH se projetam para cerca de 85 a 90% dos neurônios GnRH na área pré-óptica medial e área hipotalâmica anterior em rato, e cerca de 50 a 55% dos receptores MCHR1 são expressos em neurônios GnRH (Williamson-Hughes et al., 2005). Estes achados apresentam provas de uma possível via neuroanatômica direta pela qual o MCH pode desempenhar um papel importante na regulação da função neuronal do GnRH.

Muitos estudos demonstram que o MCH pode afetar a secreção de LH. A administração intracerebroventricular (icv) de MCH inibe a secreção de LH na presença de baixos níveis de estrogênio (Tsukamura et al., 2000). Tal hormônio estaria presente durante o estado de balanço energético negativo e supressão da função reprodutiva (Smith e Grove, 2002).

Em contrapartida, outros estudos mostraram que o MCH estimula a liberação de LH, em condições de elevados níveis de estrogênio, podendo induzir a um aumento súbito de LH (Chiocchio et al., 2001; Gonzalez et al., 1997; Murray et al., 2000a, 2000b).

Assim, os efeitos do MCH sobre a secreção de GnRH e LH é bimodal, ou seja, é estimulatória na presença de altos níveis de estrogênios (Chiocchio et al.,

2001; Gonzalez et al., 1997; Murray et al., 2000a, 2000c), e inibitória na presença de baixos níveis desse mesmo hormônio (Tsukamura et al., 2000).

Tanto fibras MCH como receptores MCHR1 estão localizadas em áreas cerebrais que contém GnRH, embora os efeitos diretos da projeção de MCH sobre a atividade neuronal do GnRH não seja bem estabelecida (Williamson-Hughes et al., 2005).

Assim, o MCH pode ter tanto ações diretas quanto indiretas sobre o GnRH, podendo também, refletir uma dupla ação (inibitória e/ou estimulatória) do MCH em neurônios GnRH e na liberação de LH (Chiocchio et al., 2001; Williamson-Hughes et al., 2005).

Vale lembrar que os efeitos da leptina sobre neurônios MCH também podem ser indiretos, através de ações em neurônios do núcleo arqueado que secretam NPY (Cowley et al., 2001), que se projetam diretamente aos neurônios MCH (Broberger et al., 1998; Elias et al., 1998b).

Neurônios MCH parecem ser muito sensíveis aos sinais periféricos de balanço energético como a leptina. Durante estados de balanço energético negativo, os baixos níveis de leptina resultariam em expressão aumentada de MCH, que pode ser um sinal importante para suprimir a atividade neuronal de GnRH. Reciprocamente, a administração de leptina suprime a expressão de MCH e diminui o efeito inibitório do mesmo em neurônios GnRH, restabelecendo assim a secreção de LH. No momento, ainda não é claro como este circuito age na regulação da função reprodutiva em condições normais, bem como durante as disfunções metabólicas (Williamson-Hughes et al., 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

*"Sem a curiosidade que me move,
que me inquieta,
que me insere na busca,
não aprendo nem ensino".*

(Paulo Freire)

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizadas 67 ratas fêmeas da linhagem *Sprague-Dawley*, com idade inicial de dois meses, pesando aproximadamente 200 g, todas em fase reprodutiva. Esses animais foram criados no Biotério do Departamento de Anatomia e mantidos em ambiente controlado, a temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, ciclo claro/escuro (12/12 h), sendo as luzes apagadas às 7 h, e acesas às 19 h, em gaiolas individuais de acordo com o padrão de dieta (ração balanceada padrão para camundongos e ratos – Nuvilab, São Paulo/SP), atividade física e água *ad libitum*. O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do ICB/USP (105/2008). (ANEXO A).

Os animais foram acompanhados por um período de dez semanas, conforme ilustrado na figura 2.

Figura 2: Desenho experimental. Ilustração esquemática do presente estudo, 2009.

Para maior compreensão a descrição do desenho experimental é mostrada no quadro 2.

Quadro 2: Descrição do desenho experimental.

SEMANAS	ATIVIDADES	
15 dias	Aquisição dos animais e monitoramento do ciclo estral.	
1ª semana	Adaptação à inversão do ciclo e monitoramento do ciclo estral.	
2ª semana	Monitoramento do ciclo estral e adaptação em esteira (4 dias) ergométrica adaptada com velocidade de 0,3 Km/h com duração de 10 minutos diários; Teste de esforço máximo (último dia da semana – 5º dia); Pesagem dos animais.	
3ª semana	Distribuição dos animais em grupos homogêneos segundo peso e teste de esforço máximo.	
	GRUPOS SEDENTÁRIOS	GRUPOS TREINADOS:
	- Monitoramento do ciclo estral e do consumo de ração.	- Adaptação ao treinamento físico dos grupos exercitados (TR e TA) com duração de 15 a 30 minutos com aumento progressivo da carga, nos três primeiros dias da semana 1 vez/dia e nos dois últimos dias da semana 2 vezes/dia e controle consumo de ração; - Pesagem semanal dos animais.
4ª semana	- Monitoramento do ciclo estral e do consumo de ração	- Treinos dos grupos exercitados (TR e TA) com duração de 20 a 40 minutos com aumento progressivo da carga, sendo realizado 2 vezes/dia. Monitoramento do ciclo estral e restrição alimentar (1ª semana de protocolo experimental propriamente dito); - Pesagem semanal dos animais.
5ª semana	- Monitoramento do ciclo estral e início da restrição alimentar para o grupo SR (1ª semana de protocolo experimental propriamente dito);	- Treinos dos grupos exercitados (TR e TA) com duração de 40 a 55 minutos com aumento progressivo da carga, sendo realizado 2 vezes/dia. Monitoramento do ciclo estral e restrição alimentar (2ª semana de protocolo experimental propriamente dito); - Pesagem semanal dos animais.

6^a a 8^a semanas	- Monitoramento do ciclo estral e restrição alimentar para o grupo SR (2 ^a a 4 ^a semana de protocolo experimental propriamente dito)	- Treinos dos grupos exercitados (TR e TA) com duração de 60 minutos com aumento progressivo da carga, sendo realizado 2 vezes/dia. Monitoramento do ciclo estral e restrição alimentar (3 ^a a 5 ^a semanas de protocolo experimental propriamente dito); - Pesagem semanal dos animais.
semana	- Monitoramento do ciclo estral e restrição alimentar (5 ^a semana de protocolo experimental propriamente dito);	- Última pesagem dos animais (TA e TR); - Perfusão transcardíaca (n=6/grupo) período da manhã, com coleta de encéfalo, ovários e útero; - Decapitação (n=6/grupo) período da tarde, com coleta de tecidos e sangue.
10^a semana	- Última pesagem dos animais (SA e SR); - Perfusão transcardíaca (n=6/grupo) período da manhã, com coleta de encéfalo, ovários e útero; - Decapitação (n=6/grupo) período da tarde, com coleta de tecidos e sangue.	- Microtomia dos encéfalos animais TA e TR.
11^a semana	- Microtomia dos encéfalos animais SA e SR.	-

Nas semanas seguintes procedeu-se: análises dos dados metabólicos, hibridização *in situ*, análises neuroquímicas dos cortes encefálicos, radioimunoensaio, microtomia dos ovários e úteros, análises histológicas dos ovários e úteros e análises estatísticas.

3.2 Experimento I: Efeitos dos tratamentos (TFI x RA)

Os animais foram designados aleatoriamente, segundo peso e teste de esforço máximo em esteira ergométrica rolante adaptada para roedores (Master – Imbramed/RS/BR), com intensidade e minutos monitorados, sendo assim,

agrupados de forma a manter os grupos com características semelhantes, desta forma, os grupos foram distribuídos da seguinte forma:

Animais Sedentários:

- Grupo SA (n=12): ratas sedentárias alimentadas com ração *ad libitum* de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition- AIN-93;
- Grupo SR (n=12): ratas sedentárias, com restrição alimentar de 50% em relação ao consumo do grupo SA.

Animais Exercitados:

- Grupo TA (n=12): ratas treinadas alimentadas com ração *ad libitum*, de acordo com as recomendações do AIN-93;
- Grupo TR (n=12): ratas treinadas, com restrição alimentar de 50% em relação ao consumo do grupo TA. Houve a perda de dois animais deste grupo, restante um n de 10 ao final protocolo experimental.

3.3 Monitoramento do consumo de ração

A ração foi pesada todos os dias, subtraindo a sobra do dia anterior. Este procedimento foi feito sempre no mesmo horário pela manhã.

Ao grupo restrito era oferecido 50% da quantidade de ração consumida no dia anterior pelo grupo alimentado *ad libitum*. Para pesagem da ração foi utilizada a balança digital (Marte, modelo LC-10, carga mínima de 50 g, com três casas decimais).

3.4 Treinamento físico

Anteriormente ao início do treinamento físico e ao teste de esforço, as ratas foram submetidas a um período de adaptação, por uma semana. A velocidade no período de adaptação foi de 0,3 km/h com duração de 10 minutos uma vez ao dia.

Antes do início do treinamento físico foi realizado um teste de esforço, tal teste serviu de base para prescrição do treinamento físico para os grupos treinados e para divisão dos grupos. O teste consistiu em corrida dos animais em esteira ergométrica adaptada para roedores (Master-Inbramed) (que comporta 8

animais) (Figura 1) a 0,3 Km/h por 3 minutos, sendo esta carga incrementada em 0,3 km/h a cada 3 minutos até que o animal atingisse a exaustão (Brooks e White, 1978). O tempo de teste e a velocidade da última carga foram anotados e serviram para determinar a capacidade de exercício de cada grupo experimental.

Após os testes de esforço, a divisão das ratas por grupo obedeceu a uma distribuição homogênea de acordo com o rendimento no teste.

A carga do treinamento físico foi progressiva, e calculada com base no teste de esforço, considerando que os animais alcancem 85% do esforço máximo.

Figura 3: Ratos na esteira ergométrica. Fotografia dos animais experimentais submetidos ao treinamento físico em esteira ergométrica adaptada para roedores (Master – Imbramed), no Laboratório de Neuroanatomia Química – ICB-III/USP, 2009.

Os grupos TA e TR foram submetidos ao treinamento físico por 1 hora, duas vezes ao dia, obedecendo a um intervalo mínimo de 4 horas entre um treino e outro, sendo realizado cinco vezes por semana, durante o período de 5 semanas (Santos et al., 2011). Na 1ª semana de treinamento foi realizado um período de adaptação, iniciando-se com 15 minutos de exercício na 2ª feira, aumentando 5 minutos por dia, até 30 minutos na 6ª feira, com uma velocidade inicial de 11,3 metros por minuto (m/min), sendo que os animais treinaram 2 vezes por dia nos dois últimos dias da semana, sendo assim até o final do protocolo experimental. Na segunda semana iniciaram um treino de 20 minutos sendo incrementado em 5 minutos a cada dia. Ao final da semana

treinaram 40 minutos. Na terceira semana iniciaram com treino de 40 minutos com progressão a 55 minutos no final da semana. A partir da quarta semana até o final do experimento, os animais treinaram 60 minutos diários atingindo 85% do esforço máximo atingido no teste de esforço, considerado um treinamento de intensidade intensa. A velocidade da esteira foi aumentada gradativamente a cada semana até 15,42 m/min, da quarta até a sétima semana de treinamento físico, correspondendo à velocidade máxima atingida pelos animais no teste de esforço máximo. O protocolo de treinamento físico apresenta-se no ANEXO A.

Vale ressaltar que todo o experimento foi realizado no período ativo dos animais, ou seja, o período noturno, pela inversão do ciclo claro/escuro.

3.5 Peso corporal

A avaliação do peso corporal foi realizada com auxílio de balança digital (Marte, modelo LC-10, carga mínima de 50 g, com três casas decimais), os animais foram pesados semanalmente no início do experimento, durante as cinco semanas de treinamento físico e no dia do sacrifício.

3.6 Determinação do ciclo estral

O ciclo estral dos animais foi acompanhado por um período médio de 15 dias antes do início do experimento, e apenas as ratas que apresentaram dois ciclos estrais regulares foram utilizadas neste estudo (Freeman, 2006; Marcondes et al., 2002).

Para determinação do ciclo estral utilizou-se a técnica de esfregaço vaginal, que consiste na introdução de uma pipeta de plástico no canal vaginal para a aplicação e imediata coleta de um pequeno volume de salina (Marcondes et al., 2002). O líquido coletado foi colocado em lâminas de vidro e observado no microscópio com aumento de 10x para a avaliação do perfil das células presentes. Pelo tipo de célula predominante foi possível identificar a fase que a rata se encontrava em seu ciclo estral (Freeman, 2006; Tanaka et al., 2000). Caso houvesse a presença de três tipos celulares (células epiteliais, leucócitos e células cornificadas) a fêmea se encontrava em metaestro (diestro I), na

predominância de leucócitos a fêmea se encontrava no diestro (diestro II); na predominância de células nucleadas epiteliais caracterizava o proestro e o estro foi caracterizado pela grande quantidade de células cornificadas (descamadas). Vale ressaltar que durante todo o experimento, foi monitorado o ciclo estral das ratas. Este procedimento foi realizado todos os dias e sempre no período da manhã entre 8:00 e 9:00 horas para que se respeite as diferentes fases do ciclo estral (Freeman, 2006; Marcondes et al., 2002).

3.7 Sacrifício dos animais e preparação dos tecidos

Uma metade dos animais (n=23 total) (n=6/grupo experimental) foi submetida à perfusão transcardíaca. Primeiramente esses animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução anestésica aquosa composta de xilasina (2,3 g/100 ml), ketamina (1,16 g/10 ml) e acepromazina (10 mg/1 ml) (foram injetados 0,3 ml/100 gr de peso corporal). A seguir, foram perfundidos inicialmente com solução salina 0,9% (100 ml em 1 minuto) e posteriormente com fixador a 4% de formaldeído (a partir de paraformaldeído quando a solução é aquecida a 60-65 °C) (LabSynth, Diadema – BR) e 3,8% de bórax (LabSynth, Diadema – BR) pH 9,5 a 4 °C (700-900ml em 25 minutos).

Os encéfalos dos animais foram retirados da caixa craniana e pós-fixados na mesma solução fixadora acrescida de 20% de sacarose (LabSynth, Diadema – BR) por período de 12 h a 18 h a 4 °C e em seguida colocados em solução de 1XPBS (tampão fosfato de sódio 10mM e NaCL 140mM, Sigma) com 20% de sacarose para crioproteção até o momento da microtomia. Os encéfalos foram cortados no plano frontal, em micrótomo de congelção, na espessura de 30µm em 5 séries de 1 em 5 e armazenados em solução anti-congelante (30% de etilenoglicol e 20% de glicerol em 1XPBS) à temperatura de -30 °C. O material foi processado com cuidado para não haver contaminação com RNase.

A outra metade dos animais (n=23 total) (n=6/grupo experimental, com exceção do grupo TR n=5) foi sacrificada por decapitação*, utilizando-se uma guilhotina apropriada. Não foi utilizado qualquer tipo de anestesia antes ou

* Para maior compreensão do modelo de estudo, esses dados foram analisados em colaboração com o Laboratório de Lípidos, no ICB-I da USP, o qual forneceu dados do perfil inflamatório do TAB, e do metabolismo de lipídios hepático.

durante o sacrifício. Tal procedimento foi realizado de forma rápida, visando minimizar qualquer forma de sofrimento ou estresse, por parte dos animais.

Foram retirados dos animais: encéfalo, sangue, TAB (visceral), tecido adiposo marrom (TAM) (subescapular), ovários e útero.

Os encéfalos dos animais foram retirados da caixa craniana, pesados em balança analítica com precisão de 4 casas decimais (Scientech), e imediatamente embrulhados um a um em papel alumínio, já devidamente identificados, e congelados em nitrogênio líquido.

As amostras de sangue (aproximadamente 5 ml) para o radioimunoensaio foram extraídas por inversão do animal, após a decaptação para escoamento do sangue em tubo *Falcon*, portanto, por gravidade, sem a presença de anticoagulante e, posteriormente, centrifugado (4 °C, 4000 rpm, 15 min) para obtenção de sua porção sérica. As amostras de soro para cada determinação foram armazenadas individualmente em microtubos do tipo *Eppendorf* (200 µl cada) em freezer a -20 °C até o momento da análise.

TAB e TAM foram colhidos, pesados em balança analítica com precisão de 3 casas (Scientech), e embrulhados um a um em papel alumínio, já devidamente identificados, e congelados em nitrogênio líquido.

Desde a dissecação de todos os tecidos até o congelamento transcorreu-se no máximo cinco minutos. Todos os tecidos foram armazenados em freezer -80°C para futuras análises.

3.8 Radioimunoensaio (RIA)

As dosagens hormonais foram determinadas por radioimunoensaio a partir de kits comerciais: leptina (Crystal Chem Inc), estradiol (Coat-a-Count/SIEMENS), progesterona (Coat-a-Count/SIEMENS). Em relação ao LH e FSH, a dosagem foi gentilmente realizada no laboratório do Dr. Celso R. Franci (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), utilizando-se kits específicos de radioimunoensaio fornecidos pelo National Hormone and Peptide Program (Harbor-UCLA Medical Center, EUA). Os padrões foram LH-RP3 e FSH-RP2, os limites mínimos de detecção foram 0,05 ng/mL e 0,2 ng/mL e os coeficientes de variação intra-ensaio foram 4% e 3%, respectivamente, para o LH e FSH.

Foram utilizados kits contendo todos os reagentes necessários (anticorpos, curva-padrão, amostras de referência, solução tampão e antígenos radioativos), marcados com o radioisótopo I^{125} . A leitura das amostras foi feita em um contador de cintilação gama (Packard TRI-CARB 2100TR, USA), durante 1 minuto. Os valores foram “plotados” em uma curva *log-linear*, obtida a partir da contagem da curva-padrão.

3.9 Hibridização *in situ* com enxofre radioativo (^{35}S)

A técnica de hibridização *in situ* com ^{35}S foi utilizada para localização e quantificação de RNA mensageiros de interesse. Foi tomado cuidado para que todas as soluções utilizadas nesta metodologia estivessem livre de RNase ou tivessem sido preparadas a partir de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e auto-clavadas. Vale ressaltar que durante a perfusão transcardíaca tomou-se o mesmo cuidado para não haver contaminação com RNase. Os plasmídeos contendo os cDNAs para o peptídeo MCH foram gentilmente cedidos pelo Dr. Paul Sawchenko (The Salk Institute, La Jolla, CA, EUA), foram linearizados através da enzima de restrição Hind III, conforme orientação do laboratório de origem, e isolados com Fenol-Clorofórmio-Isoamilálcool. As sondas foram geradas a partir de transcrição *in vitro*, utilizando ^{35}S -UTP e uma polimerase específica para o plasmídeo (T7, Promega, Madison, EUA). As sondas foram purificadas em microcolunas de resina (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), após a digestão com RQ1 DNase (Promega), quando, então, foram diluídas em solução de hibridização (10^6 cpm/mL). A solução de hibridização consistiu de 50% formamida (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA), 0,01% de SDS, 0,01% de Na Thio, 0,2% de 5 m ditioneitol (DTT), 10mm Tris-HCl (Gibco-BRL, Rockville, EUA), 0,01% DNA de esperma de salmão, 0,01% RNAt de levedura, 0,05% RNA total de levedura (Sigma), 10 mm DTT, 10% sulfato de dextran, 0,3 m cloreto de sódio (NaCl), 1 mm ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, pH 8,0) e 1 × solução de Denhardt (Sigma, St. Louis, EUA).

Previamente à hibridização, os tecidos foram montados em lâminas SuperFrost plus (Fisher Scientific) e pré-tratados, o que consistiu nas etapas de: 1) fixação em 4% de formaldeído em 0,1 m PBS por 5 min; 2) desproteinização

com proteinase K (10 mg/mL em solução contendo tampão 0,05 M EDTA e 0,1 M Tris em pH 8 por 30 min a 37 °C); 3) acetilação com solução de TEA-HCl contendo 0,25% de anidrido acético por 10 min; 4) desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 95% e 100% 1 min cada); 5) deslipidificação em xilol (15 min) e rápida reidratação em álcool etílico 100% e 95%. Após essa etapa, cada lâmina com o tecido pré-tratado recebeu 100 µL da solução de hibridização contendo a sonda marcada com ³⁵S-UTP e uma lamínula flexível para sua cobertura, onde permaneceu incubada a 56 °C por aproximadamente 16 horas na estufa de hidratação. Para tanto, utilizamos bacias de acrílico com papel filtro umedecido com 4x SSC/50% formamida, para acondicionar as lâminas.

No dia seguinte, procedeu-se o procedimento de pós-hibridização, sendo as lamínulas removidas por meio de banho em tampão 2 x SSC, quando, então, a série foi incubada em solução com 0,002% de RNase A (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemanha) em 0,5 M NaCl, 10mM Tris-HCl e 1mM EDTA (pH 8), durante 30 min. Posteriormente, as lâminas passaram por banhos de estrigência crescente com SSC (2 x SSC a 50°C por 1 hora, 0,2 x SSC a 55 °C por 1 hora e 0,2 x SSC a 60 °C por 1 hora, sempre com adição de 0,02% de 5 M DTT). Finalmente, o tecido foi desidratado em 92 álcool etílico a 70% + 0,02 x SSC + 0,02% de 5 M DTT. As lâminas foram deixadas secar a temperatura ambiente. Após foram transferidas para cassetes e em sala escura foram colocadas em contato com filme autoradiográfico (BMR-2, Kodak, Rochester, EUA) por aproximadamente 36 horas.

Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em emulsão autoradiográfica líquida (NTB2, Kodak) para a detecção do sinal, deixadas secar por 3 horas a 37 °C e armazenadas a 4 °C em caixas protegidas da luz e com dessecadores durante cerca de 7 dias. Depois, as lâminas foram reveladas com revelador D-19 (Kodak), os cortes foram contra-corados com tionina, desidratados, deslipidificados com xilol, sendo finalizada com lâminas utilizando-se DPX como meio de montagem.

3.10 Experimento II: Efeitos dos tratamentos (TFI x RA) em animais na fase lútea do ciclo estral

Para melhor entender a relação do MCH e leptina durante o ciclo estral, foi preciso realizar outro delineamento experimental (ANEXO 2), uma vez que, tanto as análises hormonais, quanto as análises histologias ovariana e uterina deveriam ser analisadas com os animais na mesma fase do ciclo estral. Como os animais do grupo TR entram em anestro a partir da quarta semana de experimento, e assim também, ao final do mesmo os animais do grupo SR entram em anestro, fizemos outro experimento, no qual todos os animais foram sacrificados em diestro.

Dessa maneira, definimos um novo delineamento experimental considerando os seguintes pontos:

- Pico da ingestão alimentar: cerca de 4 horas após ciclo escuro (Presse et al., 1996);
- Pico da expressão do RNAm do ppMCH: cerca de 2 horas após ciclo escuro (Rossi et al., 1997);
- Durante as cinco primeiras horas do ciclo escuro os animais não sofreram nenhuma manipulação, estando no momento de maior ingestão alimentar, nas quatro primeiras horas e uma hora a mais foi respeitada para o restabelecimento das concentrações basais hormonais;
- O treinamento físico intenso, o controle de consumo de ração e o monitoramento do ciclo estral se deram sempre após as cinco primeiras horas do ciclo estral;

Para tanto foram utilizadas 19 ratas distribuídos nos grupos experimentais e sacrificados por perfusão transcardíaca, sendo analisados os mesmo parâmetros do experimento anterior como descrito no item Materiais e Métodos.

Porém, vale ressaltar que os animais do grupo TA, foram treinados até o proestro, permanecendo em repouso de 48 horas (estro e metaestro) até o sacrifício no dia do diestro. Assim, foram respeitados às 48 horas após a última sessão de treinamento físico, sendo o sacrifício sempre, com o início no mesmo horário para evitar a discrepância dos resultados decorrentes da variação circadiana e aqueles da última sessão de treinamento físico.

Animais Sedentários:

- Grupo SA (n=5): ratas sedentárias alimentadas com ração *ad libitum* de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition- AIN-93;
- Grupo SR (n=6): ratas sedentárias, com restrição alimentar de 50% em relação ao consumo do grupo SA.

Animais Exercitados:

- Grupo TA (n=4): ratas treinadas alimentadas com ração *ad libitum*, de acordo com as recomendações do AIN-93;
- Grupo TR (n=4): ratas treinadas, com restrição alimentar de 50% em relação ao consumo do grupo TA.

Destes animais foi coletado o encéfalo de cada animal para a técnica de hibridização *in situ* do ppMCH. Também foram coletados, os ovários e úteros, que foram pesados em balança analítica com precisão de 3 casas decimais (Scientech), sendo posteriormente fixados em formalina a 10% neutra e tamponada. Posteriormente foram lavados em álcool a 70% e submetidos às técnicas histológicas de rotina: inclusão em parafina. Os ovários e úteros foram submetidos à microtomia seriada com cortes de 5 μ m de espessura, a cada 20 secções histológicas foram selecionados cinco cortes de cada ovário e útero, totalizando 10 secções/animal, as quais foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H-E) segundo (Talosa et al., 2003).

As análises morfológicas e morfométricas foram realizadas em microscopia óptica de luz. Na área total abrangida pela secção histológica ovariana, foi quantificado o número total de folículos primordiais, o número total de folículos maduros, o número total de corpos lúteos, corpos Albicans e hemorrágicos, como também a presença e número de cistos (Freeman, 2006). Para cada variável foi obtida a média das secções. Da secção uterina foram tomadas duas medidas, a espessura do miométrio, em pontos eqüidistantes e a circunferência do endométrio.

3.11 Coloração com Hematoxilina e Eosina (Ovários e Úteros)

Após a microtomia os cortes ovarianos e uterinos foram colocados em água fria e submetidos ao banho Maria ($\sim 42^{\circ}\text{C}$) para esticar e serem fixados em lâminas, as quais foram colocadas em estufa por no mínimo 24 h, a 60°C para retirada do excesso de parafina. A seguir as lâminas foram desparafinadas em lavagens de 30 minutos cada em xilol I, II e III em temperatura de aproximadamente 60°C . Esperou-se as lâminas esfriarem por 5 minutos e seguiu-se com lavagens (2x5 min) em álcool absoluto (100%), (2x5 min) em álcool 95%, e (1x5min) em álcool 85% e 70%, respectivamente.

Posteriormente as lâminas foram lavadas por aproximadamente 3 minutos em água corrente para retirada do excesso de álcool, sendo em seguida mergulhadas em hematoxilina de Harris (~ 2 min), retirando o excesso com água corrente (~ 5 min) e mergulhadas em eosina de Putt por 1 minuto retirando novamente o excesso com água corrente (~ 2 min). Seguiu-se a desidratação dos cortes, passando as lâminas (2x2 min) em álcool 95%, (2x2 min) em álcool absoluto (100%), (1x2 min) em álcool/xilol 50%, (1x2 min) em xilol I, II e III, sendo as lâminas cobertas com lamínulas usando DPX como meio de montagem.

3.12 Análise dos dados

A análise do RIA, como em qualquer ensaio com ligantes, compreendeu a construção de curva de calibração, interpolação dos resultados e controle de qualidade.

A histologia ovariana foi analisada com auxílio de um microscópio Quimis/Leica, modelo Q. 106-1, onde foram avaliados os estádios de desenvolvimento ovariano, sendo considerado folículo primordial (quando o folículo possui uma camada de células epiteliais achatadas em torno do oócito), folículo maduro (também chamado folículo de Graaf, esse folículo tem uma grande cavidade e o ovócito envolto por células), corpo lúteo (células com núcleo picnótico, cromatina condensada, com citoplasma em degeneração natural, vacuolizado), corpo albicans (massa cicatricial de tecido conjuntivo denso, oriunda da degeneração do corpo lúteo), corpo hemorrágico (estrutura de consistência

friável semelhante a um coágulo que surge no local do folículo rompido) e cistos (células da granulosa com estrógeno ao centro).

Para a mensuração das camadas uterinas (endométrio e miométrio) foi realizada a análise com auxílio de um microscópio Quimis/Leica, modelo Q. 106-1 e com o uso do programa Image Pro Plus® versão 6.3. Para a aquisição de imagens e fotomontagens ovarianas e uterinas foi utilizado o módulo Virtual Slice do Programa Neurolúcida (MBF/Williston/VT-USA), sendo o programa Adobe Photoshop 7.0 usado para combinar as fotomicrografias em pranchas.

Para os dados da hibridização *in situ*, os cortes histológicos foram observados em microscópio contendo campo claro e campo escuro. Foi realizada a análise dos resultados por meio da quantificação da densidade óptica integrada (IOD) dos grãos de prata precipitados pela radioatividade na emulsão fotográfica. Para tanto, imagens em preto e branco e em campo escuro foram adquiridas sem o conhecimento dos grupos experimentais. Foi utilizado o programa Image Pro Plus® (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) para calcular a IOD da área selecionada com a marcação nas imagens capturadas em escala de cinza (avaliação dos pixels na escala de 0 a 255). Foi determinada a IOD da região de interesse e, deste valor, subtraiu-se a IOD da região adjacente sem marcação (background). A posição do quadro de contagem dentro de cada núcleo foi definida com o uso de referências adjacentes, e cada IOD teve seu tamanho estabelecido de acordo com os núcleos analisados, a saber, IHy, LHAt e LHAp.

As fotomicrografias foram adquiridas com uma câmera digital SPOT RT® (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, EUA), adaptada ao microscópio. O programa Adobe Photoshop 7.0 foi usado para combinar as fotomicrografias em pranchas. Apenas nitidez, contraste e luminosidade foram ajustados.

Todos os dados tanto do experimento I como do experimento II, foram submetidos à análise de comparação ANOVA *one-way*, considerando-se significativas às diferenças cujo $p < 0,05$. Quando encontradas diferenças significativas, procedeu-se à comparação das médias a partir do *post-hoc* de TUCKEY, mantendo-se a significância em $p < 0,05$. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa estatístico *GraphPad Prism* versão 5 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão médio (E.P.M.).

4 RESULTADOS

*" Ler não é decifrar,
escrever não é copiar".*

(Emília Ferreiro)

4.1 Experimento I: Efeitos dos tratamentos (TFI x RA).

4.1.1 Parâmetros biométricos

4.1.1.1 Variação total de peso corporal

Ao analisar a variação total de peso corporal (peso final – peso inicial em gramas) entre os grupos experimentais, podemos notar uma acentuada perda de peso do grupo TR, em relação aos demais, sendo esta diferença significativa. O grupo SR igualmente apresentou perda de peso. Já nos grupos SA e TA observamos aumento de peso, embora o grupo TA apresente menor peso quando comparado ao seu par sedentário, não sendo essa diferença significativa (Figura 4).

Figura 4: Diferença final de peso corporal. Variação do peso corporal dos grupos experimentais ao final do experimento, 2009. (Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão).

4.1.1.2 Evolução do peso durante as semanas do experimento

Em relação à evolução do peso corporal dos grupos experimentais durante o experimento, pode-se observar que os grupos submetidos à restrição alimentar

(SR e TR), apresentaram perda de peso acentuada nas primeiras quatro semanas, nas semanas posteriores o peso tendeu a se estabilizar. Já os grupos alimentados *ad libitum* (SA e TA) apresentaram ganho de peso progressivo até o final do experimento (Figura 5). O grupo SR apresentou redução de 24% do seu peso corporal quando comparado ao seu par alimentado (SA), já o grupo TR reduziu cerca de 30% o seu peso corporal quando comparado ao grupo TA.

Figura 5: Peso corporal. Evolução do peso corporal dos grupos experimentais durante o experimento, 2009. (Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão).

4.1.1.3 Peso dos tecidos (TAB, TAM, ovários e úteros) em valores percentuais (%) e absolutos (g)

Os pesos dos tecidos (TAB, TAM) e órgãos (ovários e útero) em valores percentuais (em relação ao peso corporal total) e absolutos (gramas) entre os grupos experimentais podem ser observados na tabela 1.

Podemos notar a diferença significativa entre os grupos restritos (TR e SR) em relação aos alimentados (TA e SA). O peso absoluto do TAB, ovários e úteros, apresentam diferença estatística significativa, o mesmo ocorre quando observamos os valores relativos dos mesmos tecidos. O grupo SR apresentou redução de 69%, 29% e 49%, no peso do TAB, ovários e úteros, respectivamente, quando comparado ao grupo SA. Já o grupo TR

apresentou redução de 94%, 31% e 55%, no peso do TAB, ovários e úteros, respectivamente, quando comparado ao grupo TA.

Tabela 1- Peso absoluto e relativo do TAB, ovários e úteros dos grupos experimentais¹, 2009.

Tecidos	S.A	SR	TA	TR	P
VALORES ABSOLUTOS					
TAB ² (g)	7,83 ± 3,86 ^a	1,86 ± 1,45 ^b	9,28 ± 1,77 ^a	0,43 ± 0,21 ^b	0,00
TAM ³ (g)	0,37 ± 0,09 ^a	0,30 ± 0,08 ^a	0,33 ± 0,10 ^a	0,25 ± 0,03 ^a	0,12
Ovários (g)*	0,32 ± 0,07 ^a	0,18 ± 0,02 ^b	0,29 ± 0,06 ^a	0,16 ± 0,05 ^a	0,00
Úteros (g)	0,63 ± 0,20 ^a	0,26 ± 0,03 ^b	0,62 ± 0,20 ^a	0,21 ± 0,04 ^b	0,00
VALORES PERCENTUAIS					
% TAB ²	3,22±1,35 ^a	0,99±0,80 ^b	4,09±0,72 ^a	0,25±0,10 ^b	0,00
% TAM ³	0,16±0,03 ^a	0,16±0,04 ^a	0,14±0,05 ^a	0,15±0,03 ^a	0,86
% Ovários*	0,14±0,02 ^a	0,10±0,01 ^{a,b}	0,13 ± 0,04 ^{a,b}	0,09 ± 0,02 ^b	0,01
% Úteros	0,27±0,10 ^a	0,14±0,02 ^b	0,28±0,09 ^a	0,12±0,02 ^b	0,00

¹- Dados apresentados como média ± erro padrão; resultados com letras diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05); 2- Tecido adiposo branco; 3- Tecido adiposo marrom; *média das duas gônadas (ovários direito e esquerdo), (g) em gramas, (%) peso relativizado pelo peso corporal total.

Tanto para variação do peso corporal total (gramas), quanto em relação ao consumo de ração, os grupos TR e SR não apresentaram diferenças entre si, mas quando comparados a seus pares alimentados podemos notar as diferenças significativas (Tabela 2).

Tabela 2- Dados de variação de peso corporal final e consumo de ração nos grupos experimentais (*), 2009.

Grupos	Variáveis	
	Varição total de peso (g)	Consumo de ração (g)
SA	14,75±9,83 ^a	18,61±1,64 ^a
SR	- 40,35±10,34 ^b	10,10±0,02 ^b
TA	5,70±10,97 ^a	18,17±1,49 ^a
TR	- 70,89±22,49 ^c	9,45±0,02 ^b
P	0,00	0,00

(*) Valores apresentados em forma de média e erro padrão. Valores com letras diferentes representam diferença significativa (p<0,05).

4.1.2 Parâmetros dietéticos

4.1.2.1 Consumo de ração durante as semanas do experimento

Em relação ao consumo de ração (gramas) dos grupos experimentais durante o experimento, devido ao controle efetivo da ração, tendo os grupos restritos (TR e SR) recebido 50% de ração em relação ao consumo de seus pares alimentados (TA e SA), notamos a constância do consumo alimentar dos grupos restritos durante todo percurso do experimento, e observamos que a partir da terceira semana os grupos alimentados apresentaram um aumento no consumo alimentar, até o final do experimento (Figura 6).

Figura 6: Consumo médio de ração. Consumo de ração dos grupos experimentais durante o experimento, 2009. (Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão).

4.1.2.2 Consumo de ração de acordo com as fases do ciclo estral

Analisando o consumo alimentar dos animais alimentados *ad libitum* de acordo com as fases do ciclo estral, podemos notar que os animais na fase lútea (metaestro e diestro) do ciclo apresentam um consumo mais elevado, quando comparados as fases proliferativa (proestro) e ovulatória (estro). Sendo que não há diferença no consumo alimentar entre SA e TA na fase lútea, porém treinados

nas fases proliferativa ou ovulatória tem o consumo alimentar menor do que os sedentários na fase lútea do ciclo estral (Figura 7).

Figura 7: Consumo de ração de acordo com as fases do ciclo estral. Consumo de ração dos grupos experimentais durante o experimento, 2009. (Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão).

4.1.3 Parâmetros do eixo reprodutor

4.1.3.1 Ciclo estral

A representação do ciclo estral de cada animal dos grupos experimentais é ilustrada na Figura 8. Todas as ratas do grupo TR tiveram seu ciclo estral cessado desde a quarta semana de experimento, entrando em anestro permanente até o final do experimento, ou seja, em diestro, fase anovulatória, na qual as ratas não se encontram em período de procriação. Já as ratas dos grupos SA e TA e algumas do grupo SR, apresentam todas as fases do ciclo estral, incluindo estro e proestro, indicando um ciclo estral ativo. Mais tardiamente as ratas do grupo SR entraram também em anestro, ao final da última semana de experimento.

Figura 8: Ciclo estral. Representação gráfica do ciclo estral durante a última semana de experimento, 2009. O ciclo estral foi avaliado pelo tipo de células obtidas no esfregaço vaginal. O gráfico representa a fase do ciclo estral observada em cada um dos dias, de cada animal de cada grupo experimental, durante a última semana de experimento. E (estru); P (proestro); D (diestro); M (metaestro). Seta vermelha ressalta o diestro permanente nos animais do grupo TR.

4.1.3.2 Concentrações hormonais

4.1.3.2.1 Efeito dos tratamentos experimentais (TFI x RA)

Ao analisar as concentrações hormonais, podemos notar que apenas a progesterona (Fig. 9B) do grupo TA apresentou um valor mais elevado (78%) e diferente estatisticamente do grupo SR ($p < 0,01$). Em relação a leptina (Fig. 9E),

os animais em restrição alimentar (SR e TR), e o grupo TA apresentaram uma redução de 85% e 57%, respectivamente, nos valores quando comparados ao grupo SA ($p < 0,0001$) (Figura 9). Ao analisarmos a regressão linear simples, notamos que existe uma correlação ($R = 0,5194$) ($p < 0,0002$) entre quantidade de TAB e a concentração sérica de leptina. Desta forma, quanto menor a quantidade de TAB, menos leptina é produzida.

Figura 9: Dosagens hormonais, 2009. Concentração sérica de estradiol (A), progesterona (B), LH (hormônio luteinizante) (C), FSH (hormônio folículo estimulante) (D), leptina (E), Regressão linear simples (método ENTER) (TAB/leptina). Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. *Diferenças significativas encontradas.

4.1.3.2.2 Efeito dos tratamentos experimentais (TFI x RA) de acordo com as fases do ciclo estral

Ao analisar as dosagens hormonais de acordo com as fases do ciclo estral entre os grupos experimentais, encontramos diferença estatística nos valores dos hormônios progesterona (Fig. 10B), FSH (Fig. 10D) e leptina (Fig. 10E). Em relação à progesterona nota-se valor 80% menor no grupo SR em comparação ao grupo TA, ambos na fase lútea ($p < 0,05$). Para o FSH nota-se valores cerca de 84% menores nos grupos TA (fase lútea) e TR (fase lútea) em comparação ao grupo TA (fase ovulatória) ($p < 0,001$), e valores cerca de 74% menores no grupo SA (fase lútea folicular) em comparação ao grupo TA (fase ovulatória) ($p < 0,001$), e para o grupo SR (fase lútea) valores de aproximadamente 79% de redução, quando comparado também ao grupo TA (fase ovulatória) ($p < 0,001$). Para a leptina nota-se valores cerca de 83% menores nos grupos SR, TA e TR, todos em fase lútea, em comparação ao grupo SA (fase folicular) ($p < 0,05$). Ao observarmos os valores da razão entre leptina e TAB nota-se que o grupo TR apresentou valores cerca de 64% maiores que os grupos SA e SR, e cerca de 87% maior que o grupo TA (Figura 10).

Figura 10: Dosagens hormonais de acordo com as fases do ciclo estral, 2009. Concentração sérica de estradiol (A), progesterona (B), LH (hormônio luteinizante) (C), FSH (hormônio folículo estimulante) (D), leptina (E) e a razão entre tecido adiposo branco e leptina (F). SAFF (sedentário alimentado fase folicular), SRFL (sedentário restrito fase lútea), TAFO (treinado alimentado fase ovulatória), TAFL (treinado alimentado fase lútea) e TRFL (treinado restrito fase lútea). Considerado fase folicular (proestro), fase ovulatória (estro) e fase lútea (metaestro e diestro). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. *Diferenças significativas encontradas.

4.2 Experimento II: Efeitos dos tratamentos (TFI x RA) em animais na fase lútea do ciclo estral

4.2.1 Parâmetros biométricos

4.2.1.1 Variação total de peso corporal

Ao analisar a variação total de peso corporal (peso final – peso inicial em gramas) entre os grupos experimentais, no experimento de 2011, com animais sacrificados em diestro, podemos notar uma acentuada perda de peso dos grupos em restrição alimentar. Já nos grupos SA e TA observamos aumento de peso, embora o grupo TA apresente menor peso quando comparado ao seu par sedentário, não sendo essa diferença estatisticamente significativa (Figura 11).

Figura 11: Diferença final de peso corporal. Variação do peso corporal dos grupos experimentais ao final do experimento, 2011. (Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão).

4.2.1.2 Evolução do peso durante as semanas do experimento

Em relação à evolução do peso corporal dos grupos experimentais, pode-se observar que os grupos submetidos à restrição alimentar (SR e TR), apresentaram perda de peso acentuada nas primeiras quatro semanas, nas

semanas posteriores o peso tendeu a se estabilizar. Já os grupos alimentados *ad libitum* (SA e TA) apresentaram ganho de peso progressivo até o final do protocolo experimental (Figura 12). O grupo SR apresentou redução de 25% do seu peso corporal quando comparado ao seu par alimentado (SA), já o grupo TR reduziu cerca de 28% do seu peso corporal quando comparado ao grupo TA.

Figura 12: Peso corporal. Evolução do peso corporal dos grupos experimentais durante o experimento, 2011. (Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão).

Tanto para variação do peso corporal total (gramas), quanto em relação ao consumo de ração, os grupos TR e SR não apresentaram diferenças entre si, mas quando comparados a seus pares alimentados podemos notar as diferenças significativas (Tabela 3).

Tabela 3- Dados de variação de peso corporal final e consumo de ração nos grupos experimentais (*), 2011.

Grupos	Variáveis	
	Varição total de peso (g)	Consumo de ração (g)
SA	43,20 $\pm$ 3,13 ^a	20,80 $\pm$ 0,55 ^a
SR	- 40,00 $\pm$ 10,67 ^b	9,14 $\pm$ 0,01 ^b
TA	14,00 $\pm$ 5,35 ^a	23,08 $\pm$ 1,10 ^a
TR	- 62,50 $\pm$ 7,45 ^b	8,44 $\pm$ 0,007 ^b
P	0,01	0,0001

(*) Valores apresentados em forma de média e erro padrão. Valores com letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

4.2.2 Parâmetros dietéticos

4.2.2.1. Consumo de ração

Em relação ao consumo de ração (gramas) dos grupos experimentais durante o experimento, devido ao controle efetivo da ração, tendo os grupos restritos (TR e SR) recebido 50% de ração em relação ao consumo de seus pares alimentados (TA e SA), notamos a constância do consumo alimentar dos grupos restritos durante todo percurso do experimento, e observamos que a partir da terceira semana os grupos alimentados apresentaram um aumento no consumo alimentar, até o final do experimento, assim como, no experimento anterior (Figura 13).

Figura 13: Consumo médio de ração. Consumo de ração dos grupos experimentais durante o experimento, 2011. (Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão).

4.2.2.2 Consumo de ração de acordo com fase do ciclo estral.

Analisando o consumo alimentar dos animais alimentados *ad libitum* de acordo com as fases do ciclo estral, podemos notar que os animais na fase lútea (metaestro e diestro) do ciclo apresentam um consumo mais elevado, quando comparados as fases proliferativa (proestro) e ovulatória (estro). Sendo que não há diferença no consumo alimentar entre treinados e sedentários na fase lútea,

porém treinados nas fases proliferativa ou ovulatória tem o consumo alimentar menor do que os sedentários na fase lútea do ciclo estral, assim como, no experimento anterior (Figura 14).

Figura 14: Consumo médio de ração. Consumo de ração dos grupos experimentais durante o experimento, 2011. (Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão).

4.2.3 Parâmetros do eixo reprodutor

4.2.3.1 Ciclo estral

A representação do ciclo estral (última semana de protocolo experimental de 2011) de cada animal dos grupos experimentais é ilustrada na Figura 15. Assim como, no experimento anterior, todas as ratas do grupo TR tiveram seu ciclo estral cessado desde a quarta semana de experimento, entrando em anestro permanente até o final do experimento. Já as ratas dos grupos SA e TA e algumas do grupo SR, apresentam todas as fases do ciclo estral, incluindo estro e proestro, indicando um ciclo estral ativo. Mais tardiamente as ratas do grupo SR entraram também em anestro, ao final da última semana de experimento.

Figura 15: Ciclo estral. Representação gráfica do ciclo estral durante a última semana de protocolo experimental, 2011. O ciclo estral foi avaliado pelo tipo de células obtidas no esfregaço vaginal. O gráfico representa a fase do ciclo estral observada em cada um dos dias, de cada animal de cada grupo experimental, durante a última semana de experimento. E (estro); P (proestro); D (diestro); M (metaestro). Seta vermelha ressalta o diestro permanente nos animais do grupo TR.

4.2.4 Concentrações séricas de leptina

Para melhor entender a resposta da leptina em relação ao ciclo estral, analisamos a concentração sérica deste hormônio na fase lútea do ciclo. Dessa forma, podemos notar que os animais em restrição alimentar (SR e TR) apresentam menor concentração sérica de leptina, quando comparados aos seus pares alimentados (SA e TA) ($p < 0,0001$). Os animais em restrição alimentar SR e TR apresentaram uma redução de 60% e 76%, respectivamente, nos valores quando comparados ao grupos SA e TA ($p < 0,0001$) (Figura 16).

Figura 16. Dosagem hormonal, 2011. Concentração sérica de leptina. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. *Diferenças significativas encontradas.

4.2.5 Parâmetros anatômicos e histológicos (macro e microscópicos)

4.2.5.1 Peso dos tecidos (ovários e útero) em valores percentuais (%) e absolutos (g)

O peso dos órgãos (ovários e úteros) em valores percentuais (em relação ao peso corporal total), e absolutos (gramas) entre os grupos experimentais podem ser observados na tabela 4. Podemos notar a diferença significativa entre os grupos restritos (TR e SR) em relação aos alimentados (TA e SA), o peso absoluto dos ovários e úteros, apresenta diferença estatística significativa, o mesmo ocorre quando observamos os valores relativos dos mesmos tecidos, com exceção dos ovários que não apresentaram tais diferenças. O grupo SR apresentou redução de 33% e 37%, no peso dos ovários e úteros, respectivamente, quando comparado ao grupo SA. Já o grupo TR apresentou redução de 32% e 66%, no peso dos ovários e úteros, respectivamente, quando comparado ao grupo TA.

Tabela 4- Peso absoluto e relativo dos ovários e útero dos grupos experimentais¹, 2011.

Tecidos	S.A	SR	TA	TR	P
VALORES ABSOLUTOS					
Ovários (g)*	0,28 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,01 ^{b,c}	0,23 ± 0,01 ^{a,c}	0,16 ± 0,01 ^{b,d}	0,05
Úteros (g)	0,63 ± 0,05 ^{a,c}	0,40 ± 0,03 ^{a,b}	0,86 ± 0,15 ^c	0,29 ± 0,05 ^b	0,05
VALORES PERCENTUAIS					
% Ovários*	0,09±0,002 ^a	0,08±0,01 ^a	0,09 ± 0,04 ^a	0,09 ± 0,003 ^a	0,37
% Úteros	0,22±0,02 ^{a,c}	0,18±0,01 ^{a,b}	0,33±0,07 ^c	0,15± 0,02 ^b	0,01

¹⁻ Dados apresentados como média ± erro padrão; resultados com letras diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05); *média das duas gônadas (ovários direito e esquerdo), (g) em gramas, (%) peso relativizado pelo peso corporal total.

4.2.5.2 Ovários

Ao analisar os parâmetros histomorfométricos dos ovários entre os grupos experimentais, notamos um aumento significativo no número de folículos primordiais em animais dos grupos em restrição alimentar (SR e TR), quando comparados aos seus pares alimentados (SA e TA) (p<0,0001). Os animais treinados (TA e TR) apresentaram um aumento no número de corpo *albicans*, quando comparados com os sedentários (SA e SR) (p<0,0002). E foram observados cistos em animais dos grupos SR, TA e TR (Tabela 5).

Tabela 5- Parâmetros histomorfométricos do ovário dos grupos experimentais em diestro¹, 2011.

PARÂMETROS	SA	SR	TA	TR	P
Folículo primordial	3,14±0,62 ^a	10,25±1,41 ^a	5,88±0,66 ^a	18,95±2,90 ^b	0,001
Folículo maduro	2,00±0,33 ^a	1,52±0,22 ^a	1,91±0,22 ^a	2,44±0,47 ^a	0,20
Corpo albicans	1,66±0,66 ^a	1,12±0,12 ^b	3,56±0,35 ^a	3,58±0,41 ^a	0,0002
Corpo lúteo	3,08±0,39 ^a	3,76±0,36 ^a	2,90±0,39 ^a	3,00±0,24 ^a	0,33
Corpo hemorrágico	2,60±0,30 ^a	3,00±0,63 ^a	1,00±0,00 ^a	1,50±0,50 ^a	0,18
Cistos	0,00 ^a	1,71±0,28 ^b	1,30±0,23 ^b	1,00±0,00 ^a	0,007

¹⁻ Dados apresentados como média ± erro-padrão; médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si.

Podemos observar melhor as características histológicas dos ovários entre grupos experimentais na Figura 17. Podemos notar uma diminuição no diâmetro do ovário dos animais dos grupos em restrição alimentar (SR e TR).

Vale ressaltar que a fotomicrografia apresentada é de um animal representativo de cada grupo experimental (todos em diestro), no entanto, a característica observada se mantém nos demais animais de cada grupo.

Figura 17 Corte transversal de ovários entre os grupos experimentais em diestro. Fotomicrografia demonstrando as alterações ocorridas nos ovários devido tratamento experimental. (A) ovário de um animal do grupo sedentário alimentado SA; (B) ovário de um animal do grupo treinado alimentado TA; (C) ovário de um animal do grupo sedentário restrito SR; (D) ovário de um animal do grupo treinado restrito TR. Nota-se uma redução do diâmetro do ovário dos animais em restrição alimentar em relação aos animais alimentados, e a presença de cistos no grupo TR. Legendas: 1, folículo primordial; 2, folículo maduro; 3, corpo lúteo; 4, corpo homorrágico; 5, corpo albicans; 6, cisto. Coloração de HE. Barra: 100µm.

4.2.5.3 Úteros

Notamos que os úteros dos animais dos grupos restritos (SR e TR), encontravam-se menores quando comparados com seus pares alimentados (SA e TA). Vale ressaltar que tal diferença ainda parece ser maior no grupo TR, sugestivo de uma atrofia ocasionada pela somatória do treinamento físico intenso e restrição alimentar, contribuindo para a cessação do ciclo estral nos animais deste grupo.

Vale ressaltar que a fotografia apresentada é de um animal representativo de cada grupo experimental (todos em diestro), no entanto, a característica observada se mantém nos demais animais de cada grupo. Podemos observar a diferença no tamanho dos úteros dos grupos experimentais na Figura 18.

Figura 18: Úteros dos grupos experimentais, 2011. Fotografia ilustrando o tamanho do útero de cada animal (um animal representativo) dos grupos experimentais, ao final do experimento.

Em relação aos parâmetros uterinos, observamos que o útero dos animais em restrição alimentar (SR e TR) apresentou diminuição significativa da espessura do endométrio e do miométrio, quando comparados aos seus pares alimentados (SA e TA) ($p < 0,000$). No entanto, o grupo TA apresentou uma

espessura ainda maior do miométrio quando comparado ao grupo SA ($p<0,007$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros uterinos dos grupos experimentais em diestro¹, 2011.

PARÂMETROS	SA	SR	TA	TR	P
Endométrio	2740,00±169,20 ^a	1092,00±97,23 ^b	2755,00±235,20 ^a	711,60±63,66 ^b	0,0001
Miométrio	190,60±4,13 ^a	119,30±2,79 ^b	235,80±9,67 ^c	111,00±3,30 ^b	0,0001

¹- Dados apresentados como média ± erro-padrão; médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si.

Podemos observar melhor as características histológicas dos úteros entre grupos experimentais na Figura 19. Observamos uma diminuição no diâmetro do útero dos animais dos grupos em restrição alimentar (SR e TR), quando comparados aos grupos alimentados (SA e TA). O útero dos animais do grupo TA é maior quando comparado com os demais grupos experimentais, da mesma forma, o miométrio dos animais desse grupo é maior estatisticamente quando comparado aos demais ($p<0,001$).

Vale ressaltar que a fotomicrografia apresentada é de um animal representativo de cada grupo experimental (todos em diestro), no entanto, a característica observada se mantém nos demais animais de cada grupo.

Figura 19: Corte transversal de útero entre os grupos experimentais em diestro. Fotomicrografia demonstrando as alterações ocorridas nos úteros devido tratamento experimental. (A) útero de um animal do grupo sedentário alimentado SA; (B) útero de um animal do grupo treinado alimentado TA; (C) útero de um animal do grupo sedentário restrito SR; (D) útero de um animal do grupo treinado restrito TR. Nota-se uma redução do diâmetro do útero dos animais em restrição alimentar em relação aos animais alimentados. Abreviaturas: E, endométrio; M, miométrio. Coloração de HE. Barra: 100µm.

4.2.6 Parâmetro de expressão gênica

4.2.6.1 Hibridização in situ para RNAm do ppMCH

Em relação à análise neuroquímica entre os grupos experimentais, determinou-se a expressão do RNAm do ppMCH na IHy, LHAt e LHAp. Podemos observar a citoarquitetura dos cortes na Figura 20.

Figura 20: Hibridização in situ para o ppMCH. Fotomicrografias de campo claro mostrando pontos de referência citoarquitetônicos, e a deposição dos grânulos de prata (marcação do RNAm do ppMCH) em neurônios da (A) área incerto hipotalâmica (IHy), (B) área hipotalâmica lateral tuberal (LHAt), (C) área hipotalâmica lateral posterior (LHAp) em um animal do grupo sedentário alimentado (SA). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; fx, fórnice; ic, cápsula interna; mt, mamilo talâmico; opt, trato óptico. Barra: (A-C) 100µm.

4.2.6.2 RNAm ppMCH na IHy

Na IHy notamos uma redução significativa na expressão do RNAm do ppMCH em animais em restrição alimentar (SR e TR), quando comparado ao grupo SA, também em diestro ($p<0,001$). Já animais do grupo SA em proestro, apresentam a mesma redução na expressão do RNAm do ppMCH quando comparado ao grupo SA em diestro ($p<0,001$). Os animais do grupo SR apresentaram os menores valores na expressão do RNAm do ppMCH quando comparado os grupos TA e TR em diestro ($p<0,0001$) e ainda, quando comparados aos animais do grupo SA em proestro ($p<0,01$) e TA em proestro ($p<0,0001$). Os grupos TR (diestro) e SA (proestro) apresentam redução na expressão do RNAm do ppMCH quando comparado os grupos TA em proestro ($p<0,01$) (Figura 21).

Figura 21: Expressão do RNAm de MCH na IHy dos grupos experimentais em diestro e proestro. Gráfico da média da intensidade óptica integrada (IOD) $\pm$ erro padrão em unidade arbitrária.

Figura 22: Hibridização *in situ* para o RNA do ppMCH na área incerto hipotalâmica (IHy) entre os grupos experimentais em diestro. (A-D) Fotomicrografias de campo escuro mostrando pontos de referência citoarquitetônicos, e a deposição dos grânulos de prata (marcação do RNA do ppMCH) em neurônios da IHy entre os grupos experimentais. (A'-D'). Fotomicrografias de campo claro em maior aumento mostrando a deposição dos grânulos de prata em neurônios da IHy entre os grupos experimentais. (A-A') animal do grupo SA. (B-B') animal do grupo SR. (C-C') animal do grupo TA. (D-D') animal do grupo TR. A seta em vermelho ressalta a deposição dos grânulos de prata nas células. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; fx, fórnice; mt, mamo talâmico; SA, sedentário alimentado; SR, sedentário restrito; TA, treinado alimentado; TR, treinado restrito. Barra: (A-D) 400µm; (A'-D') 20µm.

4.2.6.3 RNAm ppMCH na LHAt

Em relação a LHAt notamos aumento significativo na expressão do RNAm do ppMCH em animais do grupo TR em diestro, quando comparado ao grupo SA em diestro ($p < 0,001$). Já animais do grupo SA em proestro, apresentam aumento da expressão do RNAm do ppMCH quando comparado ao grupo SA em diestro ($p < 0,01$). Os animais dos grupos treinados (TA e TR) em diestro, bem como o TA em proestro apresentaram valores maiores na expressão do RNAm do ppMCH quando comparado ao grupo SR em diestro ($p < 0,0001$). Animais em proestro (SA e TA) apresentam aumento na expressão do RNAm do ppMCH quando comparado os grupos SR ($p < 0,01$) e SA ($p < 0,001$) ambos em diestro (Figura 23).

Figura 23: Expressão do RNAm de MCH na LHAt dos grupos experimentais em diestro e proestro. Gráfico da média da intensidade óptica integrada (IOD) $\pm$ erro padrão em unidade arbitrária.

Figura 24: Hibridização *in situ* para o RNAm do ppMCH na área hipotalâmica lateral tuberal (LHA_t) entre os grupos experimentais em diestro. (A-D) Fotomicrografias de campo escuro mostrando pontos de referência citoarquitetônicos, e a deposição dos grânulos de prata (marcação do RNAm do ppMCH) em neurônios da LHA_t entre os grupos experimentais. (A'-D') Fotomicrografias de campo claro em maior aumento mostrando a deposição dos grânulos de prata em neurônios da LHA_t entre os grupos experimentais. (A-A') animal do grupo SA. (B-B') animal do grupo SR. (C-C') animal do grupo TA. (D-D') animal do grupo TR. A seta em vermelho ressalta a deposição dos grânulos de prata nas células. Abreviaturas: ic, cápsula interna; opt, trato óptico. SA, sedentário alimentado; SR, sedentário restrito; TA, treinado alimentado; TR, treinado restrito. Barra: (A-D) 400µm; (A'-D') 20µm.

4.2.6.4 RNAm ppMCH na LHAp

Analisando a LHAp podemos notamos aumento significativo na expressão do RNAm do ppMCH em animais do grupo TR em diestro, quando comparado ao grupo SA ($p<0,001$), ao grupo SR ($p<0,01$) e ao grupo TA ($p<0,0001$), todos em diestro. Animais do grupo SA em proestro, apresentam aumento significativo na expressão do RNAm do ppMCH quando comparado ao grupo SA e TA ($p<0,001$) e comparado ao grupo SR ($p<0,01$) em diestro. O grupo TA em proestro apresentou valores maiores na expressão do RNAm do ppMCH quando comparado aos grupos SA, SR e TA, todos em diestro ($p<0,0001$) (Figura 25).

Figura 25: Expressão do RNAm de MCH na LHAp dos grupos experimentais em diestro e proestro. Gráfico da média da intensidade óptica integrada (IOD) $\pm$ erro padrão em unidade arbitrária.

Figura 26: Hibridização *in situ* para o RNA do ppMCH na área hipotalâmica lateral posterior (LHAp) entre os grupos experimentais em diestro. (A-D) Fotomicrografias de campo escuro mostrando pontos de referência citoarquitetônicos, e a deposição dos grânulos de prata (marcação do RNA do ppMCH) em neurônios da LHAp entre os grupos experimentais. (A'-D') Fotomicrografias de campo claro em maior aumento mostrando a deposição dos grânulos de prata em neurônios da LHAp entre os grupos experimentais. (A-A') animal do grupo SA. (B-B') animal do grupo SR. (C-C') animal do grupo TA. (D-D') animal do grupo TR. A seta em vermelho ressalta a deposição dos grânulos de prata nas células. Abreviaturas: ic, cápsula interna; opt, trato óptico. SA, sedentário alimentado; SR, sedentário restrito; TA, treinado alimentado; TR, treinado restrito. Barra: (A-D) 400µm; (A'-D') 20µm.

4.3 Sumarização dos resultados

Sumarizando os resultados temos:

- ✓ O peso corporal foi menor nos grupos em restrição alimentar, sendo acentuada pelo treinamento físico intenso;
- ✓ O peso dos ovários, útero e TAB foi menor nos grupos em restrição alimentar;
- ✓ O consumo alimentar não foi alterado pelo treinamento físico intenso;
- ✓ O consumo alimentar aumentou na fase lútea;
- ✓ A restrição alimentar *per se* induziu período de anestro na nona semana de experimento, enquanto que a associação da restrição alimentar com exercício físico intenso levou as ratas ao anestro já na quarta semana de experimento;
- ✓ As concentrações séricas de progesterona e FSH mostraram-se elevadas em animais do grupo TA na fase ovulatória;
- ✓ A concentração sérica de leptina foi menor nos grupos em restrição alimentar;
- ✓ A leptina se correlaciona positivamente com o TAB;
- ✓ A razão leptina/TAB mostrou-se elevada no grupo TR;
- ✓ Houve aumento do número de folículos primordiais nos ovários dos animais em restrição alimentar;
- ✓ Houve redução do número de corpos *albicans* no grupo SR;
- ✓ Houve presença de cistos ovarianos nos grupos TA, SR e TR;
- ✓ Houve redução do endométrio e miométrio nos úteros dos animais em restrição alimentar;

- ✓ Houve um aumento no miométrio nos úteros dos animais do grupo TA;
- ✓ A expressão do ppMCH na IHy foi menor nos animais em restrição alimentar e nos animais alimentados *ad libitum* em proestro (antecedendo em horas o pico de LH);
- ✓ A expressão do ppMCH na LHA (tuberal e posterior) foi maior nos animais em restrição alimentar e nos animais alimentados *ad libitum* em proestro (antecedendo em horas o pico de LH).

5 DISCUSSÃO

*“A meta de uma discussão ou debate
não deveria ser a vitória,
mas o progresso.”*

(Joseph Joubert)

5.1 Considerações metodológicas

Na literatura a maioria dos estudos que utilizam exercício físico e dieta como modelos experimentais são realizados em indivíduos ou animais do gênero masculino, assim como, aqueles que avaliam o MCH e outros parâmetros metabólicos. Poucos são os estudos que levam em consideração as diferenças entre os gêneros (Pfister, 2000). Dentre os estudos que se propõem a levar em consideração as diferenças entre homens e mulheres, ainda é mais reduzido o número daqueles que analisam as mulheres dentro de suas variações fisiológicas específicas, como é o caso da variação hormonal, um fator importante indutor de variações metabólicas, que caracteriza o ciclo menstrual (Pfister, 2000).

Da mesma forma, é reduzido o número de estudos sobre o controle do consumo alimentar e exercício físico intenso, aliados ou não, devido à manipulação animal, ao possível n reduzido (pela perda de animais ao longo do experimento), além do dispêndio de tempo para realização do experimento (protocolos longos).

Em se tratando da utilização de fêmeas, torna-se mais difícil o estudo pelo controle do ciclo estral, e pela subdivisão intra-grupos experimental, pois ao analisar os resultados, deve-se levar em consideração cada uma das fases do ciclo estral, tornando o n ainda mais reduzido.

A participação em competições esportivas e programas de atividade física têm adquirido importância crescente. Nos últimos 20 anos o número de mulheres atletas, em particular, tem aumentado consideravelmente. A participação feminina cresceu cerca de 600% abrangendo um total de mais de 1,9 milhão de mulheres atletas (Huston e Wojtys, 1996). A consequência inevitável desse fenômeno tem sido a ênfase dada às competições e a pressão por parte dos treinadores, patrocinadores e familiares na busca de melhores resultados, acarretando estresse físico e mental. Alguns estudos demonstraram que tanto o exercício físico intenso como a baixa disponibilidade de energia afetam o perfil hormonal e o metabolismo energético (Pardini, 2001; Ribeiro et al., 2007; Zeleznik e Pohl, 2006).

É sabido que roedores são animais de atividade noturna e descanso diurno, alguns estudos postulam que o desempenho físico destes seria melhor durante a noite ou madrugada. Dessa forma, optou-se pela realização das

sessões de exercício físico no período noturno dos animais (ciclo invertido), outro fator que dificulta o experimento, uma vez que além do treinamento físico no escuro, o consumo de ração, o controle de peso corporal e a monitoração do ciclo estral foram realizados no escuro, outro fator limitante.

Outro fator que se tomou cuidado foi o controle do consumo ração, optou-se por fazê-lo dia a dia, uma vez que o consumo de ração entre as ratas poderia apresentar diferenças em decorrência às diferentes fases do ciclo estral. Nem todos os estudos na literatura tem o devido cuidado, pelo tempo despendido.

A hibridização *in situ* entre os grupos experimentais apresentou uma intensa impregnação dos grânulos de prata sobre as células contracoradas com tionina, dessa forma, tivemos dificuldade de visualização dos corpos celulares nas fotomicrografias.

Para melhor abordagem dos parâmetros avaliados em nosso estudo dividimos a discussão em tópicos.

5.2 Parâmetros biométricos

No presente estudo, observa-se que grupos submetidos à restrição alimentar reduziram significativamente seu peso corporal. O que não ocorreu nos animais alimentados *ad libitum*, mesmo quando submetidos a treinamento físico. Nos grupos submetidos à restrição alimentar, observa-se uma ligeira estabilização do peso corporal a partir da quarta semana do experimento. Nossos dados corroboram com o estudo de (Santos et al., 2011), realizado nas mesmas condições experimentais, embora, com o protocolo de treinamento e restrição alimentar de 7 semanas. Esse fato pode evidenciar a busca do organismo a um estado adaptativo a situações de estresse. Frente à escassez de alimentos os animais ajustam suas prioridades energéticas de forma a manter sua homeostasia (Wade e Jones, 2004).

Vários autores estudaram alterações reprodutivas com o treinamento físico (Loucks, 1994; Souza et al., 2003; Wiggins, 1977). Existe um consenso no sentido de que, quanto maior o desequilíbrio energético, maior o risco de alterações no eixo reprodutor. O grupo TR aliou o treinamento físico intenso à restrição alimentar, o que significou um balanço energético mais negativo. Um fato digno de nota é que a partir da quarta semana as ratas do grupo TR interromperam o

ciclo estral. Esta constatação deixa claro que a interrupção do ciclo estral ocorre no intuito do animal economizar energia, e a partir do momento em que a ovulação foi interrompida, a perda de peso foi atenuada.

A gordura estocada sob a forma de triacilglicerol no TAB é uma importante fonte de energia, sobretudo, durante períodos de repouso ou jejum (Murthy e Pandi, 1994) e durante o exercício físico aeróbio (Ronallo e Rhodes, 1998; Jeukendrup, 2002; Belmonte e Aoki, 2005; Lima-Silva et al., 2006; Yamashita et al., 2008; Sahlin, 2009). Observou-se que os grupos TR e SR apresentaram menor quantidade de TAB, quando comparado aos demais grupos. Estudos em humanos mostram que o treinamento físico é capaz de reduzir as reservas de gordura corporal e, o tipo de gordura que responde mais rapidamente aos estímulos do exercício físico é o da região abdominal (gordura visceral) (Wajchenberg, 2000), pois entre outros fatores, há uma maior expressão de receptores β -adrenérgicos nesse tipo de gordura, e a expressão aumentada dos receptores adrenérgicos pode indicar respostas mais rápidas ao aumento de catecolaminas circulantes, quadro típico dos momentos de realização do exercício. No entanto, em nosso estudo, tal fato somente pôde ser observado com o treinamento físico aliado à restrição alimentar.

5.3 Parâmetros dietéticos

Consumo alimentar não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos sedentário e treinado nas condições do presente estudo. Num estudo prévio, semelhante ao atual, Santos et al. (2011) verificaram uma diferença em tal parâmetro, isto poderia sinalizar que o treinamento físico poderia aumentar a ingestão de alimentos, com o objetivo de manter o balanço energético (BE), sendo que essa manutenção pode ser visualizada na variação de peso, ao final do experimento, que foi similar nos grupos sedentários e treinados. Vale ressaltar, que os animais tendem a ter um maior controle seu balanço energético do que humanos. E as diferenças de inversão de ciclo claro/escuro, bem como, o oferecimento da ração no período ativo dos animais podem ser fatores limitantes, nos quais não obtivemos as mesmas respostas para esse fator, no presente estudo.

Seria pertinente pensar que, para manutenção do balanço energético, o indivíduo submetido à atividade física responderia com um aumento no consumo alimentar, porém isto ainda é controverso na literatura, e há estudos que não têm demonstrado esse fato, tanto na modificação da fome quanto na ingestão de alimentos em curto prazo (1 a 2 dias) (Lluch et al., 1998; Westerterp-Plantenga, 1999).

Quando se trata de intervenções com exercícios em médio prazo (normalmente não mais que 2 a 5 dias) os dados também são contraditórios. Segundo (King et al., 1997a), com uma ampla abordagem sobre os efeitos do exercício no comportamento alimentar, 19% dos estudos analisados reportaram um aumento na ingestão energética após o exercício, 65% não apresentaram modificações e 16% observaram uma diminuição.

Uma série de estudos tem buscado identificar qual o efeito que o exercício pode promover no comportamento alimentar em intervenções de longo prazo, ou seja, mais que um mês de duração (Ambler et al., 1998; Andersson et al., 1991; Broeder et al., 1992; Whybrow et al., 2008b). Em uma recente revisão com 16 estudos, envolvendo grande diversidade na modalidade da prática (caminhada, corrida, ciclismo e treino com pesos) somente três estudos identificaram mudanças significativas na ingestão energética resultante da realização do exercício, sendo que um observou diminuição da ingestão energética e dois descreveram aumento (Whybrow et al., 2008b).

Embora os dados relacionando a intensidade do exercício e ingestões energéticas sejam limitados e divergentes, algumas evidências indicam que a intensidade do exercício possui um efeito marcante na fome subjetiva, sendo este fenômeno denominado anorexia induzida pelo exercício, fato este que ocorre somente durante e por um curto período de tempo após um exercício vigoroso ($>60\%$ do $VO_{2\text{máx}}$) (King et al., 1994; Kissileff et al., 1990; Thompson et al., 1988). Portanto, a curta inibição da fome parece não ocorrer em exercícios com intensidade baixa ou moderada.

Comparando-se o consumo de ração entre os grupos sedentários e treinados, de acordo com as fases do ciclo estral durante o experimento, notamos que ambos na fase lútea do ciclo não apresentam diferenças. Nas fases proliferativa e ovulatória, ambos os grupos apresentaram diferenças quando comparados ao grupo SA na fase lútea. Tais resultados corroboram com a

literatura, uma vez que, diversos autores já demonstraram que fêmeas apresentam redução na ingestão alimentar no proestro, quando a concentração de estrógenos circulantes encontra-se elevada (Asarian e Geary, 2006; Wingkar, 1992).

5.4 Parâmetros do eixo reprodutor

A maioria dos estudos a respeito da regulação do eixo reprodutor feminino é realizada com modelos animais, sobretudo, com ratas por se tratar de uma espécie com algumas similaridades entre seu ciclo estral e o ciclo menstrual da mulher. E ainda, por apresentar um ciclo estral curto, e de fácil acompanhamento.

Para avaliarmos as variações metabólicas relacionando-as ao ciclo estral, um dos parâmetros utilizados para determinação das fases do ciclo foram os esfregaços vaginais. Embora sejam importantes indicadores por apresentarem características já determinadas, tal parâmetro não é tão preciso em relação à duração da fase, sendo possível encontrarmos as características de determinada fase tanto no seu início quanto no período final da mesma. Assim, os esfregaços, primeiro parâmetro utilizado para determinar as fases do ciclo, foram considerados em associação a variação da concentração hormonal encontrada no soro dos diferentes grupos experimentais.

De acordo com os esfregaços vaginais, o grupo TR entrou em anestro permanente a partir da quarta semana do experimento. Sendo assim, ao final do experimento estavam na fase lútea. De forma similar, embora entrando em anestro um pouco mais tardiamente, o grupo SR ao final do experimento começou a apresentar tal característica.

Para melhor entendimento das variações hormonais, procuramos analisá-los entre os grupos experimentais e as fases do ciclo estral. Sendo assim, os hormônios que apresentaram alteração na sua concentração foram a progesterona, o FSH e a leptina.

Em relação à progesterona houve redução na sua concentração no grupo SR na fase lútea quando comparado ao grupo treinado alimentado também na fase lútea, que apresentou valores maiores deste hormônio, tal fato pode ser devido ao segundo pico de progesterona que ocorre na passagem do metaestro para o proestro (Freeman, 2006; Smith et al., 1975; Wood et al., 2007).

O FSH por sua vez, apresentou valores maiores no grupo TA na fase ovulatória, quando comparado aos demais grupos, independente da fase do ciclo estral. Tal dado está de acordo com os da literatura uma vez que no período escuro do estro as concentrações de FSH se encontram elevadas (pico secundário de FSH), e como o sacrifício se deu neste período tal resultado se mostra coerente (Smith et al., 1975; Wood et al., 2007).

Em relação à concentração sérica de leptina, observa-se que a restrição alimentar, mas não o treinamento físico isolado, foi responsável por uma redução acentuada e significativa em suas concentrações, esse resultado corrobora com os dados de Santos *et al.*, 2011. Embora ainda não completamente elucidado, estudos sugerem que tanto o exercício físico, como a restrição alimentar, podem causar redução na concentração plasmática de leptina (Considine et al., 1996; Fisher et al., 2001; Kohrt et al., 1996; Landt et al., 1997; Leal-Cerro et al., 1998; Miller et al., 1998; Ostlund et al., 1996; Perusse et al., 1997; Racette et al., 1997; Ryan et al., 2000; Volpe et al., 2008). Modificações na composição corporal estão relacionadas com as alterações na concentração sérica de leptina. Alguns estudos demonstraram que a diminuição do tecido adiposo em resposta ao exercício está relacionada a alterações no receptor longo de leptina, Ob-Rb. Kimura et al., (2004) investigaram, em ratos, se o exercício espontâneo alteraria a expressão da leptina após um período de 12 semanas. Os ratos apresentaram redução na gordura corporal e diminuição na concentração de leptina, além de sub-expressão no mRNA do receptor Ob-Rb.

Os resultados do presente estudo estão em concordância com estudos relacionando alterações no peso corporal, desequilíbrio energético, e concentrações de leptina (Dubuc et al., 1998; Pasman, Westerterp-Plantenga e Saris, 1998), uma vez que o grupo sedentário alimentado (controle) na fase lútea ou folicular apresentou maiores valores deste hormônio, quando comparado aos demais grupos que sofreram algum tipo de estresse metabólico, seja a restrição alimentar ou o treinamento físico, ou ambos aliados. Por outro lado, Perusse et al. (1997) verificaram redução das concentrações séricas de leptina depois de um programa de treinamento, não sendo esta redução atribuída a redução do TAB. O mesmo foi verificado por Pasman et al., (1998) quando aplicaram um programa de treinamento em homens obesos, em que houve diminuição das concentrações de leptina independente da gordura corporal. Dados de Santos (2006) também

mostram que ratas na fase lútea, independente de serem treinadas ou não, apresentam a concentração sérica de leptina mais elevada quando comparada as demais fases do ciclo estral.

Na análise de regressão linear simples, adotando-se o TAB para explicar a concentração de leptina, observou-se que esta responde por 51%. Em um estudo prévio (Santos, 2011), em condições experimentais semelhantes, notamos que a leptina certamente é expressa predominantemente pelo tecido adiposo subcutâneo, analisado pelo depósito na carcaça do animal. Considera-se, portanto, que o tecido adiposo que mais respondeu pelas concentrações de leptina foi o tecido adiposo branco, especificamente na região subcutânea. Neste estudo os grupos de animais alimentados *ad libitum* apresentaram um maior acúmulo de gordura na carcaça (gordura subcutânea) e na região perirenal (gordura visceral). O grupo TA apresentou a maior quantidade de gordura na carcaça e o grupo SA apresentou a maior concentração de gordura visceral, esses resultados são bastante coerentes e compatíveis com estudos em humanos. Com esse dado, e comparando com inúmeros estudos acerca da relação exercício físicos x saúde, pode-se concluir que, entre os animais alimentados *ad libitum*, o exercício colaborou com a diminuição do risco de doenças crônicas (Alessio et al., 2005). Em humanos, o tecido adiposo subcutâneo é o principal determinante da concentração plasmática de leptina (Fried et al., 1998).

Os níveis séricos de leptina se correlacionam significativamente com a massa adiposa corporal. Entretanto, o papel regulador sobre a sua produção e secreção por outros fatores, tais como o tipo de distribuição da gordura corporal, a insulina, os hormônios sexuais e as gonadotrofinas é controverso (Yamada et al., 2000). Boden et al. (1996) afirmam que, embora a leptina se relacione com a gordura corporal, uma restrição dietética, mesmo durante curto período de tempo é capaz de provocar queda importante dos níveis séricos da leptina.

Para melhor esclarecer a atuação da leptina, tornou-se necessário analisar a razão leptina/TAB, e notamos que o grupo TR apresentou uma razão aumentada, em comparação aos demais grupos experimentais, ou seja, obviamente tanto em valores absolutos, quanto em valores relativos, os animais em restrição apresentariam uma menor concentração desse hormônio, uma vez que este é produzido e secretado pelo TAB (Zhang et al., 1994), os animais em

restrição apresentaram perda acentuada de peso, sobretudo, perda de TAB, o que justifica também, a correlação entre tais dados.

Cabe ressaltar que o TAB é reconhecido como um tecido heterogêneo, tem se mostrado como um depósito especializado, permitindo diferentes características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (Pond, 1999, 2003). Essa heterogeneidade relaciona-se também com a secreção de leptina (Machado et al., 2004). Outros estados patológicos demonstram resultados controversos em relação à quantidade de TAB e leptina, como na caquexia do câncer (Chance et al., 1998; Simons et al., 1997).

Pelo aumento da relação leptina/TAB apresentada no grupo TR, poderíamos inferir que essa seria uma estratégia do organismo em reverter o quadro de anestro, mostrando-se o TAB nestes animais mais metabolicamente ativo, no entanto, tal tentativa não seria eficaz.

Levando-se em consideração as respostas fisiológicas, não seria inteligente do organismo, conseguir reverter um quadro de disfunção hormonal, não condizente com o restabelecimento do ciclo estral normal, uma vez que as fêmeas não apresentavam combustível metabólico para sua própria sobrevivência, quanto mais para geração de uma prole (Crown et al., 2007; Hill, Elmquist e Elias, 2008; Schneider, 2004; Wu et al., 2009). Assim, podemos relatar que o restabelecimento do peso corporal e das reservas metabólicas são essenciais para a reversão do anestro e continuidade da procriação.

Como a secreção de leptina pelos adipócitos é associada ao tamanho do adipócito (Garaulet et al., 2000; Hamilton et al., 1995), seu peso (Couillard et al., 2000), as alterações morfométricas poderiam ajudar a explicar do resultado da relação TAB/leptina do presente estudo, assim como, já foi relatado para ratos caquéticos, os quais são susceptíveis em resultar diferenças na capacidade de secreção de leptina entre os depósitos de gordura (Bertevello e Seelaender, 2001). Fazendo um paradigma com a caquexia do câncer (um estado de acentuado balanço energético negativo), a concentração plasmática de leptina tem sido relatada como aumentada (Moses et al., 2001), diminuída (Bing et al., 2001; Brown et al., 2001; Simons et al., 1997), ou não alterada (em relação à massa adiposa, Wallace et al., 1998).

Em relação às análises hormonais, cabe ainda destacar que quando temos que levar em consideração cada fase do ciclo estral, ou seja, há uma subdivisão

intra-grupo, o número de animais estudados foi pequeno, talvez um número maior de animais pudesse refletir um maior “poder estatístico” para essas constatações.

5.5 Parâmetros anatômicos e histológicos

A fertilidade da fêmea depende do desenvolvimento adequado das gônadas, da maturação do oócito, da proliferação e diferenciação das células da granulosa (Elvin e Matzuk, 1998) e da interação entre os fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos que coordenam as alterações cíclicas do ovário durante a foliculogênese (Elvin e Matzuk, 1998).

Para melhor analisar e integrar os efeitos do treinamento físico intenso e da restrição alimentar no eixo reprodutor de fêmeas, se fez necessária a análise histomorfológica dos ovários e útero.

Os ovários são as gônadas femininas e funcionalmente podem ser caracterizados como glândulas mistas, pois apresentam função endócrina (sintetizam e secretam hormônios, a saber: estrogênio e progesterona) e função exócrina (secretam o ovócito para o meio). Em roedores, os ovários se localizam lateralmente aos rins e se conectam à parede dorsal da cavidade abdominal por uma projeção do peritônio denominada mesovário. Histologicamente, a superfície externa do ovário é recoberta por um epitélio cúbico simples, o epitélio germinativo. Abaixo deste há uma camada de tecido conjuntivo denso, denominado túnica albugínea. O estroma é dividido em região cortical, abaixo da túnica albugínea, e região medular, formada por tecido fibroso, por onde circulam vasos e nervos. Na região cortical localizam-se os folículos ovarianos, que consistem em um ovócito (célula germinativa feminina) envolvido por uma ou mais camadas de células foliculares ou granulosa, dependendo do seu estágio de desenvolvimento (Junqueira e Carneiro, 2008; Rugh, 1968; Salgado, 2009).

Em nosso estudo podemos observar alterações macro e microscópicas entre os grupos experimentais, oriundas de cada tratamento imposto pelo protocolo experimental. A redução de peso nos ovários dos animais em restrição alimentar pode refletir indiretamente, uma disfunção na atividade reprodutiva nestes animais. Monget e Martin (1997) demonstraram que mudanças no peso corporal provocadas pela desnutrição em animais provocam a redução do

tamanho testicular. Salvo as diferenças entre os gêneros, poderíamos esperar comportamento similar nas fêmeas do presente estudo.

DiMarco et al. (2007) em seu estudo com ratas submetidas a restrição alimentar (30%), também verificaram redução do peso dos ovários dos animais restritos, quando comparados aos animais controles (alimentados), após dois meses de anestro. Estudos prévios com ratas demonstraram que animais em restrição alimentar e/ou com perda acentuada de peso, apresentam redução do peso dos ovários (Caston et al., 1995; Douchi et al., 1996; Merry e Holehan, 1985).

Histologicamente notamos que os animais em restrição alimentar apresentaram um aumento no número de folículos primordiais, sobretudo o grupo TR. Isto pode ter relação com a presença de cistos ovarianos observados nestes animais, o que pode ter influenciado, a secreção de FSH aumentada neste grupo.

Em relação à restrição alimentar, e/ou prática de exercício físico, a maioria dos estudos são acerca do efeito benéfico de ambos, sobre o eixo reprodutor e parâmetros ovarianos e/ou uterinos, sendo necessários mais estudos acerca dos efeitos adversos de tais medidas.

Uma restrição alimentar breve, aliada ou não a prática regular de exercício físico em mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP), tem demonstrado importância terapêutica relevante podendo apresentar-se benéfica para o tratamento da SOP (Azevedo et al., 2008), no entanto, não temos dados que avaliem o efeito contrário, ou seja, restrição alimentar severa e/ou prática de exercício físico intenso e o desenvolvimento de cistos ovarianos. De acordo com nossos resultados, temos que tanto a prática do exercício físico intenso, como a restrição alimentar, aliados ou não, foram capazes de levar ao desenvolvimento de cistos ovarianos nos animais.

Portadoras de SOP apresentam aumento da frequência de pulso do GnRH (Turgeon et al., 1996) e de LH, (Liao et al., 1998) e, conseqüentemente, da síntese de andrógenos ovarianos (Turgeon et al., 1998; Liao et al., 1998; (Nelson et al., 2001; Tsilchorozidou et al., 2004). Ainda não está claro se o aumento da frequência de pulso do GnRH é devido a anormalidades intrínsecas no pulso gerador de GnRH ou causado pelos níveis relativamente baixos de progesterona, resultando em ciclos anovulatórios (Turgeon et al., 1998; Nelson et al., 2001).

Em adição a estes resultados e as concentrações hormonais observadas, é sabido que o aumento da produção de andrógenos pelas adrenais é encontrado em 25% dos casos de SOPC (Ehrhart-Bornstein et al., 1998) provavelmente como resultado de traços genéticos ou secundários à secreção anormal de andrógenos ovarianos (Ehrmann, 2005; Ehrmann et al., 1995).

Em adição a esses achados, estudos mostram que o tecido adiposo produz estrogénios através da expressão da aromatase dentro dos adipócitos, sendo este um importante local de biossíntese de estrogênio em mulheres na pós-menopausa e homens (Mattsson e Olsson, 2007). Os estrogénios são importantes na determinação da composição corporal, como demonstrado em experimentos com fêmeas ooforectomizadas, que leva a aumento da adiposidade (Gao e Horvath, 2008). Outro problema pode ser o tipo de gordura que predomina em mulheres, pois essas têm maiores níveis de gordura subcutânea, em comparação aos homens que têm maiores níveis de gordura visceral (Mayes e Watson, 2004). Além disso, a atividade da aromatase difere de acordo com a localização do tecido adiposo, e é maior em regiões glúteas em comparação com a gordura visceral (Mattsson e Olsson, 2007). Após a menopausa e com o declínio nos níveis de estrogênio, as mulheres assumem uma distribuição corporal mais masculinizada de tecido adiposo visceral com níveis mais elevados (Mayes e Watson, 2004).

Os estrogénios exercem uma ampla gama de efeitos sobre o metabolismo e regulação do peso em vários tecidos, incluindo o cérebro. Em relação ao sistema neuroendócrino, o estrogênio pode reduzir a ingestão de alimentos e aumentar o gasto energético (Gao e Horvath, 2008). Em camundongos fêmeas e ratos, o silenciamento discreto do receptor de estrogênio (ER α) no núcleo ventro-medial do hipotálamo (VMH) causa hiperfagia e reduz a atividade física e a termogênese, levando ao aumento da adiposidade (Musatov et al., 2007). Além das ações no VMH, os estrogénios podem replicar os efeitos da leptina sobre os neurônios no ARC, os estrogénios aumentam o número de insumos excitatórios para os neurônios POMC, aumentando assim a expressão de melanocortina (Gao et al., 2007; Pinto et al., 2004). Em mulheres pré-menopausa, a produção de estrogénios, ovarianos, é importante na regulação do corpo de peso, e parece que os estrogênios produzidos no TAB podem ser mais importantes na regulação

do corpo de peso, em mulheres na pós-menopausa e homens (Mattsson e Olsson, 2007).

Em relação à análise anatomohistológica dos úteros, em roedores o útero é composto por dois cornos longos que se unem em um pequeno corpo uterino, formando uma cérvix única que se projeta na vagina. O útero está ligado à parede abdominal pelo mesométrio, um ligamento contendo vasos sanguíneos e nervos (McCloskey et al., 2005). A mucosa uterina, denominada endométrio, é constituída por um epitélio cilíndrico simples, formado por células secretoras não ciliadas e células ciliadas, o qual é sustentado por uma membrana basal, e pelo estroma (tecido conjuntivo frouxo). As glândulas presentes no estroma são invaginações do epitélio de revestimento da luz uterina. O miométrio é composto por duas camadas musculares lisas, uma circular interna e uma longitudinal externa, as quais estão separadas por uma camada de tecido conjuntivo frouxo altamente vascularizado. Os cornos uterinos são revestidos externamente por uma serosa, o mesotélio (Benoit et al., 2005; White et al., 2006).

Os animais em restrição alimentar apresentaram redução do peso do útero, quando comparados aos seus pares alimentados. Tais resultados corroboram com a disfunção encontrada pelos mesmos, em manter seu ciclo estral normal.

Podemos observar ainda um aumento no diâmetro do endométrio nos animais do grupo TA, e uma drástica redução nos animais do grupo TR. O miométrio apresentou a mesma característica, e analisando suas camadas (interna e externa), poderemos saber qual delas está ou não aumentada no grupo TA, ou diminuída no grupo TR. Sabe-se que durante o anestro, o endométrio e o miométrio estão completamente atroficos (Rehm et al., 2007).

Vale ressaltar que os ovários e úteros dos grupos experimentais foram analisados levando-se em consideração a fase do ciclo (diestro), uma vez que alterações em ambos tecidos são inerentes a cada fase analisada (Westwood, 2008).

5.6 Parâmetros da expressão gênica (RNA_m ppMCH)

O elo entre o balanço energético e a reprodução é crítico para a sobrevivência de todas as espécies (Wu et al., 2009). O estado nutricional e a

disponibilidade de energia dos estoques corporais exercem um profundo impacto na função reprodutiva (Crown et al., 2007; Hill et al., 2008; Schneider, 2004).

O processo reprodutivo envolve um alto gasto de energia, sendo importante que a puberdade, a gestação e a lactação ocorram apenas quando há disponibilidade de combustível metabólico (Mircea et al., 2007). A informação da disponibilidade energética é carregada ao encéfalo por sinais periféricos, como a leptina, insulina, ghrelina, bem como, pela liberação central de peptídeos, como o NPY, melanocortinas, e o MCH (Campfield et al., 1995; Cohen et al., 2001; de Luca et al., 2005; Halaas et al., 1997).

A liberação de LH é regulada por neurônios GnRH, em ratos, estes são predominantemente encontrados na área pré-óptica rostral (rPOA) ao nível rostro-caudal da região do órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) (Witkin et al., 1982). Os neurônios GnRH localizados ao redor do OVLT são particularmente importantes para a regulação do eixo hipotálamo – hipófise – gônadas (HHG) por representar a maioria dos neurônios que sintetizam GnRH e que se projetam para a eminência mediana. Portanto, estes neurônios são diretamente responsáveis pelo controle da secreção hipofisária do LH e do FSH (King e Millar, 1982; Lee et al., 1990).

Uma série de estudos tem sugerido que o MCH possa atuar no eixo reprodutor, direta ou indiretamente, ou como uma parte da via integrativa de ação da leptina no eixo reprodutor (Murray et al., 2000b, 2006; Wu et al., 2009). No entanto, não existe um consenso na literatura atual no que diz respeito à ação do MCH no eixo reprodutor, alguns autores acreditam que sua ação seja estimulatória (Murray et al., 2000b, 2006), enquanto outros autores acreditam que sua ação seja inibitória (Wu et al., 2009).

Em nosso estudo as regiões em que encontramos expressão de RNAm do ppMCH foram as mesmas já descritas na literatura, a LHA e a IHy. Com exceção do período de lactação, no qual foi comprovado a expressão de RNAm do ppMCH na área pré-óptica (região que não expressa normalmente MCH) que cessa após o desmame (Knollema et al., 1992), e células expressando MCH no núcleo laterodorsal do tegmento (LDT) apenas em fêmeas, independente do ciclo estral (Rondini et al., 2007).

Estudos eletrofisiológicos atestam que a ação inibitória do MCH no eixo reprodutor ocorre através de um bloqueio (pós-sináptico) mediado pelo MCH, na ação da *kisspepitina* (sistema peptidérgico reconhecidamente importante para o funcionamento do sistema reprodutivo, formado pelo gene *Kiss1* e de seu receptor, GPR54), para ativar os neurônios GnRH vGluT2 (via glutamatérgica) no núcleo do braço vertical da banda diagonal de Broca (VDB). Dessa maneira, favorecendo o pico pré-ovulatório de LH, o desencadeamento da puberdade e a manutenção da fertilidade, e tal efeito exercido envolve o receptor de MCH, o MCH-R1. Adicionalmente, as fibras imunorreativas ao MCH estão em justaposição nos mesmos neurônios GnRH vGluT2 ativados pela *kisspepitina*, na mesma região, esses dados são consistentes com o efeito inibitório observado exercido pelo MCH (Wu et al., 2009). Entretanto, a literatura apresenta estudos que atestam que o MCH possa ter um efeito estimulatório no eixo reprodutor. No estudo de Murray et al. (2006), no qual realizaram injeções bilaterais de MCH, em ratas ooforectomizadas, na área pré-óptica rostral (rPOA) e medial (mPOA), foi demonstrado ocorrer liberação de LH, mas a injeção realizada na IHy não levou a mesma resposta. Demonstraram também inibição da ação estimulatória do MCH na rPOA, após administração de antagonistas dos receptores MCH-R1 e MC5-R (receptor da família das melanocortinas, o qual o MCH pode se ligar e exercer efeito contrário ao exercido pelo α -MSH), embora na mPOA, tal efeito foi verificado apenas com a administração do antagonista do receptor MC5-R.

Estudos na literatura sugerem uma relação entre o sistema MCH e o LH, provavelmente dependente do estado fisiológico do animal e do seu local de ação, porém os sítios responsáveis por essa função não estão esclarecidos. Neste paradigma, poder-se-ia supor que o MCH oriundo da IHy possa atuar de alguma forma no eixo reprodutor, no modelo experimental do presente estudo, pois os resultados mostram um padrão de marcação mais elevado no grupo TR.

Estudos realizados com lesão nas décadas de 80 e 90 sugeriam que a IHy estivesse envolvida na regulação da liberação do LH. Lesões eletrolíticas, com ácido ibotênico ou com 6-hidroxidopamina bilaterais da IHy abolem o pico ovulatório plasmático do LH e induzem diestro (MacKenzie et al., 1984, 1988; Sanghera et al., 1991). Essa função parece ser dependente das células dopaminérgicas do grupamento A13, já que a injeção de dopamina na IHy induz a

um aumento na concentração plasmática de LH (MacKenzie et al., 1984), porém o papel neuroendócrino das células MCH da IHy não está bem elucidado.

As projeções da IHy mostram que essa região não deve atuar diretamente no controle do comportamento alimentar como faz a LHA (Sita et al., 2007). De fato, além do comportamento alimentar, o MCH está envolvido em diversas outras funções, como neuromodulador, incluindo alerta, comportamento exploratório, memória espacial, homeostase energética, regulação neuroendócrina, depressão, ansiedade e homeostase do sono (Bittencourt e Elias, 1998; Bittencourt et al., 1992; Borowsky et al., 2002; Casatti et al., 2002; Elias e Bittencourt, 1997; Elias et al., 1997; McBride et al., 1994; Monzon e De Barioglio, 1999; Monzon et al., 1999; Murray et al., 2000a; Pereira-da-Silva et al., 2003; Tsukamura et al., 2000; Verret et al., 2003).

Relacionando ao eixo reprodutor, ainda temos que o MCH inerva de maneira significativa a eminência mediana (Bittencourt et al., 1992; Knollema et al., 1992) e injeções vasculares de traçador retrógrado resultam em neurônios retrogradamente marcados na IHy, que são imunorreativos a MCH, sugerindo projeções dos neurônios MCH da IHy para a eminência mediana (Cvetkovic et al., 2003; Knollema et al., 1992). Além disso, células apresentando GnRH no núcleo pré-óptico medial, núcleo periventricular anteroventral (AVPV) e órgão vascular da lâmina terminal (Attademo et al., 2006; Murray et al., 2006; Williamson-Hughes et al., 2005) são inervadas por fibras MCH e NEI-ir, cuja origem é desconhecida. Diante do exposto poderíamos supor que o MCH proveniente da IHy, de alguma forma age no eixo reprodutor feminino, atuando em neurônios GnRH.

Vale ressaltar que a distribuição de fibras MCH-ir na eminência mediana varia entre machos e fêmeas, e nos diferentes estágios do ciclo estral, sendo maior no diestro e ainda mais expressivo na fêmea lactante no final da lactação (Gallardo et al., 2004; Rondini et al., 2010).

No presente estudo animais do grupo TA em proestro apresentaram um aumento na expressão do ppMCH na IHy, em concordância a este dado temos que, no proestro, o conteúdo do MCH na eminência mediana aumenta ao redor do meio dia (coincidindo com o aumento de GnRH na eminência mediana) e diminui à tarde precedendo a liberação de GnRH e o pico pré-ovulatório de LH no sangue (Gallardo et al., 2004). Dessa forma, como o sacrifício destes animais se

deu no período da tarde, pode ser que tal resultado esteja sendo influenciado pelo pressuposto acima, ou seja, talvez haja um aumento da expressão do ppMCH na IHy, precedente ao pico ovulatório.

Estudos *in vitro* mostram que MCH também estimula a liberação do GnRH ao ser injetado, na eminência mediana de ratas no proestro (Chiocchio et al., 2001). Já a injeção de MCH na área pré-óptica medial ou na eminência mediana estimula a liberação de LH em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol, as quais apresentam diminuição dos níveis plasmáticos de LH (Gonzalez et al., 1997; Murray et al., 2000a), porém não impede a liberação de LH originada pelo tratamento com benzoato de estradiol seguido de progesterona (Gonzalez et al., 1997; Murray et al., 2006). Ratas ooforectomizadas sem tratamento hormonal apresentam altos níveis plasmáticos de LH devido a um aumento compensatório dos pulsos de GnRH hipotalâmicos diante da ausência de estrógeno (Haisenleder et al., 1994) e a injeção de MCH nesses animais provoca uma diminuição dos níveis de LH (Murray et al., 2006). Mostra-se ainda interessante o fato de que a injeção de MCH na IHy de ratas ovariectomizadas tratadas com benzoato de estradiol seguido de progesterona provoca uma diminuição da liberação de LH, tal fato pode ser explicado pela presença de autoreceptores nessa região de tal forma que o MCH exógeno inibiria a atividade do MCH endógeno (Murray et al., 2006). Em adição foi observada uma diminuição nos níveis plasmáticos do LH após injeção de MCH no ventrículo lateral de ratas ooforectomizadas tratadas com estradiol (Tsukamura et al., 2000a).

Em outro estudo Murray et al. (2000a), demonstraram que ratas com ciclo estral normal, a ação dos esteróides sexuais parece não afetar significativamente o RNAm do ppMCH, embora os autores sugerem que, o estrógeno possa influenciar as células MCH na IHy, frente a outras situações fisiológicas reprodutivas ou não, como a puberdade, o envelhecimento, a lactação ou comportamento alimentar, como as situações do presente estudo. Entretanto, Attademo et al. (2006) mostraram que fêmeas ooforectomizadas sem reposição de estrógeno apresentam um aumento no número de células imunorreativas ao neuropeptídeo ácido glutâmico-isoleucina (NEI – outro subproduto do ppMCH) apenas na IHy. E em um estudo anterior, (Attademo et al., 2004) demonstraram

que a injeção icv de NEI também resulta em aumento dos níveis plasmáticos de LH, tanto em machos quanto em fêmeas.

Embora o MCH pareça ter relação com a ação da leptina no eixo reprodutor, ainda não está totalmente claro como isto ocorre, uma vez que, estudos a cerca da presença de fibras leptinérgicas e receptores Ob-Rb na IHy são inconclusivos e contraditórios.

Murray et al. (2000a) mostraram através da técnica de hibridização *in situ*, a presença de receptores Ob-Rb na zona incerta, porém não se pode afirmar que os mesmos se encontrem na IHy. A IHy é uma região diencefálica até então pouco estudada, localizada na junção entre o hipotálamo medial e a zona incerta (ZI) (Elias et al., 2008; Sita et al., 2003, 2007). Com limites citoarquitetônicos pouco precisos e a carência de estudos hodológicos, a IHy foi até recentemente considerada uma parte da ZI, com isso, recebendo denominações diversas e atribuições funcionais confusas. Temos poucos trabalhos que tem se dedicado a esclarecer alguns aspectos citoarquitetônicos, neuroquímicos, hodológicos e funcionais da IHy (Elias et al., 2008; Sita et al., 2003, 2007). Esses trabalhos padronizaram a nomenclatura dessa região para IHy (Sita et al., 2007), denominação esta que já foi aceita e incorporada pelos pesquisadores que estudam essa região (Bittencourt e Celis, 2008; Elias et al., 2008; Lagos et al., 2009; Nakamura et al., 2009; Torterolo et al., 2009) .

Elmqvist et al. (1998) que utilizaram hibridização *in situ* para verificar a distribuição do receptor Ob-Rb e as outras isoformas, porém não checaram a expressão na ZI, pois na época do estudo ainda não havia sido reconhecida a IHy como parte distinta desta. Vale ressaltar ainda, que tal estudo se deu com ratos machos, e não com fêmeas, e há evidências científicas de que há um dimorfismo sexual entre os gêneros, corroborando esses dados, estudos apontam que a expressão dos peptídeos do sistema MCH, incluindo as células da IHy, apresenta modificações entre machos e fêmeas e entre diferentes estados fisiológicos das fêmeas (Attademo et al., 2006; Gallardo et al., 2004; Knollema et al., 1992; Murray et al., 2000b; Rondini et al., 2007, 2010).

Somado a isso, se houver expressão de fibras leptinérgicas e/ou do receptor Ob-Rb na IHy, não sabemos se em situações específicas de balanço energético negativo, causado por prática de exercícios extenuantes, ou restrição

alimentar severa, ou ambos aliados, como os receptores OB-Rb se comportam, se há um mecanismo de compensação ou não, ou ainda, se a própria leptina sofre resistência a sua ação, uma vez que os estudos se dão na sua grande maioria com machos, e com camundongos, que pode ter uma resposta diferente do que em ratas, principalmente fêmeas.

Embora seja consenso na literatura que a restrição alimentar, a prática de exercícios extenuantes e outros desafios energéticos suprimem a pulsatilidade do GnRH e, assim, interrompem a ciclicidade e fertilidade, e pode atrasar o início da puberdade (Cunningham et al., 1999; Frisch e McArthur, 1974; Hill et al., 2008), não sabemos precisamente quais os circuitos e neuropeptídeos envolvidos nestas situações.

Se tratando de eixo reprodutor, sobretudo feminino, cabe ainda destacar que o conhecimento sobre a regulação do LH sofreu uma revolução após a descoberta das kisspeptinas e a literatura atual tem atribuído papel predominantemente a elas no controle neuroendócrino da ovulação. As kisspeptinas são uma família de peptídeos codificados pelo gene *Kiss1* (Gottsch et al., 2009), com capacidade de se ligar e ativar o receptor GRP54, atualmente renomeado *Kiss1r*, e que desempenham um papel chave no controle neuroendócrino da ovulação (Oakley et al., 2009; Tena-Sempere, 2010). Neurônios *Kiss1* estão localizados no Arc e núcleo periventricular ântero-ventral (AVPV). A kisspeptina produzida pelos neurônios do AVPV ativam os neurônios GnRH diretamente (Dumalska et al., 2008; Han et al., 2005; Pielecka-Fortuna et al., 2008), os quais amplamente expressam o receptor das kisspeptinas (*Kiss1r*; (Clarkson e Herbison, 2006; Irwig et al., 2004), aumentando a liberação de hormônios gonadotróficos pela hipófise e disparando uma cascata que é essencial para dar início à puberdade (Seminara et al., 2003) e manter a ovulação e fertilidade (Clarkson et al., 2008).

Wu et al. (2009) demonstrou através de estudo *in vitro*, que o MCH mostra-se capaz de inibir diretamente neurônios GnRH septais que são seletivamente ativados pela kisspeptina, bloqueando seu efeito excitatório, o que poderia ser um provável elo entre balanço energético e reprodução.

Entretanto, (Donato et al., 2011) demonstraram que a deleção seletiva do *LepR* dos neurônios *Kiss1* não afetam a fertilidade, sugerindo que a kisspeptina

não está relacionada ao controle reprodutivo exercido pela leptina. Adicionalmente, os autores ainda demonstraram que o PMv é o núcleo chave para a ação da leptina na reprodução, a qual atua de maneira dissociada no controle do metabolismo e da reprodução (Donato et al., 2011). Vale ressaltar que lesões no PMv além de interromperem o ciclo estral, provocam diminuição da concentração plasmática de estrógeno e LH, além de diminuição da presença de proteína Fos (secundário a tarde do proestro) no núcleo periventricular ântero-ventral (AVPV) (Donato et al., 2009) e também na IHy de fêmeas (Sita e Elias, 2011 - comunicação pessoal, 2011*).

Sendo assim, ainda que as kisspeptinas exerçam papel direto na regulação da liberação do LH, sistemas alternativos adicionais podem atuar em situações metabólicas específicas (como a do presente estudo), de maneira dependente ou independente das kisspeptinas.

Dessa forma, supomos que o balanço energético negativo, gerado do exercício físico intenso aliado a restrição alimentar, levou a perda de peso, sobretudo de TAB, conseqüentemente diminuindo a concentração circulante de leptina, através do Arc e do órgão subfornicial (ausência de barreira hematoencefálica) esta atuaria de alguma forma, ainda não totalmente estabelecida, uma vez que não há evidências científicas concretas da presença de fibras leptinérgicas ou receptores Ob-Rb na IHy, onde ocorreria uma baixa expressão e secreção do ppMCH, este deixaria de estimular os neurônios GnRH na mPOA, levando a uma queda nos pulsos do LH desencadeando o anestro, ou seja, na IHy podemos supor que a leptina e o MCH atuariam de forma sinérgica.

Para esclarecer se possivelmente outros núcleos, como o Arc, o PMv, o AVPV ou outros se projetam para IHy em fêmeas, e assim de forma indireta a leptina atuaria na mesma, estudos histológicos se mostram necessários. Adicionalmente, a descoberta das conexões da IHy com áreas relacionadas com o controle reprodutivo em fêmeas, acrescentaria dados importantes para o entendimento de suas funções. Um estudo prévio das projeções da IHy em machos mostrou uma moderada inervação de áreas relacionadas ao controle neuroendócrino (Sita et al., 2007), no entanto é necessária a realização de um

* Sita LV, Elias CF. São Paulo, 2011.

estudo das suas eferências em fêmeas, para análise de um possível dimorfismo sexual dessas projeções, somado a realização de estudos de suas aferências.

Em relação a na LHA (tuberal e posterior), os resultados mostram que animais sedentários ou treinados na fase proliferativa e animais com o balanço energético negativo, resultante do treinamento físico intenso aliado a restrição alimentar apresentaram um padrão de expressão do ppMCH mais elevado. Sabemos que o MCH é um peptídeo orexígeno expresso principalmente na LHA e IHy (Bittencourt et al., 1992; Qu et al., 1996; Rossi et al., 1997). Entretanto, uma análise das projeções da IHy mostra que essa região não deve atuar diretamente no controle do comportamento alimentar como faz a LHA (Sita et al., 2007). Dessa forma, o MCH oriundo da LHA mostra ter relação com o estímulo da fome, de forma a restabelecer o balanço energético nas condições do presente estudo. Embora não tenhamos observado diferenças entre a expressão do ppMCH na LHA entre animais sedentários alimentados ou restritos, como de consenso e já estabelecido na literatura (Presse et al., 1996; Rossi et al., 1997), vale ressaltar que estes estudos são acerca da resposta do MCH frente uma restrição alimentar aguda.

Frente a uma restrição alimentar crônica Johansson et al. (2008) relatam em seu estudo que mediu a expressão de diversos neuropeptídeos cerebrais, envolvidos com o controle do peso corporal e comportamento alimentar, por PCR em tempo real, que a expressão do MCH não é afeta quando comparado com grupos controles (sem restrição alimentar) e grupo submetido a restrição alimentar aguda (48 h). Embora não evidencie diferenças estatísticas entre esses grupos, a expressão do MCH se mostrou menor no grupo submetido à restrição alimentar crônica. Por outro lado, no mesmo estudo, a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) foi afetada, sendo maior nos grupos submetidos à restrição alimentar (aguda ou crônica) quando comparados ao grupo controle. Embora sem diferenças estatísticas, o grupo submetido à restrição alimentar crônica, mostrou uma expressão um pouco mais elevada, do que o grupo submetido à restrição alimentar aguda.

Neste tocante vale ressaltar alguns estudos que apontam para uma ação compensatória e/ou busca por alimentos induzida pelo MCH, e não o estímulo a fome propriamente dito, como exercido pelo NPY (o mais potente neuropeptídeo

indutor da fome). Mul et al. (2011) em um elegante estudo, ressaltam a ação do MCH ligada a aspectos motivacionais em relação ao comportamento alimentar.

A LHA e o núcleo accumbens shell (AcbSh) formam um circuito hipotalâmico-límbico que atua no comportamento alimentar mediado pelo MCH, o qual atua no AcbSh através dos receptores MCH-1R, embora essa ação não tenha sido completamente caracterizada. O AcbSh exerce um papel fundamental dentro dos sistemas neurais que medeiam a motivação e a recompensa (Chung et al., 2009; Farrar et al., 2010; Hope et al., 2005; Kelley, 2004; Stratford et al., 1997). As vias de recompensa, além de estarem envolvidas em quadros de drogas ativas, também são exigidas no direcionamento da motivação pelo alimento (Kelley, 2004; Saper et al., 2002). Frente a isso, Mul et al. (2011) mostraram que ratos *knockout* para o ppMCH apresentam uma diminuição da ingestão alimentar, predominantemente por meio de uma redução no tamanho da refeição durante o seu desenvolvimento, na vida adulta é reduzido o reforço para o consumo de alimentos com alto teor de gordura.

Além disso, a administração aguda do neuropeptídeo ácido glutâmico-ileucina (NEI) e do neuropeptídeo ácido glutâmico-glicina (NGE), ambos derivados do mesmo precursor do MCH, o ppMCH, ou a infusão icv crônica de NEI, não afetou o comportamento alimentar em ratos adultos *knockout* ou não para o ppMCH, embora a administração aguda de MCH no AcbSh de ratos adultos *knockout* para o ppMCH causa elevação do comportamento alimentar, assim como, em ratos controles. Em adição, os ratos *knockout* ainda mostram maior liberação de dopamina, e aumento do nível do seu transporte límbico, indicando que a deleção do gene do ppMCH afeta o sistema dopaminérgico límbico. Tais constatações sustentam o sistema MCH–MCH-1R como um amplificador do comportamento de consumo. Assim, sugere-se que o MCH medeia positivamente a sinalização do AcbSh, afetando aspectos motivacionais do comportamento alimentar (Mul et al., 2011).

Dessa forma, o MCH se mostra como um sinal crucial pelo qual os circuitos neurais hipotalâmicos controlam o balanço energético e guiam áreas do sistema límbico para melhorar os aspectos motivacionais ou de incentivo relacionados ao consumo de alimentos (Mul et al., 2011).

De acordo com o presente estudo, supomos que o balanço energético negativo, gerado do exercício físico intenso aliado a restrição alimentar, levou a perda de peso, sobretudo de TAB, conseqüentemente diminuindo a concentração circulante de leptina, que sabidamente atua na LHA, deixando de inibir suficientemente os neurônios orexígenos, com isso temos uma alta expressão e secreção do ppMCH, que levaria ao estímulo de comportamentos motivacionais ou de incentivo a busca de alimento, ou seja, na LHA a leptina e o MCH atuariam de forma antagônicas.

Sendo assim, em situações de balanço energético negativo, seria sábio do organismo o estímulo a busca do alimento, ao invés, do estímulo a procriação, isso corrobora com os achados e pressupostos do presente estudo.

6 CONCLUSÃO

*"Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei,
Ou nada sei
Conhecer as manhas
E as manhãs
O sabor das massas
E das maçãs
É preciso amor
Pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir
Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente
Compreender a marcha
E ir tocando em frente...*

(Almir Sater)

De acordo com os resultados obtidos, e frente aos objetivos propostos, pode-se concluir que:

- 1) A leptina exerce forte influencia no eixo reprodutor feminino, e tal ação parece ter envolvimento do MCH;
- 2) O MCH proveniente da IHy está envolvido com as ações da leptina no eixo reprodutor feminino;
- 3) O MCH oriundo da LHA tem relação com o estímulo a busca de alimento;
- 4) A ação biológica do TAB pode sofrer alterações quando o organismo é exposto a um balanço energético negativo drástico.

REFERÊNCIAS

*"Mestre não é quem ensina,
Mas quem de repente aprende".*

(Guimarães Rosa)

REFERÊNCIAS*

Abner SR, Guenthner PC, Guarner J, Hancock KA, Cummins JE, Jr., Fink A, Gilmore GT, Staley C, Ward A, Ali O, Binderow S, Cohen S, Grohskopf LA, Paxton L, Hart CE, Dezzutti CS. A human colorectal explant culture to evaluate topical microbicides for the prevention of HIV infection. *J Infect Dis.* 2005;192(9):1545-56.

Adler SS, Afanasiev S, Aidala C, Ajitanand NN, Akiba Y, Alexander J, Amirikas R, Aphecetche L, Aronson SH, Averbeck R. Measurement of transverse single-spin asymmetries for midrapidity production of neutral pions and charged hadrons in polarized p + p collisions at square root(s) = 200 GeV. *Phys Rev Lett.* 2005; 95(20):202-11.

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 1996;382(6588):250-2.

Alessio HM, Hagerman AE, Nagy S, Philip B, Byrnes RN, Woodward JL, Callahan P, Wiley RL. Exercise improves biomarkers of health and stress in animals fed ad libitum. *Physiol Behav.* 2005;84(1):65-72.

Ambler C, Eliakim A, Brasel JA, Lee WN, Burke G, Cooper DM. Fitness and the effect of exercise training on the dietary intake of healthy adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998;22(4):354-62.

Ambler J, Baker E, Brown L, Butler P, Farr D, Dunnet K, Le Grand D, Janus D, Jones D, Menear K, Mercer M, Smith G, Talbot M, Tweed M. The discovery of orally available thrombin inhibitors: studies towards the optimisation of CGH1668. *Bioorg Med Chem Lett.* 1998;8(24):3583-8.

Andersson B, Xu XF, Rebuffe-Scrive M, Terning K, Krotkiewski M, Bjorntorp P. The effects of exercise, training on body composition and metabolism in men and women. *Int J Obes.* 1991;15(1):75-81.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Andrico S, Gambera A, Specchia C, Pellegrini C, Falsetti L, Sartori E. Leptin in functional hypothalamic amenorrhoea. *Hum Reprod*. 2002;17(8):2043-8.

Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361(1471):1251-63.

Attademo AM, Rondini TA, Rodrigues BC, Bittencourt JC, Celis ME, Elias CF. Neuropeptide glutamic acid-isoleucine may induce luteinizing hormone secretion via multiple pathways. *Neuroendocrinology*. 2006;83(5-6):313-24.

Attademo AM, Sanchez-Borzone M, Lasaga M, Celis ME. Intracerebroventricular injection of neuropeptide EI increases serum LH in male and female rats. *Peptides*. 2004;25(11):1995-9.

Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau J-P, Bortoluzzi M-N, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millos M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJM. The stomach is a source of leptin. *Nature*. 1998;395:790-3.

Batterson KD, Southard KA, Dawson DV, Staley RN, Qian F, Slayton RL. The effect of chronic methylphenidate administration on tooth maturation in a sample of Caucasian children. *Pediatr Dent*. 2005;27(4):292-7.

Bauer M, Glenn T, Grof P, Rasgon N, Alda M, Marsh W, Sagduyu K, Schmid R, Adli M, Whybrow PC. Comparison of sleep/wake parameters for self-monitoring bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2009a;116(3):170-5.

Bauer M, Glenn T, Grof P, Rasgon NL, Marsh W, Sagduyu K, Alda M, Lewitzka U, Sasse J, Kozuch-Krolik E, Whybrow PC. Frequency of subsyndromal symptoms and employment status in patients with bipolar disorder. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 2009b;44(7):515-22.

Bauer M, Glenn T, Grof P, Rasgon NL, Marsh W, Sagduyu K, Alda M, Murray G, Quiroz D, Malliaris Y, Sasse J, Pilhatsch M, Whybrow PC. Relationship among latitude, climate, season and self-reported mood in bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2009c;116(1-2):152-7.

Bauer M, Glenn T, Whybrow PC, Grof P, Rasgon N, Alda M, Marsh W, Sagduyu K, Schmid R, Adli M. Changes in self-reported sleep duration predict mood changes in bipolar disorder. *Psychol Med*. 2008a;38(7):1069-71.

Bauer M, Wilson T, Neuhaus K, Sasse J, Pfennig A, Lewitzka U, Grof P, Glenn T, Rasgon N, Bschor T, Whybrow PC. Self-reporting software for bipolar disorder: validation of ChronoRecord by patients with mania. *Psychiatry Res.* 2008b;159(3):359-66.

Belmonte M, Aoki M. Triacilglicerol intramuscular: um importante substrato energético para o exercício de endurance. *Rev Bras Med Esporte.* 2005;11(2):135-40.

Benatti F, Lancha Junior A. Leptina e exercício físico aeróbio: implicações da adiposidade corporal e insulina. *Rev Bras Med Esporte.* 2007;13(4):263-9.

Benoit AG, Campbell BI, Tanner JR, Staley JD, Wallbridge HR, Biehl DR, Bradley BD, Louridas G, Guzman RP, Fromm RA. Risk factors and prevalence of perioperative cognitive dysfunction in abdominal aneurysm patients. *J Vasc Surg.* 2005;42(5):884-90.

Bertevello PS, Seelaender MC. Heterogeneous response of adipose tissue to cancer cachexia. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34(9):1161-7.

Bing C, Taylor S, Tisdale MJ, Williams G. Cachexia in MAC16 adenocarcinoma: suppression of hunger despite normal regulation of leptin, insulin and hypothalamic neuropeptide Y. *J Neurochem.* 2001;79(5):1004-12.

Bittencourt J, Celis ME. Anatomy, function and regulation of neuropeptide EI (NEI). *Peptides.* 2008;29(8):1441-50.

Bittencourt JC, Elias CF. 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 Res.* 1998;805(1-2):1-19.

Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol.* 1992;319(2):218-45.

Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(9):3419-23.

Born JM, Lemmens SG, Martens MJ, Formisano E, Goebel R, Westerterp-Plantenga MS. Differences between liking and wanting signals in the human brain and relations with cognitive dietary restraint and body mass index. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(2):392-403.

Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, Marzabadi MR, DeLeon J, Lagu B, Heurich R, Lichtblau H, Shaposhnik Z, Daniewska I, Blackburn TP, Branchek TA, Gerald C, Vaysse PJ, Forray C. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med*. 2002;8(8):825-30.

Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T. Hypocretin/Orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*. 1998;402:460-74.

Broeder CE, Burrhus KA, Svanevik LS, Wilmore JH. The effects of either high-intensity resistance or endurance training on resting metabolic rate. *Am J Clin Nutr*. 1992;55(4):802-10.

Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol*. 1978;45(6):1009-15.

Bouret SG, Simerly RB. Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology*. 2004;145(6):2621-6

Brown DR, Berkowitz DE, Breslow MJ. Weight loss is not associated with hyperleptinemia in humans with pancreatic cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(1):162-6.

Buchholz WG, Teng W, Wallace D, Ambler JR, Hall TC. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* subspecies japonica cv. Taipei 309). *Methods Mol Biol*. 1998;81:383-96.

Bullen BA, Skrinar GS, Beitins IZ, von Mering G, Turnbull BA, McArthur JW. Induction of menstrual disorders by strenuous exercise in untrained women. *N Engl J Med*. 1985;312(21):1349-53.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 1995;269(5223):546-9.

Casatti CA, Elias CF, Sita LV, Frigo L, Furlani VC, Bauer JA, Bittencourt JC. Distribution of melanin-concentrating hormone neurons projecting to the medial mammillary nucleus. *Neuroscience*. 2002;115(3):899-915.

Castaing M, Duvillie B, Quemeneur E, Basmaciogullari A, Scharfmann R. Ex vivo analysis of acinar and endocrine cell development in the human embryonic pancreas. *Dev Dyn*. 2005;234(2):339-45.

Caston AL, Farrell PA, Deaver DR. Exercise training-induced changes in anterior pituitary gonadotrope of the female rat. *J Appl Physiol*. 1995; 79(1): 194-201

Chance WT, Sheriff S, Moore J, Peng F, Balasubramaniam A. Reciprocal changes in hypothalamic receptor binding and circulating leptin in anorectic tumor-bearing rats. *Brain Res*. 1998;803(1-2):27-33.

Chiocchio SR, Gallardo MG, Louzan P, Gutnisky V, Tramezzani JH. Melanin-concentrating hormone stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone and gonadotropins in the female rat acting at both median eminence and pituitary levels. *Biol Reprod*. 2001;64(5):1466-72.

Chung S, Hopf FW, Nagasaki H, Li CY, Belluzzi JD, Bonci A, Civelli O. The melanin-concentrating hormone system modulates cocaine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(16):6772-7.

Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci*. 2008;28(35):8691-7.

Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2006;147(12):5817-25.

Cohen P, Zhao C, Cai X, Montez JM, Rohani SC, Feinstein P, Mombaerts P, Friedman JM. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1113-21.

Couillard C, Mauriege P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C, Despres JP. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(6):782-8.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334(5):292-5.

Conti C. Revisión anatómica y funcional del aparato reproductor del ratón. Madrid: Ciemat. Avda; 2001. (Serie Ponencias).

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001;411(6836):480-4.

Crown A, Clifton DK, Steiner RA. Neuropeptide signaling in the integration of metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology*. 2007;86(3):175-82

Cumming DC, Wheeler GD, Harber VJ. Physical activity, nutrition, and reproduction. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;709:55-76.

Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod*. 1999;60(2):216-22.

Cvetkovic V, Brischoux F, Griffond B, Bernard G, Jacquemard C, Fellmann D, Risold PY. Evidence of melanin-concentrating hormone-containing neurons supplying both cortical and neuroendocrine projections. *Neuroscience*. 2003;116(1):31-5.

de Luca C, Kowalski TJ, Zhang Y, Elmquist JK, Lee C, Kilimann MW, Ludwig T, Liu SM, Chua SC. Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3484-93.

De Souza MJ, Van Heest J, Demers LM, Lasley BL. Luteal phase deficiency in recreational runners: evidence for a hypometabolic state. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(1):337-46.

Dimarco NM, Dart L, Sanborn CB. Modified activity-stress paradigm in an animal model of the female athlete triad. *J Appl Physiol*. 2007;103(5):1469-78.

Donato J, Jr., Cravo RM, Frazao R, Gautron L, Scott MM, Lachey J, Castro IA, Margatho LO, Lee S, Lee C, Richardson JA, Friedman J, Chua S, Jr., Coppari R, Zigman JM, Elmquist JK, Elias CF. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J Clin Invest.* 2011;121(1):355-68.

Donato J, Jr., Silva RJ, Sita LV, Lee S, Lee C, Lacchini S, Bittencourt JC, Franci CR, Canteras NS, Elias CF. The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion. *J Neurosci.* 2009;29(16):5240-50.

Dos Santos ZA, Da Silva RJ, Bacurau RF, Tirapegui J, Ribeiro SM. Effect of food restriction and intense physical training on estrous cyclicity and plasma leptin concentrations in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2011;57(1):1-8.

Douchi T, Oki T, Kosha S, Nakamura S, Ijuin H, Yamamoto S, Noguchi S, Nagata Y. Effects of weight loss on bone mineral density in rats. *J Obstet Gynaecol Res.* 1996;22(3):293-8.

Dubuc GR, Phinney SD, Stern JS, Havel PJ. Changes of serum leptin and endocrine and metabolic parameters after 7 days of energy restriction in men and women. *Metabolism.* 1998;47(4):429-34.

Dudek FE, Staley KJ. Chronic cortical injury and epileptogenesis: a possible role for intracellular chloride homeostasis. *Epilepsy Curr.* 2005;5(6):239-40.

Dumalska I, Wu M, Morozova E, Liu R, van den Pol A, Alreja M. Excitatory effects of the puberty-initiating peptide kisspeptin and group I metabotropic glutamate receptor agonists differentiate two distinct subpopulations of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci.* 2008;28(32):8003-13.

Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med.* 2005;11(11):1205-13.

Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev.* 1998;19(2):101-43.

Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 2005;352(12):1223-36.

Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocr Rev.* 1995;16(3):322-53.

Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron.* 1998a;21(6):1375-85.

Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *Journal of Comparative Neurology.* 1998b;28;402(4):442-59.

Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron.* 1999;23(4):775-86.

Elias CF, Bittencourt JC. Study of the origins of melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI immunoreactive projections to the periaqueductal gray matter. *Brain Res.* 1997;755(2):255-71.

Elias CF, Sita LV, Zambon BK, Oliveira ER, Vasconcelos LA, Bittencourt JC. Melanin-concentrating hormone projections to areas involved in somatomotor responses. *J Chem Neuroanat.* 2008;35(2):188-201.

Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol.* 1998;395(4):535-47.

Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron.* 1999;22(2):221-32.

Elvin JA, Matzuk MM. Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod.* 1998;3(3):183-95.

Farrar AM, Segovia KN, Randall PA, Nunes EJ, Collins LE, Stopper CM, Port RG, Hockemeyer J, Muller CE, Correa M, Salamone JD. Nucleus accumbens and effort-related functions: behavioral and neural markers of the interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *Neuroscience.* 2010;166(4):1056-67.

Ferin MJ. The menstrual cycle and integrative view. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, eds. *Reproductive endocrinology, surgery and technology.* Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:103–21.

Fisher JS, Van Pelt RE, Zinder O, Landt M, Kohrt WM. Acute exercise effect on postabsorptive serum leptin. *J Appl Physiol*. 2001;91(2):680-6.

Frankovich RJ, Lebrun CM. Menstrual cycle, contraception, and performance. *Clin Sports Med*. 2000;19(2):251-71.

Freeman M. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Neil J, editor. *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*. Boston: Elsevier; 2006.p. 2283-388.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(3):847-50.

Frisch RE, McArthur JW. Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science*. 1974; 185(4155):949-51.

Gallardo MG, Chiocchio SR, Tramezzani JH. Changes of melanin-concentrating hormone related to LHRH release in the median eminence of rats. *Brain Res*. 2004;1030(1):152-8.

Gao Q, Horvath TL. Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(5):E817-26.

Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi CS, Bechmann I, Leranth C, Toran-Allerand D, Priest CA, Roberts JL, Gao XB, Mobbs C, Shulman GI, Diano S, Horvath TL. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med*. 2007;13(1):89-94.

Garaulet M, Perex-Llamas F, Fuente T, Zamora S, Tebar FJ. Anthropometric, computed tomography and fat cell data in an obese population: relationship with insulin, leptin, tumor necrosis factor-alpha, sex hormone-binding globulin and sex hormones. *Eur J Endocrinol*. 2000;143(5):657-66.

Gavrila A, Chan JL, Miller LC, Heist K, Yiannakouris N, Mantzoros CS. Circulating melanin-concentrating hormone, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone levels in relation to body composition: alterations in response to food deprivation and recombinant human leptin administration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(2):1047-54.

Goldsmith CE, Moore JE, Murphy PG, Ambler JE. Increased incidence of ciprofloxacin resistance in penicillin-resistant pneumococci in Northern Ireland. *J Antimicrob Chemother.* 1998;41(3):420-1.

Gonzalez MI, Baker BI, Wilson CA. Stimulatory effect of melanin-concentrating hormone on luteinising hormone release. *Neuroendocrinology.* 1997;66(4):254-62.

Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides.* 2009;30(1):4-9.

Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(16):8878-83.

Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, Deitel M. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med.* 1995;1(9):953-6.

Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci.* 2005;25(49):11349-56.

Hegyi K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int.* 2004;28(3):159-69.

Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(5):E827-32.

Hope BT, Crombag HS, Jedynak JP, Wise RA. Neuroadaptations of total levels of adenylate cyclase, protein kinase A, tyrosine hydroxylase, cdk5 and neurofilaments in the nucleus accumbens and ventral tegmental area do not correlate with expression of sensitized or tolerant locomotor responses to cocaine. *J Neurochem.* 2005;92(3):536-45.

Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME. The biology of leptin: a review. *J Anim Sci.* 1998;76(5):1405-20.

Howell OW, Doyle K, Goodman JH, Scharfman HE, Herzog H, Pringle A, Beck-Sickinger AG, Gray WP. Neuropeptide Y stimulates neuronal precursor proliferation in the post-natal and adult dentate gyrus. *J Neurochem.* 2005;93(3):560-70.

Huang L, Li C. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res.* 2000;10(2):81-92.

Huang L, Wang Z, Li C. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem.* 2001;276(9):6343-9.

Hulver MW, Houmard JA. Plasma leptin and exercise: recent findings. *Sports Med.* 2003;33(7):473-82.

Hursel R, Rutters F, Gonnissen HK, Martens EA, Westerterp-Plantenga MS. Effects of sleep fragmentation in healthy men on energy expenditure, substrate oxidation, physical activity, and exhaustion measured over 48 h in a respiratory chamber. *Am J Clin Nutr.* 2011a.

Hursel R, Viechtbauer W, Dulloo AG, Tremblay A, Tappy L, Rumpler W, Westerterp-Plantenga MS. The effects of catechin rich teas and caffeine on energy expenditure and fat oxidation: a meta-analysis. *Obes Rev.* 2011b;12(7):e573-81.

Huston L, Wojtys E. Gender difference found in lower extremity muscle functions. *Orthopaedics Today.* 1996;16(20):16-20.

Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology.* 2004;80(4):264-72.

Jennings GL, Chin-Dusting JP, Kingwell BA, Dart AM, Cameron J, Esler M, Lewis TV. Modulation of vascular function by diet and exercise. *Clin Exp Hypertens.* 1997;19(5-6):727-37.

Jeukendrup AE. Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;967:217-35.

Johansson A, Fredriksson R, Winnergren S, Hulting AL, Schioth HB, Lindblom J. The relative impact of chronic food restriction and acute food deprivation on plasma hormone levels and hypothalamic neuropeptide expression. *Peptides.* 2008;29(9):1588-95.

Junqueira L, Carneiro J. *Histologia Básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Kelley AE. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004;27(8):765-76.

King JA, Millar RP. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. I. Structural determination on partially purified material. *J Biol Chem.* 1982;257(18):10722-8.

King NA, Burley VJ, Blundell JE. Exercise-induced suppression of appetite: effects on food intake and implications for energy balance. *Eur J Clin Nutr.* 1994;48(10):715-24.

King NA, Lluch A, Stubbs RJ, Blundell JE. High dose exercise does not increase hunger or energy intake in free living males. *Eur J Clin Nutr.* 1997a;51(7):478-83.

King NA, Tremblay A, Blundell JE. Effects of exercise on appetite control: implications for energy balance. *Med Sci Sports Exerc.* 1997b;29(8):1076-89.

Kingwell BA, Jennings GL. The exercise prescription: focus on vascular mechanisms. *Blood Press Monit.* 1997;2(3):139-45.

Kissileff HR, Pi-Sunyer FX, Segal K, Meltzer S, Foelsch PA. Acute effects of exercise on food intake in obese and nonobese women. *Am J Clin Nutr.* 1990;52(2):240-5.

Knollema S, Brown ER, Vale W, Sawchenko PE. Novel hypothalamic and preoptic sites of prepro-melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic Acid and Peptide expression in lactating rats. *J Neuroendocrinol.* 1992;4(6):709-17.

Kohrt WM, Landt M, Birge SJ, Jr. Serum leptin levels are reduced in response to exercise training, but not hormone replacement therapy, in older women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(11):3980-5.

Kokkotou EG, Tritos NA, Mastaitis JW, Flier EM. Melanin-concentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain. *Endocrinology.* 2001;142(2):680-6.

Landt M, Lawson GM, Helgeson JM, Davila-Roman VG, Ladenson JH, Jaffe AS, Hickner RC. Prolonged exercise decreases serum leptin concentrations. *Metabolism.* 1997;46(10):1109-12.

Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Chase MH, Monti JM. Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res.* 2009;1265:103-10.

Leal-Cerro A, Garcia-Luna PP, Astorga R, Parejo J, Peino R, Dieguez C, Casanueva FF. Serum leptin levels in male marathon athletes before and after the marathon run. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(7):2376-9.

Lee WS, Smith MS, Hoffman GE. Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(13):5163-7.

Lima-Silva A, Adami F, Nakamura F, Oliveira F, Gevaerd M. Metabolismo de gordura durante o exercício físico: mecanismos de regulação. *Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano.* 2006;8(4):106-14.

Liao WX, Roy AC, Chan C, Arulkumaran S, Ratnam SS. A new molecular variant of luteinizing hormone associated with female infertility. *Fertil Steril.* 1998;69(1):102-6.

Lluch A, King NA, Blundell JE. Exercise in dietary restrained women: no effect on energy intake but change in hedonic ratings. *Eur J Clin Nutr.* 1998;52(4):300-7.

Lluch A, King NA, Blundell JE. No energy compensation at the meal following exercise in dietary restrained and unrestrained women. *Br J Nutr.* 2000;84(2):219-25.

Lo BP, Hebert C, McClean A. The female athlete triad no pain, no gain? *Clin Pediatr (Phila).* 2003;42(7):573-80.

Loucks AB, Heath EM. Dietary restriction reduces luteinizing hormone (LH) pulse frequency during waking hours and increases LH pulse amplitude during sleep in young menstruating women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78(4):910-5

Loucks AB, Verdun M, Heath EM. Low energy availability, not stress of exercise, alters LH pulsatility in exercising women. *J Appl Physiol.* 1998;84(1):37-46.

Machado AP, Costa Rosa LF, Seelaender MC. Adipose tissue in Walker 256 tumour-induced cachexia: possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration. *Cell Tissue Res.* 2004;318(3):503-14.

Mackenzie FJ, Hunter AJ, Daly C, Wilson CA. Evidence that the dopaminergic incerto-hypothalamic tract has a stimulatory effect on ovulation and gonadotrophin release. *Neuroendocrinology*. 1984;39(4):289-95.

Mackenzie FJ, James MD, Wilson CA. Changes in dopamine activity in the zona incerta (ZI) over the rat oestrous cycle and the effect of lesions of the ZI on cyclicity: further evidence that the incerto-hypothalamic tract has a stimulatory role in the control of LH release. *Brain Res*. 1988;444(1):75-83.

Mantoanelli G, Vitale M, Amancio O. Amenorréia e osteoporose em adolescentes atletas. *Revista Nutrição*. 2002;15(3):319-32.

Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med*. 1999;130(8):671-80.

Marcondes F, Bianchi F, Tanno A. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Revista Brasileira de Biologia*. 2002;62(4a):609-14.

Margetts B. FAO/WHO launch expert report on diet, nutrition and prevention of chronic diseases. *Public Health Nutr*. 2003;6(4):323-5.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*. 1997;3(9):1029-33.

Mattsson C, Olsson T. Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose tissue metabolism. *Curr Med Chem*. 2007;14(27):2918-24.

Mayes JS, Watson GH. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev*. 2004;5(4):197-216.

McBride RB, Beckwith BE, Swenson RR, Sawyer TK, Hadley ME, Matsunaga TO, Hruby VJ. The actions of melanin-concentrating hormone (MCH) on passive avoidance in rats: a preliminary study. *Peptides*. 1994;15(4):757-9.

McCloskey DP, Croll SD, Scharfman HE. Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures. *J Neurosci*. 2005;25(39):8889-97.

Merry BJ, Holehan AM. The endocrine response to dietary restriction in the rat. *Basic Life Sci.* 1985;35:117-41.

Miller KK, Parulekar MS, Schoenfeld E, Anderson E, Hubbard J, Klibanski A, Grinspoon SK. Decreased leptin levels in normal weight women with hypothalamic amenorrhea: the effects of body composition and nutritional intake. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(7):2309-12.

Mircea CN, Lujan ME, Pierson RA. Metabolic fuel and clinical implications for female reproduction. *J Obstet Gynaecol Can.* 2007;29(11):887-902.

Monget P, Martin GB. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Hum Reprod.* 1997;12 (Suppl 1):33-52.

Monzon ME, De Barioglio SR. Response to novelty after i.c.v. injection of melanin-concentrating hormone (MCH) in rats. *Physiol Behav.* 1999;67(5):813-7.

Monzon ME, de Souza MM, Izquierdo LA, Izquierdo I, Barros DM, de Barioglio SR. Melanin-concentrating hormone (MCH) modifies memory retention in rats. *Peptides.* 1999;20(12):1517-9.

Moses AG, Dowidar N, Holloway B, Waddell I, Fearon KC, Ross JA. Leptin and its relation to weight loss, ob gene expression and the acute-phase response in surgical patients. *Br J Surg.* 2001;88(4):588-93.

Mul JD, la Fleur SE, Toonen PW, Afrasiab-Middelmann A, Binnekade R, Schetters D, Verheij MM, Sears RM, Homberg JR, Schoffeleer AN, Adan RA, DiLeone RJ, De Vries TJ, Cuppen E. Chronic loss of melanin-concentrating hormone affects motivational aspects of feeding in the rat. *PLoS One.* 2011;6(5):e19600.

Murray JF, Adan RA, Walker R, Baker BI, Thody AJ, Nijenhuis WA, Yukitake J, Wilson CA. Melanin-concentrating hormone, melanocortin receptors and regulation of luteinizing hormone release. *J Neuroendocrinol.* 2000a;12(3):217-23.

Murray JF, Baker BI, Levy A, Wilson CA. The influence of gonadal steroids on pre-pro melanin-concentrating hormone mRNA in female rats. *J Neuroendocrinol.* 2000b;12(1):53-9.

Murray JF, Hahn JD, Kennedy AR, Small CJ, Bloom SR, Haskell-Luevano C, Coen CW, Wilson CA. Evidence for a stimulatory action of melanin-concentrating

hormone on luteinising hormone release involving MCH1 and melanocortin-5 receptors. *J Neuroendocrinol.* 2006;18(3):157-67.

Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Mobbs CV, Yang XJ, Clegg DJ, Kaplitt MG, Ogawa S. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(7):2501-6.

Murthy MS, Pande SV. Malonyl-CoA-sensitive and -insensitive carnitine palmitoyltransferase activities of microsomes are due to different proteins. *J Biol Chem.* 1994;269(28):18283-6.

Nahon JL, Presse F, Breton C, Hervieu G, Schorpp M. Structure and regulation of the melanin-concentrating hormone gene. *The Melanotropic Peptides.* 1993; 680:111-29.

Nahon JL, Presse F, Vaughan J, Fischer W, Bittencourt JC, Hoeger C, Schoepfer R, Rivier J, Sawchenko PE, Vale W. Characterization of mammalian melanin concentrating hormones and their precursors. *Recent Advances in Basic and Clinical Neuroendocrinology.* 1989;15-23.

Nakamura S, Tsumori T, Yokota S, Oka T, Yasui Y. Amygdaloid axons innervate melanin-concentrating hormone- and orexin-containing neurons in the mouse lateral hypothalamus. *Brain Res.* 2009;1278:66-74.

Negrão A, Licinio J, Mantzoros C, Wong M, Palladino N, Paula C, Laura G, Philip W. Diferenças na secreção diária de leptina em homens e mulheres: possíveis implicações na neuroendocrinologia dos transtornos alimentares. *Revista de psiquiatria Clínica.* 1998;25(4):184-90.

Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, Strauss JF, 3rd, McAllister JM. The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(12):5925-33.

Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15(8):362-9.

Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev.* 2009;30(6):713-43.

Ohkura S, Tanaka T, Nagatani S, Bucholtz DC, Tsukamura H, Maeda K, Foster DL. Central, but not peripheral, glucose-sensing mechanisms mediate glucoprivic suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the sheep. *Endocrinology*. 2000;141(12):4472-80.

Ostlund RE, Jr., Yang JW, Klein S, Gingerich R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(11):3909-13.

Pardini D. Alterações Hormonais da mulher atleta. *Arq. Bras. Endocrinol Metab*. 2001;45(4):343-51.

Pasman WJ, Westerterp-Plantenga MS, Saris WH. The effect of exercise training on leptin levels in obese males. *Am J Physiol*. 1998;274(2 Pt 1):E280-6.

Pereira-da-Silva M, Torsoni MA, Nourani HV, Augusto VD, Souza CT, Gasparetti AL, Carneiro EM, Velloso LA. Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology*. 2003;144(11):4831-40.

Perusse L, Collier G, Gagnon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Nadeau A, Zimmet PZ, Bouchard C. Acute and chronic effects of exercise on leptin levels in humans. *J Appl Physiol*. 1997;83(1):5-10.

Pfister, G. Women and the Olympic Games: 1900 – 97 . In: Drinkwater, B. Women and Sport. The Encyclopedia of Sports Medicine. An IOC Medical Commission. Publication in collaboration with the International Federation of Sports Medicine. Oxford: Blackwell Science; 2000.

Pielecka-Fortuna J, Chu Z, Moenter SM. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology*. 2008;149(4):1979-86.

Pinheiro A, Freitas S, Corso A. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Rev. Nutr*. 2004;17(4):523-33.

Pinto B, Picard D, Reali D. A recombinant yeast strain as a short term bioassay to assess estrogen-like activity of xenobiotics. *Ann Ig*. 2004;16(4):579-85.

Pissios P, Bradley RL, Maratos-Flier E. Expanding the scales: The multiple roles of MCH in regulating energy balance and other biological functions. *Endocr Rev.* 2006;27(6):606-20.

Popkin BM. The nutrition transition and obesity in the developing world. *J Nutr.* 2001;131(3):871S-3S.

Pond CM. Physiological specialisation of adipose tissue. *Prog Lipid Res.* 1999;38(3):225-48.

Pond CM. Paracrine relationships between adipose and lymphoid tissues: implications for the mechanism of HIV-associated adipose redistribution syndrome. *Trends Immunol.* 2003;24(1):13-8.

Presse F, Sorokovsky I, Max JP, Nicolaidis S, Nahon JL. Melanin-concentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food-deprivation and glucopenia in the rat. *Neuroscience.* 1996;71(3):735-45.

Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature.* 1996;380(6571):243-7.

Racette SB, Coppack SW, Landt M, Klein S. Leptin production during moderate-intensity aerobic exercise. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(7):2275-7.

Ranallo RF, Rhodes EC. Lipid metabolism during exercise. *Sports Med.* 1998;26(1):29-42.

Rehm S, Solleveld HA, Portelli ST, Wier PJ. Histologic changes in ovary, uterus, vagina, and mammary gland of mature beagle dogs treated with the SERM idoxifene. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2007;80(3):225-32.

Ribeiro S, Santos Z, Silva R, Louzada E, Donato Junior J, J. T. Leptin: aspects on energetic balance, physical exercise and athletic amenorrhea. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2007;51(1):11-24.

Rondini TA, Donato J, Jr., Rodrigues Bde C, Bittencourt JC, Elias CF. Chemical identity and connections of medial preoptic area neurons expressing melanin-concentrating hormone during lactation. *J Chem Neuroanat.* 2010;39(1):51-62.

Rondini TA, Rodrigues Bde C, de Oliveira AP, Bittencourt JC, Elias CF. Melanin-concentrating hormone is expressed in the laterodorsal tegmental nucleus only in female rats. *Brain Res Bull.* 2007;74(1-3):21-8.

Rossi M, Choi SJ, O'Shea D, Miyoshi T, Ghatei MA, Bloom SR. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology.* 1997;138(1):351-5.

Rugh R. The mouse – Reproduction and development. Minneapolis: Oxford Science Publications; 1968.

Ryan AS, Pratley RE, Elahi D, Goldberg AP. Changes in plasma leptin and insulin action with resistive training in postmenopausal women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24(1):27-32.

Sahlin K, Harris RC. Control of lipid oxidation during exercise: role of energy state and mitochondrial factors. *Acta Physiol (Oxf).* 2008;194(4):283-91.

Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol.* 2001;435(1):26-40.

Salgado R. Caracterização de proteoglicanos do útero de camundongos durante o ciclo estral e em animais ovariectomizados: análise dos efeitos da castração e da reposição hormonal. [Tese (Doutorado em Biologia Molecular e Desenvolvimento)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Sampaio H. Aspectos nutricionais relacionados ao ciclo menstrual. *Rev Nutr.* 2002;15(3):309-17.

Sanghera MK, Anselmo-Franci J, McCann SM. Effect of medial zona incerta lesions on the ovulatory surge of gonadotrophins and prolactin in the rat. *Neuroendocrinology.* 1991;54(5):433-8.

Santos-Zavaleta A, Gama-Castro S, Perez-Rueda E. A comparative genome analysis of the RpoS sigma factor shows a high diversity of responses and origins. *Microbiology.* 2011;157(Pt 5):1393-401.

Santos ZA, Silva RJ, Bacurau RF, Tirapegui J, Ribeiro SM. Effect of food restriction and intense physical training on estrous cyclicity and plasma leptin concentrations in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2011;57(2):123-9.

Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*. 2002;36(2):199-211.

Sawchenko PE. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. *J Comp Neurol*. 1998;402(4):435-41.

Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy--a missing link? *Epilepsy Curr*. 2005;5(3):83-8.

Scharfman HE, Goodman JH, Rigoulot MA, Berger RE, Walling SG, Mercurio TC, Stormes K, Maclusky NJ. Seizure susceptibility in intact and ovariectomized female rats treated with the convulsant pilocarpine. *Exp Neurol*. 2005;196(1):73-86.

Schneider JE. Energy balance and reproduction. *Physiol Behav*. 2004;81(2):289-317.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661-71.

Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003;349(17):1614-27.

Simons JP, Schols AM, Campfield LA, Wouters EF, Saris WH. Plasma concentration of total leptin and human lung-cancer-associated cachexia. *Clin Sci (Lond)*. 1997;93(3):273-7.

Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC. Dopamine and melanin-concentrating hormone neurons are distinct populations in the rat rostromedial zona incerta. *Brain Res*. 2003;970(1-2):232-7.

Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC. Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system. *Neuroscience*. 2007;148(4):949-69.

Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*. 1975;96(1):219-26.

Smith MS, Grove KL. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Front Neuroendocrinol.* 2002;23(3):225-56.

Smith PM, Chambers AP, Price CJ, Ho W, Hopf C, Sharkey KA, Ferguson AV. The subfornical organ: a central nervous system site for actions of circulating leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(3):R512-20.

Soares M, Guimarães S. O papel da leptina e de seus receptores no metabolismo da gordura. [Dissertação (Mestrado)]. Cascavel, PR: Departamento de Ciências Biológicas da Universidade do Oeste do Paraná; 2001.

Soldani R, Cagnacci A, Yen SS. Insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II enhance basal and gonadotrophin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release from rat anterior pituitary cells in vitro. *Eur J Endocrinol.* 1994;131(6):641-5.

Staley K, Scharfman H. A woman's prerogative. *Nat Neurosci.* 2005;8(6):697-9.

Stratford TR, Holahan MR, Kelley AE. Injections of nociceptin into nucleus accumbens shell or ventromedial hypothalamic nucleus increase food intake. *Neuroreport.* 1997;8(2):423-6.

Takahashi K, Suzuki H, Totsune K, Murakami O, Satoh F, Sone M, Sasano H, Mouri T, Shibahara S. Melanin-concentrating hormone in human and rat. *Neuroendocrinology.* 1995;61(5):493-8.

Tanaka T, Nagatani S, Bucholtz DC, Ohkura S, Tsukamura H, Maeda K, Foster DL. Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. *Biol Reprod.* 2000;62(5):1256-61.

Tena-Sempere M. Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;314(2):164-9.

Thompson DA, Wolfe LA, Eikelboom R. Acute effects of exercise intensity on appetite in young men. *Med Sci Sports Exerc.* 1988;20(3):222-7.

Thong FS, Graham TE. Leptin and reproduction: is it a critical link between adipose tissue, nutrition, and reproduction? *Can J Appl Physiol.* 1999;24(4):317-36.

Tolosa E, Rodrigues C, Behmer O, Neto A. Manual de técnicas histológicas normal e patológica. São Paulo: Manole; 2003.

Tortorolo P, Sampogna S, Chase MH. MCHergic projections to the nucleus pontis oralis participate in the control of active (REM) sleep. *Brain Res.* 2009;1268:76-87.

Trayhurn P, Thomas ME, Duncan JS, Rayner DV. Effects of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett.* 1995;368(3):488-90.

Tritos NA, Maratos-Flier E. Two important systems in energy homeostasis: melanocortins and melanin-concentrating hormone. *Neuropeptides.* 1999;33(5):339-49.

Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;60(1):1-17.

Tsukamura H, Thompson RC, Tsukahara S, Ohkura S, Maekawa F, Moriyama R, Niwa Y, Foster DL, Maeda K. Intracerebroventricular administration of melanin-concentrating hormone suppresses pulsatile luteinizing hormone release in the female rat. *J Neuroendocrinol.* 2000a;12(6):529-34.

Tsukamura H, Tsukahara S, Maekawa F, Moriyama R, Reyes BA, Sakai T, Niwa Y, Foster DL. Peripheral or central administration of motilin suppresses LH release in female rats: a novel role for motilin. *J Neuroendocrinol.* 2000b;12(5):403-8.

Tsukamura M. Some memoranda on the diagnostic criteria of lung disease caused by *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2000;55(2):157-61.

Turgeon JL, Kimura Y, Waring DW, Mellon PL. Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol Endocrinol.* 1996;10(4):439-50.

Vaughan JM, Fischer WH, Hoeger C, Rivier J, Vale W. Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology.* 1989;125(3):1660-5,

Volpe SL, Kobusingye H, Bailur S, Stanek E. Effect of diet and exercise on body composition, energy intake and leptin levels in overweight women and men. *J Am Coll Nutr.* 2008;27(2):195-208.

Veldhorst MA, Westerterp KR, Westerterp-Plantenga MS. Gluconeogenesis and protein-induced satiety. *Br J Nutr.* 2011;1-6.

Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Leger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi PH. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci.* 2003;4:19.

Wade GN, Jones JE. Neuroendocrinology of nutritional infertility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(6):R1277-96.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000;21(6):697-738.

Wallace AM, Sattar N, McMillan DC. Effect of weight loss and the inflammatory response on leptin concentrations in gastrointestinal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 1998;4(12):2977-9.

Warren MP. Clinical review 40: Amenorrhea in endurance runners. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75(6):1393-7.

Waters SM, Krause JE. Letter re: melanin-concentrating hormone and energy balance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):6337.

Weimann E. Gender-related differences in elite gymnasts: the female athlete triad. *J Appl Physiol.* 2002;92(5):2146-52.

Westerterp-Plantenga MS. Effects of extreme environments on food intake in human subjects. *Proc Nutr Soc.* 1999;58(4):791-8.

Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol.* 2008;36(3):375-84.

Whybrow S, Horgan G, Stubbs RJ. Low-energy reporting and duration of recording period. *Eur J Clin Nutr.* 2008a;62(9):1148-50.

Whybrow S, Hughes DA, Ritz P, Johnstone AM, Horgan GW, King N, Blundell JE, Stubbs RJ. The effect of an incremental increase in exercise on appetite, eating behaviour and energy balance in lean men and women feeding ad libitum. *Br J Nutr.* 2008b;100(5):1109-15.

Wiggins DL, Wiggins ME. The female athlete. Clin Sports Med. 1997;16(4):593-612.

Williams NI, Helmreich DL, Parfitt DB, Caston-Balderrama A, Cameron JL. Evidence for a causal role of low energy availability in the induction of menstrual cycle disturbances during strenuous exercise training. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(11):5184-93.

Williamson-Hughes PS, Grove KL, Smith MS. Melanin concentrating hormone (MCH): a novel neural pathway for regulation of GnRH neurons. Brain Res. 2005;1041(2):117-24.

Wingkar KC. Alterations in feeding and sexual behaviour during reproductive cycle in female rats. Indian J Physiol Pharmacol. 1992;36(3):174-6.

Witkin JW, Paden CM, Silverman AJ. The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. Neuroendocrinology. 1982;35(6):429-38.

Wood GA, Fata JE, Watson KL, Khokha R. Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. Reproduction. 2007;133(5):1035-44.

Wu M, Dumalska I, Morozova E, van den Pol A, Alreja M. Melanin-concentrating hormone directly inhibits GnRH neurons and blocks kisspeptin activation, linking energy balance to reproduction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(40):17217-22.

Yamada M, Irahara M, Tezuka M, Murakami T, Shima K, Aono T. Serum leptin profiles in the normal menstrual cycles and gonadotropin treatment cycles. Gynecol Obstet Invest. 2000;49(2):119-23.

Yamashita A, Lira F, Lima W, Carnevali Júnior L, Gonçalves D, Tavares F, Seelaender M. Influência do treinamento físico aeróbio no transporte mitocondrial de ácidos graxos de cadeia longa no músculo esquelético: papel do complexo carnitina palmitoil transferase. . Rev. Bras. Med. Esporte. 2008;14(2):150-4.

Yamashita T, Murakami T, Otani S, Kuwajima M, Shima K. Leptin receptor signal transduction: OBRa and OBRb of fa type. Biochem Biophys Res Commun. 1998;246(3):752-9.

Yeager KK, Agostini R, Nattiv A, Drinkwater B. The female athlete triad: disordered eating, amenorrhea, osteoporosis. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25(7):775-7.

Zelevnik A, Pohl C. Control of Follicular Development, Corpus Luteum Function, the Maternal Recognition of Pregnancy, and the Neuroendocrine Regulation of the Menstrual Cycle in Higher Primates. In: Elsevier, editor. *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*. Boston: Knobil and Neill's; 2006. p2449-510.

Zhang S, Shiels IA, Ambler JS, Taylor SM. Pirfenidone reduces fibronectin synthesis by cultured human retinal pigment epithelial cells. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1998;26(Suppl 1):S74-6.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425-32.

ANEXOS

*"Ser cientista é ser pago para ser criança
o resto da vida"*

(Miguel Nicolelis)

ANEXO A – Treinamento físico

1ª SEMANA DE TREINAMENTO FÍSICO ADAPTAÇÃO												
Dia da semana	Segunda-feira		Terça-feira		Quarta-feira		Quinta-feira		Sexta-feira			
Nº sessões/dia	1		1		1		2		2		2	
Estágio (min)	2'	10'	3'	15'	2'	3'	10'	3'	6'	3'	3'	20'
Carga (km/h)	0,4	0,7	0,4	0,4	0,7	0,4	0,7	1,0	0,7	0,4	0,4	0,7
Tempo total de treino	15'		20'		25'		25'		30'		30'	

2ª SEMANA DE TREINAMENTO FÍSICO												
Dia da semana	Segunda-feira		Terça-feira		Quarta-feira		Quinta-feira		Sexta-feira			
Nº sessões/dia	2		2		2		2		2		2	
Estágio (min)	3'	10'	5'	2'	3'	10'	3'	5'	10'	2'	5'	10'
Carga (km/h)	0,4	0,7	1,0	0,4	0,4	0,7	1,0	0,7	0,4	0,4	0,4	0,7
Tempo total de treino	20'		25'		30'		35'		40'		40'	

3ª SEMANA DE TREINAMENTO FÍSICO												
Dia da semana	Segunda-feira		Terça-feira		Quarta-feira		Quinta-feira		Sexta-feira			
Nº sessões/dia	2		2		2		2		2		2	
Estágio (min)	5'	10'	10'	5'	3'	10'	15'	10'	2'	3'	10'	15'
Carga (km/h)	0,4	0,7	1,0	0,7	1,0	0,4	0,7	1,0	0,4	0,4	0,7	1,0
Tempo total de treino	40'		40'		45'		50'		55'		55'	

4ª a 5ª SEMANA DE TREINAMENTO FÍSICO												
Dia da semana	Todos os dias da semana											
Nº sessões/dia	2											
Estágio (min)	3'	5'	10'	6'	10'	5'	9'	8'	2'	2'	2'	2'
Carga (km/h)	0,4	0,7	1,0	1,2	1,0	1,2	1,0	0,8	0,7	0,4	0,7	0,4
Tempo total de treino	60'											

A carga e a velocidade atingidas na quarta semana foram mantidas até o final do período de treinamento.

Quadro 3: Protocolo de treinamento físico realizado pelos animais treinados (TA e TR) durante o protocolo experimental.

ANEXO B – Desenho experimental

Quadro 4: Desenho experimental, 2011.

ANEXO C – Artigo científico publicado I

ANEXO D – Artigo científico publicado II

ANEXO E – Artigo científico publicado III

ANEXO F – Resumo de artigo aceito

ANEXO G – Capítulo de livro publicado I

ANEXO H – Capítulo de livro publicado II