CARLOS ALEXANDRE DOS SANTOS HAEMMERLE

**ESTUDO DAS AFERÊNCIAS IMUNORREATIVAS AO
HORMÔNIO CONCENTRADOR DE MELANINA (MCH)
DO NÚCLEO *ACCUMBENS*, NO RATO LONG-EVANS
(*RATTUS NORVEGICUS*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

CARLOS ALEXANDRE DOS SANTOS HAEMMERLE

**ESTUDO DAS AFERÊNCIAS IMUNORREATIVAS AO
HORMÔNIO CONCENTRADOR DE MELANINA (MCH)
DO NÚCLEO *ACCUMBENS*, NO RATO LONG-EVANS
(*RATTUS NORVEGICUS*)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Ciências Morfofuncionais 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

São Paulo

2010

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

© reprodução total

Haemmerle, Carlos Alexandre dos Santos.

Estudo das aferências imunorreativas ao hormônio concentrador de melanina (MCH) do núcleo accumbens, no rato Long-Evans (*Rattus norvegicus*) / Carlos Alexandre dos Santos Haemmerle. -- São Paulo, 2010.

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: Hodologia do sistema MCH confluyente no núcleo accumbens

Versão do título para o inglês: Study of melanin-concentrating hormone (MCH) immunoreactive inputs of nucleus accumbens, in rats Long-Evans (*Rattus norvegicus*).

Descritores: 1. Hormônio Concentrador de Melanina 2. Núcleo accumbens 3. Traçador neuronal retrógrado I. Bittencourt, Jackson Cioni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Anatomia III. Título.

ICB/SBIB0116/2010

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 96 nas fls. 49 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Jackson Cioni Bittencourt** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Estudo das aferências imunorreativas ao hormônio concentrador de melanina (MCH) do núcleo accumbens, no rato long-evans*" do qual participou(aram) o(s) alunos **Carlos Alexandre dos Santos Haemmerle**, 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 (CEEA) em **22.10.2007**.

São Paulo, 23 de outubro de 2007.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

A Deus, cujas proteção e condução -
expressas em todo e qualquer sinal - fazem-
me perceber mais devotado, feliz e
comprometido com a Vida;

Aos meus pais, Roberto e Ermínia, que,
com seus exemplos de pleno amor, entrega
e confiança, me remetem e me inspiram à
constante e promissora Formação.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt, pelas prestatividade e confiança sempre oferecidas e por me mostrar o lado simples, objetivo, comprometido e impactante de um típico membro da seleta comunidade Científica Mundial, que me permitiram continuar e amadurecer minha paixão pela investigação da Morfologia Humana;

À Profa. Dra. Carol Fuzeti Elias, que com o exercício de sua postura e palavras naturalmente prestigiosas, me incitou à constante observação e à ponderação de meus ímpetos joviais, pontos-chave para o delineamento de uma promissora carreira científica;

Aos professores do departamento de Anatomia, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, em especial ao Prof. Dr. Ii-Sei Watanabe e ao Prof. Dr. Renato Paulo Chopard, pelos constantes exemplos e incentivos à construção de uma carreira docente galgada na exímia dedicação ao conhecimento, engajada e fundamentada no lema *Cientia Plena*;

Ao Prof. Dr. Martin Andreas Metzger e à Sra. Ana Maria Beraçoli Campos, ambos do laboratório de Neuroanatomia Funcional do depto. de Fisiologia e Biofísica, do ICB-I, pela receptividade, dedicação e simpatia que me mostraram o real significado da colaboração, não apenas restrita a uma etapa desta pesquisa, e sim abrangentes ao prisma das virtudes e formação Humanas, que serão ainda mais valorosos à medida que eu me lembrar de repassá-las e relatá-las a todo e qualquer conviva;

A todos os funcionários do departamento de Anatomia, cada qual pude conviver a seu tempo, e contribuíram não só com as necessidades de minha formação como aluno, mas com a construção de uma instituição que escalona graus de referência em ensino e pesquisa;

Aos meus colegas contemporâneos de laboratório, André, Daniella, Fernando, Kelly, Marcus e Renata, corpo discente de um grupo de pesquisa debatedor, fortificado em seu conjunto, de exemplar altruísmo e de grande caráter construtivista para uma próxima, e próspera, geração;

A FAPESP, cujo fomento me permitiu a dedicação integral, prazerosa e de imensa satisfação, a essa etapa de minha formação e a CAPES, pelos investimentos e incentivos científicos contínuos que contribuem para a progressão do programa de pós-graduação deste instituto.

“Aplica teu coração ao ensino
e teu ouvido às palavras que trazem conhecimento (...)

Escuta teu pai, que te gerou
e não desprezes tua mãe envelhecida.

Adquire a verdade mas não a vendas;
adquire a sabedoria, a instrução e o entendimento.”

Pr 23, 12. 22-23

“Há um tema que tudo atravessa: a precariedade das ocupações humanas.

“Vaidade”, ou seja, conforme o sentido hebraico
original da palavra: neblina, fumaça, ilusão”

Ed, conteúdo geral.

RESUMO

Haemmerle CAS. Estudo das aferências imunorreativas ao hormônio concentrador de melanina (MCH) do núcleo *accumbens*, no rato Long-Evans [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Introdução: O Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) é um neuropeptídeo sintetizado preferencialmente no hipotálamo, com ampla projeção para todo o neuroeixo, o que lhe permite exercer um papel modulador em uma variedade de processos fisiológicos, com destaque na ingestão aguda de alimento. Um dos alvos de suas projeções é o núcleo *accumbens* (Acb), componente do estriado ventral envolvido na recompensa de estímulos hedônicos, inclusive os palatáveis. Embora seja fundamentada sua relação funcional com o MCH, não são conhecidas suas relações hodológicas. **Objetivos:** Nessa contribuição, mapeamos as células imunorreativas (ir) ao MCH responsáveis pelas aferências do Acb e investigamos os possíveis contatos sinápticos existentes entre o sistema MCH e células de específicas identidades neuroquímicas do Acb, como o GABA e o ChAT. **Materiais e métodos:** Foi utilizado o método de imunoperoxidase para mapeamento das fibras ir-MCH distribuídas ao longo do eixo rostro-caudal e das subdivisões do Acb; o método de injeção de traçador neuronal retrógrado, Fluoro Gold e CTb, foi combinado à imunofluorescência para detecção do MCH; uma combinação de métodos de imunoperoxidase também foi utilizada para a determinação de possíveis contatos sinápticos entre os terminais ir-MCH e as células gabaérgicas ou colinérgicas nos limites do Acb. **Resultados:** A maior densidade de fibras ir-MCH foi encontrada na parte *shell* do Acb (AcbSh); as células duplamente marcadas foram encontradas nos seguintes territórios hipotalâmicos: área hipotalâmica lateral, área perifornical, área incerto-hipotalâmica, área internuclear, hipotálamo posterior, núcleo periventricular, área subincertal e no núcleo entopeduncular. Para confirmação de nossos resultados injetamos o traçador anterógrado BDA na LHA, e fibras e terminais BDA foram encontrados no AcbSh. Também foram observadas aposições entre terminais ir-MCH e células ir-GABA e ir-ChAT, no AcbSh. **Conclusão:** Sugere-se que os territórios hipotalâmicos que contém MCH estão em posição de inervar e participar dos respectivos controles do AcbSh, como o reforço positivo no comportamento alimentar.

Palavras-chave: Hormônio concentrador de melanina. Núcleo *accumbens*. Traçador neuronal retrógrado. Imuno-histoquímica. Hodologia.

ABSTRACT

Haemmerle CAS. Study of melanin-concentrating hormone (MCH) immuno-reactive inputs of nucleus accumbens, in rats Long-Evans [master thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Introduction: The melanin-concentrating hormone (MCH) is a neuropeptide preferentially synthesized at hypothalamus, with projections throughout neuroaxis, what permit its role in modulate various physiologic processes, like acute food. One target of its projections is nucleus accumbens, a component of ventral striatum, involved in the reward of hedonic stimulus, included palatability. **Objective:** This functional relationship bring us to search MCH-immunoreactive (ir) neurons that make afferens to Acb, and investigate any suggestive synaptic contact between MCH system and others with neurochemical markers peculiar at AcbSh, like GABA and ChAT. **Materials and methods:** We used immunohistochemical methods to investigate the pattern of MCH-ir innervation at Acb; Retrograde neuronal tracer methods was combined with immunofluorescence for MCH-detection. Double label upon immunoperoxidase were done to search for appositions involved MCH-ir fibers and GABA-ir and ChAT-ir neurons, at Acb limits. **Results:** A more densely distribution of fibers MCH-ir was present at subregion shell (AcbSh); double labeled neurons (MCH-ir+tracer) were viewed at LHA, perifornical area, incerto-hypothalamic area, internuclear area, posterior hypothalamus, periventricular nucleus, subincertal area and entopeduncular nucleus. To confirm this result, BDA anterograde tracer was delivered at LHA and so, fibers and terminals labeled by BDA at AcbSh. Also, we have found appositions between terminals of fibers MCH-ir and GABA-ir and ChAT-ir neurons, at AcbSh. **Conclusion:** Therefore, our results suggest hypothalamic areas what contain neurons MCH-ir can innervate AcbSh and modulates its role, like positive reinforcement of feeding.

Key words: Melanin-concentrating hormone. Nucleus accumbens. Retrograde neuronal tracer. Immuno-histochemistry. Hodology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Apresentação do Acb pelo método de Nissl.....	56
Figura 2. Padrão de distribuição das fibras e/ou terminais ir MCH/NEI no Acb.....	59
Figura 3. Exemplos das injeções dos traçadores retrógrados no AcbSh.....	61
Figura 4. Esquematização dos locais de injeção dos traçadores retrógrados.....	62
Figura 5. Aferências hipotalâmicas do Acb.....	64
Figura 6. Células duplamente marcadas no hipotálamo.....	66
Figura 7. Distribuição das aferências hipotalâmicas do AcbSh e dos neurônios ir-MCH	67
Figura 8. Locais de injeção para controle anterógrado.....	71
Figura 9. Inervação do AcbSh oriunda da LHA.....	72
Figura 10. Descrição de fibras e/ou terminais ir-MCH no AcbSh.....	74
Figura 11. Aposições dos terminais ir-MCH no AcbSh.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação semiquantitativa da distribuição das fibras e terminais ir-MCH nas diferentes porções e subregiões do Acb.....	57
Tabela 2 - Avaliação semiquantitativa da distribuição das fibras e terminais ir-NEI nas diferentes porções e subregiões do Acb.....	58
Tabela 3 - Quantificação das células hipotalâmicas retrogradamente marcadas (ir-CTb) e duplamente marcadas (ir-MCH+ir-CTb).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DG: 2-deoxi-D-glicose

Acb: núcleo *accumbens*

AcbC: *core* do núcleo *accumbens*

AcbSh: *shell* do núcleo *accumbens*

AgRP: proteína relacionada ao gene “Agouti”

AP: ântero-posterior

BDA: DextranaAmina Biotinilada

CA1: corno de Amon número 1

CART: transcrito regulado pela cocaína e anfetamina

ChAT: colina acetiltransferase

CPF: córtex pré-frontal

CRF: fator liberador de corticotrofina

CTb: subunidade β da toxina colérica

DAB: diaminobenzidina

DAMGO:

DV: dorso-ventral

FG[®]: fluoro-gold

FITC: isoticianato de fluoresceína

GABA: ácido γ -amino butírico

IHy: área incerto-hipotalâmica

I: área internuclear

LHA: área hipotalâmica lateral

LV: ventrículo lateral

KPBS: salina tamponada com sódio e potássio

MCH: hormônio concentrador de melanina

MCH1R: receptor tipo 1 para o hormônio concentrador de melanina

ML: médio-lateral

MSH: hormônio liberador de melanócitos

NEI: neuropeptídeo ácido glutâmico – isoleucina

NOS: óxido nítrico sintase

NPY: neuropeptídeo Y

PeF: área perifornical

PH: hipotálamo posterior

POMC: pró-opiomelanocortina

PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo

SOM: Somatostatina

TRH: hormônio liberador de tireotrofina

VP: pálido ventral

VDB: ramo vertical da banda diagonal de Broca

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Os núcleos da base.....	15
1.1.1 O núcleo <i>accumbens</i>	22
1.2 O Acb no comportamento alimentar.....	28
1.3 O hormônio concentrador de melanina (MCH).....	33
2 OBJETIVOS.....	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 Animais.....	41
3.2 Cirurgia estereotáxica.....	42
3.3 Preparação do tecido.....	44
3.4 Localização do traçador.....	45
3.5 Técnica de Nissl.....	46
3.6 O método da imuno-histoquímica.....	46
3.6.1 Imunoperoxidase.....	46
3.6.2 Dupla reação de imunoperoxidase.....	47
3.6.3 Imunofluorescência.....	50
3.7 Histoquímica para revelação do BDA.....	52
3.8 Intensificação pela prata e ouro.....	52
3.9 Osmicação.....	53
3.10 Aquisição de imagens.....	54
4 RESULTADOS.....	55
4.1 O Acb pelo método de Nissl.....	55
4.2 Distribuição das fibras ir-MCH/NEI no Acb.....	57
4.3 Injeções de traçador neuronal retrógrado.....	60
4.4 As aferências ir-MCH do AcbSh.....	65
4.5 Controle anterógrado das aferências hipotalâmicas do AcbSh.....	70
4.6 Aposições entre fibras ir-MCH e neurônios ir-GABA e ir-ChAT, no AcbSh.....	73
5 DISCUSSÃO.....	76
5.1 A compartimentalização neuroquímica do Acb.....	76
5.2 A alça Hipotálamo-Acb.....	77
5.3 O MCH na alça Hipotálamo-Acb.....	81
5.4 Considerações funcionais.....	84
5.4.1 MCH e Acb: hedonismo e aquisição.....	84
5.4.2 Circuitaria Hipotálamo-Acb no comportamento alimentar.....	89

5.4.3 Zonas hipotalâmicas e respectivas funções.....	90
6 CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS.....	94

INTRODUÇÃO

1.1 Os núcleos da base

A maioria das espécies de mamíferos apresenta em seu prosencéfalo um grupamento subcortical responsável principalmente por associar sinais de áreas corticais a sistemas envolvidos na geração de comportamentos; tal grupamento subcortical é conhecido como *núcleos da base* (Gerfen et al., 1990; Gerfen, 2004; Wilson, 2004).

Os aspectos funcionais primeiramente aceitos para os núcleos da base foram baseados em observações feitas em humanos acometidos por doenças crônicas e em modelos experimentais obtidos com lesões que afetavam essas estruturas; em todos os casos, as doenças provocavam distúrbios severos dos movimentos, de difícil descrição (Wilson, 2004; DeLong e Wichmann, 2009). Um exemplo surge quando se examina a doença de Parkinson: os movimentos se tornam mais difíceis de serem iniciados, como se o corpo do indivíduo estivesse rígido e resistente às mudanças de postura e posição; outro exemplo é a doença, ou coreia, de Huntington: diante da intenção de se iniciar um ato motor, outros movimentos não intencionais e não usuais são iniciados, interferindo simultaneamente em sua execução e função (Gerfen et al., 1990; DeLong, 2003, Wilson, 2004).

Devido a tal influência, sugeriu-se inicialmente um papel mais generalizado para os núcleos da base, caracterizando-os como um seletor entre possíveis ações motoras, de acordo com os objetivos e estratégias existentes, e interpretações da informação sensorial. Assim, os núcleos da base podem ser vistos como um “banco de memória” dos movimentos mais adequados para uma dada ação, baseados em um sucesso obtido

em um contexto passado, sob circunstâncias similares (Wilson, 2004). Contudo, modelos experimentais atuais propõem que os núcleos da base não sejam compreendidos como um grupamento neuronal que simplesmente “restringa e selecione” determinados atos motores, e sim como componentes de distintas alças reentrantes e paralelas, sob as quais as informações oriundas de áreas corticais específicas sejam processadas em territórios também específicos e não sobrepostos, e só então retornadas para o respectivo local de origem por meio de uma retransmissão talâmica (DeLong e Wichmann, 2009); esta visão surgiu a partir da descrição de cinco “circuitos” distintos: o circuito motor, oculomotor, pré-frontal dorsolateral, orbitofrontal lateral e circuito anterior do giro do cíngulo.

Ademais, de acordo com suas conexões, os núcleos da base são considerados um grupo de núcleos envolvidos, cada qual a uma maneira peculiar, em muitos aspectos do comportamento – desde ações motoras a complexas influências cognitivas, emocionais e motivacionais (Berendse et al., 1992; Simpson et al., 2010).

Os componentes dos núcleos da base são determinados de acordo com considerações estruturais ou funcionais. Diante de uma óptica *estrutural*, os núcleos da base se constituem por: 1) núcleo caudado; 2) putame; 3) núcleo *accumbens*; 4) Globo pálido lateral e 5) Globo pálido medial. Por outro lado, uma abordagem *funcional* considera como núcleos da base: 1) estriado, constituído pelo conjunto formado pelos núcleos caudado, putame e núcleo *accumbens*; 2) lentiforme, constituído pelo putame e globos pálidos lateral e medial; 3) núcleo subtalâmico e 4) substância negra (DeLong, 2003; Gerfen, 2004; Wilson, 2004). Em roedores, por exemplo, deve-se ressaltar uma condição pertinente aos segmentos do globo pálido: o segmento lateral pode ser

reconhecido genericamente com globo pálido, enquanto o segmento medial, como núcleo entopeduncular (Gerfen et al., 1990; Brog et al., 1993).

Os diferentes componentes dos núcleos da base se organizam sob uma maneira que permita que o fluxo de informações tome uma direção geral, percorrendo cada componente funcional a uma dada temporização (Wilson, 2004).

As aferências para os núcleos da base alcançam principalmente o *estriado*, a definição que abrange e une funcionalmente o núcleo caudado, o putame e o núcleo *accumbens* - componentes que inclusive apresentam algumas semelhanças em sua organização citoarquitetônica – (Zahm e Brog, 1992; Gerfen, 2004; Voorn et al., 2004; Wilson, 2004).

No núcleo caudado e putame, as aferências de áreas neocorticais frontais, convergem com aferências oriundas também de grupamentos talâmicos intralaminares, da parte compacta da substância negra e do núcleo dorsal da rafe. Ao núcleo *accumbens*, de modo geral, reservam-se as aferências que partem do córtex límbico, da formação hipocampal e da área tegmental ventral (Brog et al., 1993; Gerfen, 2004; Wilson, 2004). Destaca-se aqui um primeiro ponto, onde a peculiaridade hodológica do núcleo *accumbens* e do núcleo caudado-putame embasa uma dissociação estrutural e funcional discutida posteriormente, ainda que tais núcleos sejam considerados parte de única organização funcional hierarquicamente maior, o estriado (Zahm e Brog, 1992).

Após as aferências terem se estabelecido no estriado, os sinais resultantes dessa operação neural convergem principalmente para outros componentes dos núcleos da base: o globo pálido lateral, o globo pálido medial e a parte reticulada da substância negra - três estruturas semelhantes em sua organização celular -. Os dois últimos,

denominados como os principais componentes eferentes dos núcleos da base, se projetam para estruturas externas, estabelecendo-se como a principal via de saída de todo processamento organizado até então; também é denominada de via eferente direta. Esta via transmite as informações aos núcleos talâmicos ventrais anteriores e laterais – os quais se projetam para as áreas frontais do córtex cerebral –, ao núcleo lateral da habênula e às camadas profundas do colículo superior (de Olmos e Heimer, 1999; DeLong, 2003; Wilson, 2004; DeLong e Wichmann, 2009). Já o globo pálido lateral se projeta principalmente para o núcleo subtalâmico – que também recebe aferências neocorticais frontais –, o qual se projeta para ambos os segmentos do globo pálido e para a substância negra, influenciando assim a transmissão da via direta; esta via denomina-se também de via eferente indireta (DeLong, 2003; Wilson, 2004; DeLong e Wichmann, 2009).

A maioria dos neurônios do estriado é formada por neurônios principais de projeção, quantificados em cerca de 90-95% de toda a densidade neuronal dessa região (Gerfen et al., 1990; Voorn et al., 2004; Wilson, 2004). Estes neurônios são chamados de neurônios espinhosos (do inglês, *spiny neurons*) devido à alta densidade de espículas que recobrem seus dendritos, exceto em suas porções mais proximais, ou seja, de brotamento; seu corpo celular possui de 12 a 20 μm de diâmetro, o que os classifica como de tamanho médio (do inglês, *medium spiny neurons*) (Wilson, 2004).

Um neurônio espinhoso possui entre 25 a 30 ramificações dendríticas terminais que se irradiam para todas as direções como um aspecto esférico, com raio entre 300 e 500 μm . O surgimento das espículas dendríticas se inicia a partir de uma distância de cerca de 20 μm a partir do brotamento no corpo neuronal, com seu pico de densidade instituído em uma distância próxima a 80 μm , onde se verificam de 4 a 6 espículas/ μm

de comprimento do dendrito terminal; essa característica faz do neurônio principal estriatal uma das células do encéfalo com a maior densidade de recobrimento por espículas dendríticas (Wilson, 2004).

Os neurônios espinhosos organizam-se de maneira aproximadamente igualitária em duas subpopulações que formam ou a via direta ou a via indireta (Gerfen et al., 1990), sendo ambas inteiramente imunorreativas ao GABA (Gerfen et al., 1990; Wilson, 2004; DeLong e Wichmann, 2009). Além do GABA, esses neurônios espinhosos são imunorreativos a neurotransmissores peptidérgicos como encefalina, substância P (Voorn et al., 1989), dinorfina (Gerfen et al., 1990) e CART (Koylu et al., 1998; Dallvechia-Adams et al., 2001). Suas projeções estabelecem sinapses inibitórias no próprio estriado, no globo pálido e no mesencéfalo ventral (Dallvechia-Adams et al., 2002; Wilson, 2004).

A variedade de tipos de interneurônios do estriado foi revelada a partir de estudos pelo método de Golgi. Baseando-se em aspectos morfológicos, podem-se distinguir cerca de oito tipos de interneurônios, mas tomando-se como critério a neuroquímica apresentada e a categoria estrutural a qual se compõe, podem-se citar três tipos que vem sendo estudados com maior detalhamento, como os grandes interneurônios colinérgicos (Ligorio et al., 2009), as células em cesto imunorreativas ao GABA/parvalbumina e os interneurônios imunorreativos a SOM/NOS (DeLong, 2003; Wilson, 2004).

As fibras aferentes do estriado partem principalmente do córtex frontal - glutamatérgicas e originadas em grande parte da camada 5 -, dos núcleos intralaminares do tálamo, do mesencéfalo ventral - dopaminérgicas -, do núcleo dorsal da rafe - serotoninérgicas - e do complexo amigdalóide (Brog et al., 1993; Wilson, 2004).

O estriado de mamíferos, incluindo os primatas humanos, possui uma organização neuronal fundamental - sob um aspecto em mosaico, ou de ilhotas celulares - caracterizada pela distribuição em grupos de alta densidade, separados por áreas de baixa densidade celular. Diferentemente de estruturas organizadas em camadas, a organização em mosaico não divide o tecido em muitos compartimentos, mas somente em dois, onde as ilhotas celulares são usualmente denominadas de estriossomas, ou *patches*, enquanto a área entre estes é denominada matriz (Voorn et al., 1989; Jongen-Rêlo et al., 1993; Wilson, 2004). A imunorreatividade à encefalina, à substância P e à dopamina é considerada uma ferramenta adequada para se observar o perfil de sua compartimentalização (Voorn et al., 1989).

Algumas aferências assumem preferencialmente um ou outro compartimento, ao mesmo modo que tais compartimentos possuem diferentes alvos de projeção (Voorn et al., 1989; Wilson, 2004). Por exemplo, os estriossomas se projetam preferencialmente para a parte compacta da substância negra, onde os neurônios da via nigroestriatal estão localizados, enquanto a matriz de projeta preferencialmente para a parte reticulada da substância negra, onde neurônios não-dopaminérgicos se projetam para o tálamo e para o colículo superior (Wilson, 2004).

Cada compartimento também apresenta diferentes características neuroquímicas. Por exemplo, os receptores opióides μ estão presentes em altas concentrações no neuropilo do estriossoma; já os neurotransmissores peptidérgicos met-enkefalina e substância P, apresentam-se de modo mais complexo, onde em algumas partes do estriado possuem maior densidade no estriossoma, enquanto em outras partes, a maior densidade pode ser vista na matriz (Voorn et al., 1989; Wilson, 2004).

O estriado, de modo geral, apresenta-se como um complexo neural com características estruturais e fisiológicas idênticas. Por outro lado, características comportamentais sugerem que o estriado apresente uma divisão em duas grandes regiões, que justifiquem as observações, de um lado, sensório-motoras e associativas, e de outro, límbicas (Reidel et al., 2002; Voorn et al., 2004; Yin et al., 2009); assim iniciou-se uma compreensão mais detalhada, abrangendo-o a partir de uma divisão dorsal e ventral.

A distribuição de aferências corticais, talâmicas e dopaminérgicas corrobora essa distinção, assim como suas projeções, pois parte alcança o pálido ventral – a partir de onde é formado um circuito de retransmissão com o núcleo mediodorsal do tálamo, ao invés dos núcleos ventrais anteriores e laterais (de Olmos e Heimer, 1999) –. Embora não haja um delineamento preciso dos limites dessa divisão, é aceita uma demarcação obtida entre a parte ventral do complexo caudado-putame e a parte dorsal do núcleo *accumbens* (Heimer e Wilson, 1975¹ apud Voorn et al., 2004).

O estriado dorsal, representado pelo complexo caudado-putame, é predominantemente envolvido no aprendizado motor (Voorn et al., 2004; Meredith et al., 2008; Yin et al., 2009). A aquisição de novas habilidades necessita de um aprendizado inicial da execução e de uma automação posterior de certas finezas de movimento; essas duas fases de temporização distintas são categorizadas em uma subdivisão medial – associativa - e lateral - sensório-motora -, respectivamente, do estriado dorsal (Yin et al., 2009).

¹ Heimer L, Wilson RD. The subcortical projections of the allocortex: similarities in the neural associations of the hippocampus, the piriform cortex, and the neocortex. In: Santini M editor. Golgi Centennial Symposium. Raven Press; 1975. P. 177-193.

O conceito de estriado ventral foi proposto para discriminar a parte do estriado que recebia aferências oriundas também de áreas allocorticais - uma definição para os córtices cujos neurônios são distribuídos sob menos de seis camadas distintas, como por exemplo, no hipocampo e no córtex olfatório -, responsáveis pelo processamento de informações afetivas (Heimer e Wilson, 1975¹ apud Voorn et al., 2004; Meredith et al., 2008). Os componentes do estriado ventral, no rato, consistem do núcleo *accumbens*, da parte ventral do caudado-putame, e partes do tubérculo olfatório (de Olmos e Heimer, 1999; Wilson, 2004).

Embora funcionalmente de fácil compreensão, o conceito pode gerar conflitos ao se examinar detalhadamente os limites anatômicos de seus componentes, principalmente em primatas. Por exemplo, o estriado ventral de humanos é composto pelo núcleo *accumbens*, seu maior componente, e pelas "ilhas" celulares denominadas *insulae terminalis* (Sanides, 1957² apud Prensa et al., 2003). Haber et al. (1990) e Heimer et al. (1999) defenderam que, em humanos, as partes ventrais do caudado-putame devem ser incluídas no conceito de estriado ventral .

1.1.1 O núcleo *accumbens*

O núcleo *accumbens*³ (Acb) é o maior componente do estriado ventral (Heimer et al., 1991; Groenewegen et al., 1999). Sua organização compartimentalizada, como ocorre com as demais partes do estriado, atraiu um grande interesse, principalmente na

² Sanides F. Die insulae terminalis des Erwachsenen Gehirns des Menschen. J Hirnforsch. 1957;3:244-273.

³ termo derivado do latim, que significa: “que reclina, que encosta ao lado de”

descrição das diferentes subregiões que o constituíam (Záborszky et al., 1985; Meredith et al., 1992) detalhadas pelas diferenças observadas em sua composição neuroquímica (Voorn et al., 1989; Jongen-Rêlo et al., 1993) e em sua caracterização hodológica (Brog et al., 1992; Zahm e Heimer, 1993).

Quando examinado no conjunto que compõe o estriado, o Acb é situado em uma posição rostroventral; apresenta como característica uma grande extensão em seu eixo rostrocaudal, sustentando assim um pólo rostral e partes rostral e caudal (Heimer et al., 1991; Brog et al., 1993; Van Dongen, 2005).

O pólo rostral constitui cerca de 1/4 do Acb, disposto, como sua própria nomenclatura prediz, rostralmente. Sua sintopia o organiza dorsolateralmente à parte posterior do núcleo olfatório anterior, e dorsomedialmente à parte anterior da comissura anterior. Ainda, localiza-se ventralmente ao epêndima do ventrículo olfatório.

As partes rostral e caudal compõem os 3/4 remanescentes do Acb, que se dispõem lateralmente ao núcleo semilunar – rostralmente - e aos núcleos do ramo vertical da banda diagonal e septal medial - caudalmente -, ainda que interpostos por um delgado grupamento celular, formado pela fusão entre a continuidade medial do pálido ventral e as ilhotas principais de Calleja (Riedel et al., 2002); dorsalmente aos grupamentos do pálido ventral e às interdigitações do tubérculo olfatório; ventrolateralmente à porção ventral do núcleo septal lateral, assim como com sua porção intermédia, se observado em níveis mais rostrais, e ao ventrículo lateral, enquanto que ventromedialmente ao caudado-putame.

O Acb apresenta uma divisão adicional, em subregiões *shell* (AcbSh) e *core* (AcbC), proposta primeiramente em ratos, baseada no padrão de distribuição das fibras

ir-colecistocinina (Záborszky et al., 1985). Estudos posteriores corroboraram essa proposta por meio de marcações envolvendo métodos de imuno-histoquímica, utilizando-se uma variedade de anticorpos, como por exemplo, contra substância P, calbindina 28 kD, encefalina e dopamina (Voorn et al., 1989; Jongen-Rêlo et al., 1993).

A organização neuronal do Acb apresenta diferentes padrões, interpostos dentro e entre as subregiões classicamente definidas do Acb (Zahm e Brog, 1992; Todtenkopf e Stellar, 2000). Embora sendo um componente estriatal, o padrão de organização em compartimentos de estriossoma e matriz não se corresponde, pelo menos em sua totalidade. Preferencialmente, o Acb pode ser visto como uma organização multicompartmental (Jongen-Rêlo et al., 1993).

O pólo rostral não permite uma distinção adequada entre as subregiões AcbSh e AcbC, embora sua parte medial apresente neurônios organizados sob uma maneira muito semelhante à observada na subregião AcbSh, devido à baixa imunorreatividade à calbindina 28kD; o contrário se estabelece em sua parte lateral, onde se observa um predomínio de imunorreatividade à calbindina 28kD, ao mesmo modo que é observado na subregião AcbC (Zahm e Heimer, 1993; Riedel et al., 2002).

Ambas as subregiões distinguem-se claramente entre si quando examinadas em cerca dos 3/4 caudais do Acb, onde o AcbSh envolve o AcbC em seus aspectos mediais, ventrais e laterais (de Olmos e Heimer, 1999).

As conexões estabelecidas pelo AcbSh e AcbC corroboram as diferenças observadas entre eles (Záborszky et al., 1985; Heimer et al., 1991; Brog et al., 1993). Ambas as subregiões exibem conexões recíprocas com o córtex pré-frontal medial, mas podem ser detalhadas como predominantes ao AcbSh as aferências do córtex

infralímbico, enquanto ao AcbC, as aferências oriundas do córtices prélímbico e insular agranular; quanto aos núcleos talâmicos da linha média, ambas as subregiões recebem densas projeções dos núcleos paraventricular e paratenial do tálamo, sendo predominantes ao AcbSh as aferências oriundas de suas partes rostr dorsais, enquanto ao AcbC, as oriundas de suas partes ventrais (Brog et al., 1993); ademais, tanto o AcbSh quanto o AcbC inervam o pálido ventral subcomissural, mas sua parte ventromedial predomina com aferências do AcbSh, enquanto sua parte dorsolateral, com aferências do AcbC (Heimer et al., 1991); o subículo ventral se projeta principalmente para o AcbSh, enquanto o AcbC recebe projeções do subículo dorsal e CA1 (Brog et al., 1993; Meredith et al., 2008); no mesencéfalo ventral encontra-se uma maior densidade de projeções oriundas da parte ventromedial da área tegmental ventral para o AcbSh, enquanto a maior densidade de projeções da parte compacta da substância negra alcança o AcbC (Brog et al., 1993). Embora com características estruturais e funcionais distintas, o AcbSh e o AcbC constituem uma rede neural que também emitem projeções recíprocas entre si (Van Dongen, 2005).

A principal peculiaridade na diferença hodológica entre as subdivisões AcbSh e AcbC - que vai além da diferença na organização topográfica vista até então – recai ao longo da extensão rostrocaudal da área hipotalâmica lateral (LHA), partes do núcleo intersticial da estria terminal e parte sublenticular da amígdala estendida; estes grupamentos exibem conexões *exclusivas* com neurônios do AcbSh, de modo especial em sua porção caudomedial dorsal, também denominada pólo septal ou cone medial (Heimer et al., 1991; Brog et al., 1993). Por outro lado, o AcbC apresenta-se intimamente contínuo com o caudado-putame, exibindo conexões para o núcleo

entopeduncular, principalmente em sua pequena extensão medial que adentra à LHA (Heimer et al., 1991).

O pólo septal se apresenta como a região que recebe a maior densidade de aferências subcorticais, considerando-se o Acb como um todo, e inclusive sua subregião AcbSh. Essa característica permite sua inclusão, pelo menos em parte, em um grande sistema prosencefálico envolvido na regulação de mecanismos autonômicos e locomotores do tronco encefálico (Brog et al., 1993). Além disso, é contínuo com um dos principais componentes da amígdala estendida: a divisão central da amígdala estendida (de Olmos e Heimer, 1999).

Os diferentes padrões de conectividade das subregiões AcbC e AcbSh permitiram uma dedução de seus respectivos perfis funcionais, que foram melhor compreendidos a partir de manipulações farmacológicas seletivas, inicialmente conduzidas por Maldonado-Irizarry e Kelley (1994). Atualmente, infere-se que o AcbC exerça um papel predominante em selecionar e executar ações motoras diante de situações complexas e variáveis, ou ainda, relacionadas a estímulos cujos significados de incentivo tenham sido recentemente adquiridos, ou modificados por condicionamento prévio (Meredith, 2008). Por outro lado, o AcbSh é sugerido como um controlador de respostas não-condicionadas, como a liberação de padrões motores pré-determinados associados a estímulos não-condicionados, como a locomoção e a ingestão de alimento - semelhante aos padrões motores oriundos de manipulações da área hipotalâmica lateral (Baldo, 2002; Meredith, 2008).

As células do Acb apresentam diferentes classes de receptores, com alguns exemplos a seguir: dopaminérgicos dos tipos D1-3 (Gerfen et al., 1990; Moine e Bloch, 1996; Chung et al., 2009; Duriex et al., 2009), gabaérgicos dos tipos A e B (Kelley et

al., 2005), glutamatérgicos do tipo AMPA/cainato e NMDA (Kelley et al., 2005), opióides, como os receptores μ , κ e δ (Jongen-Rêlo et al., 1993; Katsuura e Taha, 2009), colinérgicos, dos tipos M1-5 (Ligorio *et al.*, 2009), histaminérgicos dos tipos H1-3 (Zimmermann et al., 1999), serotoninérgicos dos tipos 5-HT_{1/7}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄ e 5-HT₆ (Jean et al., 2007; Pratt et al., 2009), purinérgicos do tipo A_{2A} (Farrar et al., 2010) e uma classe denominada “receptores órfãos acoplados à proteína-G”, particularmente um receptor com sequência de DNA homóloga à de receptores para a somatostatina - SLC1 -, também identificado como receptor tipo 1 para o hormônio concentrador de melanina (MCH1R) (Saito et al., 1999).

O Acb exerce um papel fundamental dentro dos sistemas neurais que medeiam a motivação e a recompensa (Stratford e Kelley, 1997; Kelley et al., 2005; Wise, 2005, Chung et al., 2009; Farrar et al., 2010). Essa consideração é devida ao fato do Acb ser o principal alvo do sistema dopaminérgico mesolímbico, que tem como origem a área tegmental ventral, percorre toda extensão da zona lateral do hipotálamo - pelo feixe prosencefálico medial, o mais complexo sistema de fibras da parte central do sistema nervoso que interconecta cerca de outros 50 núcleos – e alcança o Acb (Swanson, 1987; Wise, 2005).

As vias de recompensa, além de estarem envolvidas em quadros de drogas aditivas, também são exigidas no direcionamento da motivação pelo alimento (Saper et al., 2002; Kelley et al., 2005; Wise, 2006); a partir desse ponto muitos estudos foram conduzidos para compreender, ou mesmo estabelecer, o papel do Acb nesta situação.

1.2 O Acb no comportamento alimentar

As primeiras observações que relacionaram o Acb à ingestão de alimento surgiram entre as décadas de 1980 e 1990, e envolveram os sistemas dopaminérgicos e opioidérgicos. Nos anos seguintes, com o estabelecimento que o Acb era composto pelas subregiões AcbSh e AcbC, os estudos foram conduzidos especificamente para cada região e relacionados à transmissão GABA-érgica (Stratford e Kelley, 1997). Tendo em vista que a manipulação do AcbSh, e não do AcbC, suscitou em uma intensa resposta de ingestão de alimento, grande parte dos estudos foram concentrados no AcbSh, observando-se o envolvimento da transmissão gabaérgica, colinérgica, dopaminérgica ou por meio de opióides (Stratford e Kelley, 1997; Stratford e Kelley, 1999; Reynolds e Berridge, 2001; Saper et al., 2002; Kelley et al., 2005; Wise, 2005).

A administração exógena do agonista GABA-érgico tipo A, muscimol, assim como de antagonistas glutamatérgicos tipo AMPA, principalmente na porção medial do AcbSh, induz sobremaneira a ingestão do alimento *per se* - em seu contexto como estímulo não-condicionado - em ratos saciados, inclusive sendo acompanhada de uma grande ativação de neurônios hipotalâmicos que podem estar relacionados a padrões motores do comportamento alimentar (Stratford e Kelley, 1997; Stratford e Kelley, 1999). Tal fato sugere que o AcbSh seja um componente importante dos sistemas neurais que controlam o comportamento alimentar, e que por meio de um mecanismo de inibição tônica via seus neurônios principais de projeção GABA-érgicos, age como “sentinela” no controle dos circuitos autonômicos e motores que medeiam padrões de comportamento do ato consumatório de alimento. Seus neurônios de projeção sinalizam diretamente no hipotálamo, ou o fazem indiretamente via pálido ventral, visto que o

bloqueio de seus receptores GABA_A resulta em um quadro de hiperfagia muito semelhante ao obtido com o bloqueio de receptores AMPA no AcbSh (Kelley et al., 2005).

Outro papel de “sentinela” no equilíbrio energético pode ser devotado a neurônios sensíveis à glicose, constituintes de uma teoria glicostática para a manutenção do estado energético (Oomura et al., 1969), onde a sensibilização de um quadro de depleção da glicose desencadearia comportamentos ingestivos que reequilibrassem seus níveis séricos. Um modelo experimental que mimetiza o quadro de privação da glicose é obtido com a administração sistêmica ou central de 2-deoxi-D-glicose (2-DG), um inibidor da glicólise (Berthoud e Mogenson, 1977). Dodd et al., 2010, induziram o estado de privação da glicose por meio da 2-DG, e mapearam a imunorreatividade à proteína nuclear *fos* no encéfalo. Além de regiões hipotalâmicas com papel classicamente definido no comportamento alimentar, houve a descrição de neurônios *ir-fos* no AcbSh. No mesmo estudo, exames por ressonância magnética funcional revelaram um intenso metabolismo na região do AcbSh, confirmando os resultados da ativação neuroquímica e corroborando o papel do Acb na regulação do comportamento ingestivo.

Uma característica importante do comportamento alimentar é que sua expressão é influenciada não só por fatores homeostáticos, mas também por fatores hedônicos (Saper et al., 2002; Kelley et al., 2005; Johnson e Kenny, 2010).

As características hedônicas remetem ao prazer subjetivo que acompanha um estímulo específico e determinam o valor de incentivo que motiva a sua procura (Saper et al., 2002; Kelley et al., 2005). Um modelo experimental baseado em tarefas operacionais relacionadas a razões progressivas da procura pelo alimento é usado para correlacionar o valor hedônico atribuído, por exemplo, a rações com alto teor de açúcar

oferecidas a ratos; e neste, quando se estimulam os sistemas dopaminérgico ou opioidérgico, observa-se um aumento do esforço realizado para a aquisição, ou mesmo uma facilitação do aprendizado de novas ações para a obtenção do alimento em questão (Kelley et al., 2005).

Assim, as vias dopaminérgicas e opioidérgicas são intimamente relacionadas à motivação pelo alimento. Cada uma exerce sua influência sob uma característica própria, compreendida a partir da utilização de termos “agradar”, propriamente relacionado ao valor hedônico, e “querer”, relacionado ao incentivo para sua busca. Em relação aos mediadores neuroquímicos, propôs-se que àquele ocorre um predomínio da transmissão opioidérgica, enquanto a este, da transmissão dopaminérgica mesolímbica (Kelley et al., 2005; Smith e Berridge, 2007).

A densidade de receptores D2R é influenciada diante tarefas em função de recompensa palatável. O consumo excessivo de alimento com alto teor calórico, observado espontaneamente em ratos aos quais tais alimentos são oferecidos livremente, determina a diminuição da densidade de receptores D2R estriatais, como também é observado em humanos com sobrepeso e em quadros de adição de drogas (Johnson e Kenny, 2010).

O sistema opióide de recompensa para alimentos palatáveis que confluem seja no Acb ou no pálido ventral (VP), interagem entre si e são simultaneamente ativados diante o estímulo de solução de sacarose administrada na cavidade bucal de ratos, deflagrando reações orofaciais próprias relacionadas ao “agradar” (Smith e Berridge, 2007); observa-se também que a ação de agonistas e antagonistas de receptores μ , DAMGO e naloxona, confirmam ou bloqueiam, respectivamente, tais reações. De modo geral, acredita-se que receptores opióides são encontrados ao longo das redes neurais

que sinalizam a informação relacionada ao sabor e que sua ativação, principalmente no Acb, aumenta a ingestão de alimento (Kelley et al., 2005)

Os neurônios opióides que expressam o gene para encefalina e dinorfina, no Acb, são colocalizados com MCH1R (Georgescu et al., 2005). A administração do hormônio concentrador de melanina (MCH) no AcbSh aumenta a ingestão de alimento, provavelmente por meio de uma redução/modulação da sinalização dopaminérgica em D1 indutora da fosforilação de receptores GluR1 tipo AMPA (Georgescu et al., 2005).

Chung et al. (2009) observaram o papel modulador do MCH no sistema dopaminérgico, com um aumento dos níveis de fosforilação da DARPP-32 quando combinado a agonistas de receptores dopaminérgicos D1 e D2. Além disso, observou-se que a administração intracerebroventricular de MCH potencializa a hiperatividade como efeito da ação cocaína, e também que camundongos *Mch1r*^{-/-} possuem uma diminuição do efeito reforçador exercido pela cocaína.

No Acb, o sistema opióide é modulado pela acetilcolina; o bloqueio de receptores muscarínicos reduz a ingestão de alimentos gordurosos/palatáveis, mesmo diante da indução pelo DAMGO, sugerindo uma redução no valor de recompensa atribuído a tal alimento. Assim, o “tônus colinérgico” parece atuar como um coadjuvante na busca e no consumo de alimentos palatáveis (Kelley et al., 2005).

Por outro lado, técnicas de microdiálise revelam um aumento progressivo da liberação de acetilcolina durante o evento de ingestão de alimento, correlacionado a mecanismos que medeiam a saciedade. É necessário ressaltar que tal observação advém de um contexto cujo alimento não apresentava um valor hedônico, presumivelmente paralelo à via opióide (Mark et al., 1992; Kelly et al., 2005).

A sinalização dopaminérgica no Acb é relacionada ao desenvolvimento de comportamentos direcionados a uma meta específica, assim como ao aumento da sensibilidade para o reconhecimento de pistas associadas a uma recompensa (Wise, 2005; Meredith et al., 2009). Drogas aditivas como a anfetamina, a cocaína e a nicotina, têm como característica comum a elevação dos níveis dopaminérgicos em determinados grupamentos neuronais (Wise, 2005).

A dopamina, conjuntamente a sistemas glutamatérgicos, também promove a plasticidade pós-sináptica, relacionada ao aprendizado. A ativação de receptores pós-sinápticos dopaminérgicos do tipo D1, e glutamatérgicos do tipo NMDA, é necessária para a consolidação de uma resposta advinda de um agente de recompensa. De modo geral, o sistema dopaminérgico confluyente no Acb exerce um papel que viabiliza e incita ações dirigidas a uma meta específica, ao mesmo tempo em que facilita certos tipos de plasticidade relacionada ao aprendizado (Kelley et al., 2005).

Já as propriedades energéticas e palatáveis do alimento são importantes fatores (emocionais) para a determinação deste como agente de recompensa (Saper et al., 2002; Kelley et al., 2005; Wise, 2006). A ingestão de certos alimentos contribui para a sensação prazerosa do indivíduo, especialmente se o alimento é ricamente constituído de açúcar ou gordura; ainda, pode se caracterizar como um meio de busca de conforto diante situações de estresse ou depressão (Kelley et al., 2005). A este contexto do comportamento alimentar associa-se o envolvimento dos opióides; enquanto uma metade dos neurônios de projeção estriatais se colocam com encefalina, a outra metade se localiza com dinorfina e substância P, e compõem a via estriadopalidal e estriadonigral, respectivamente (Gerfen et al., 1990).

1.3 O hormônio concentrador de melanina (MCH)

Alguns neuropeptídeos hipotalâmicos, e relacionados ao comportamento alimentar, foram identificados desde a última década. Dentre estes, destaca-se o MCH, um agente importante para a regulação de uma variedade de funções, das quais a mais estudada é a ingestão de alimentos, especificamente em sua fase aguda (Qu et al., 1996; Rossi et al., 1997; Shimada et al., 1998; Abbott et al., 2003; Shi, 2004).

A descrição do MCH ocorreu como resultado do interesse, de cerca de três décadas, em se compreender o mecanismo de clareamento como função adaptativa/mimetizante da coloração tegumentar de peixes teleósteos; supunha-se que tal mecanismo decorresse de uma ação antagonista ao hormônio estimulador de melanócitos, conhecido por tornar o pigmento esparso no interior dos melanóforos, e assim imprimir um escurecimento na escama dos peixes teleósteos (Baker e Ball, 1975).

A partir de extratos obtidos da hipófise de salmões, Rance e Baker (1979) verificaram que existia uma molécula inteiramente nova, com ação de concentrar a melanina no interior dos melanóforos, o que tornava as escamas dos peixes teleósteos com coloração mais clara. A estrutura de tal molécula foi primeiramente descrita por Kawauchi et al. (1983), como uma cadeia cíclica composta por dezessete aminoácidos, e então denominada como hormônio concentrador de melanina. O MCH também foi observado em anfíbios e répteis, mas nestas classes sua ação é tornar seu tegumento mais escuro (Baker, 1988; Eberle, 1988).

Em continuidade com sua descrição nos vertebrados, o MCH também foi observado em mamíferos (Baker e Rance, 1983). A clonagem do DNA complementar

do MCH revelou que, em ratos, sua estrutura apresenta uma cadeia de dezenove aminoácidos, também sob arranjo cíclico, com grande similaridade com a que é observada em salmões (Nahon et al., 1989; Vaughan et al., 1989). Sendo um neuropeptídeo, o MCH é gerado a partir da clivagem proteolítica de seu pré-pró-hormônio, o pré-pró-MCH – que também é responsável pela síntese de outros dois peptídeos neuroativos: o NEI (neuropeptídeo – **N** - ácido glutâmico – **E** – isoleucina - **I**) e o NGE (neuropeptídeo - **N** - glicina – **G** – ácido glutâmico - **E**).

No rato, o MCH é sintetizado por neurônios do tubérculo olfatório, da formação reticular pontina paramediana e principalmente por neurônios hipotalâmicos, essencialmente pertencentes à LHA e à área incerto-hipotalâmica (IH_y) - nova nomenclatura proposta por Sita et al. (2007) para a parte rostromedial da zona incerta -, a partir de onde emitem projeções que alcançam todo o neuroeixo, sob diferentes densidades de inervação (Bittencourt et al., 1992). A sinalização intracelular do MCH ocorre via receptores metabotrópicos, MCHR1 e MCHR2; o MCHR1 foi descrito primeiramente, a partir de um gene idêntico a uma classe denominada “receptores órfãos acoplados à proteína-G”, de modo especial, a um receptor com sequência de DNA homóloga à de receptores para a somatostatina - SLC1 (Saito et al., 1999). Já o MCHR2 foi descrito posteriormente e em humanos, e apresenta homologia somente a uma porção específica do DNA do MCHR1. Aquele é totalmente conservado entre os mamíferos, enquanto este é expresso somente em carnívoros e primatas, e não em roedores (Shi, 2004; Nahon, 2006).

Os receptores de MCH são acoplados a diferentes tipos de proteína-G (G_i, G_o e G_q), o que fundamenta parcialmente um papel multifuncional para o MCH em mamíferos (Shi 2004; Nahon, 2006). O MCH1R é acoplado às proteínas G_i, G_o e G_q e

assim inibe a produção de AMP cíclico induzida por forskolin e consequentemente reduz a sinalização pela proteína cinase A (PKA), aumentando os níveis intracelulares de Ca^{2+} livres. Também participa das vias que envolvem a proteinase C, fosfolipase C e MAPcinase (Shi, 2004). Por outro lado, o MCH2R é acoplado exclusivamente à proteína G_q , e sinaliza eventos que culminam no aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} livres (Nahon, 2006).

O papel fisiológico do MCH é de exercer uma modulação inibitória pós-sináptica da transmissão, principalmente glutamatérgica (Gao e van den Pol, 2001).

Haja vista que os ratos não detêm a peculiaridade da alteração adaptativa na coloração de sua pele, outras funções foram sugeridas ao MCH. Devido sua expressão ser predominantemente hipotalâmica, e a partir desse local inervar todo o neuroeixo (Bittencourt et al., 1992), o MCH foi sugerido com um agente regulador de respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais, que garantam o estado atencional/de alerta do organismo (Bittencourt et al., 1992).

Embasados inicialmente em evidências que o relacionaram à manutenção da homeostase energética, por meio da regulação da ingestão do alimento, do gasto energético e da termogênese (Shi, 2004), alguns estudos corroboram a fundamentação do MCH como agente orexígeno, por exemplo: 1) o RNA mensageiro do MCH é altamente expresso no hipotálamo durante o período de jejum em camundongos, assim como durante períodos casuais em camundongos obesos *ob/ob* (Qu et al., 1996) ou induzidos por dieta (Elliott et al., 2004); 2) camundongos *Mch*^{-/-}, caracterizados pela deleção do gene do MCH, apresentam uma diminuição em sua massa corpórea, devido a hipofagia e/ou aumento de seu catabolismo (Shimada et al., 1998); 3) camundongos *Mchl1r*^{-/-}, caracterizados pela deleção do gene do MCH1R, são magros, embora

hiperfágicos, hipermetabólicos e hiperativos (Chen et al., 2002); 4) a injeção intracerebroventricular do MCH provoca hiperfagia e aumento de massa corporal em animais, principalmente se alimentados com ração contendo doses moderadas de gordura (Qu et al., 1996; Gomori et al., 2003) e, 5) as injeções de MCH em regiões que apresentam o MCH1R, como os núcleos arqueado, paraventricular, dorsomedial do hipotálamo (Abbott et al., 2003) e no Acb (Georgescu et al., 2005), provocam um aumento da ingestão de alimento.

A sinalização e manutenção da homeostasia do estado energético derivam de um circuito que se inicia como resposta aos sinais periféricos de adiposidade, transmitidos principalmente pela leptina, e que alcançam dois subgrupos neuronais distintos situados no núcleo arqueado: neurônios que coexpressam NPY e AgRP e outro, de neurônios que coexpressam CART e POMC (Schwartz et al., 2000; Cowley et al., 2001; Berthoud, 2004; Coll et al., 2007). Aquele subgrupo libera substâncias neuroativas de função orexígena, enquanto este libera substâncias neuroativas de função anorexígena. Por sua vez, as projeções de ambos os subgrupos alcançam os neurônios de segunda ordem, localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH), área perifornical (PeF) e LHA. Os neurônios que constituem essa alça no núcleo PVH provavelmente são caracterizados pela oxitocina, TRH e CRF (Schwartz et al., 2000), enquanto os neurônios que constituem a alça no PeF e LHA são caracterizados pelo MCH e orexina/hipocretina, e ambos estão em íntima aposição com fibras imunorreativas (ir) ao NPY, AgRP e MSH - derivado da POMC - (Elias et al., 1998); as projeções assumidas pelos neurônios ir-MCH podem associar regiões distintas da parte central do sistema nervoso e assim influenciar a expressão de complexas respostas sensorio-motoras e

neuroendócrinas observadas na organização do comportamento alimentar (Bittencourt e Elias, 1998; Elias et al., 2008).

A regulação do estado energético e a manutenção de um nível basal de adiposidade também são influenciados por aspectos cognitivos e pelo contexto ambiental ao qual o organismo está inserido, como por exemplo, interações medicamentosas, o estado de ansiedade do organismo, a disposição de pistas no ambiente que se relacionem a determinados tipos de alimento e a facilidade para a aquisição de alimentos com altos teores energéticos e alta palatabilidade (Saper et al., 2002; Berthoud, 2004; Guesdon et al., 2010).

Alguns medicamentos, como drogas antipsicóticas atípicas - por exemplo, a olanzapina -, apresentam efeitos colaterais relacionados a distúrbios metabólicos, como o aumento de massa gorda e hiperfagia (Eder et al., 2001). Atribui-se que seus efeitos anabólicos adversos resultam de uma cascata de eventos desencadeados pela ligação dessas drogas a diversos receptores, como dopaminérgicos D₂, histaminérgicos H₁ e serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C} (Huang et al., 2006; Guesdon et al., 2010).

Especialmente em relação ao MCH, observou-se que não há interação entre a administração combinada da olanzapina com um agonista específico do MCH1R para os efeitos no comportamento alimentar, mas a administração isolada de olanzapina aumenta a expressão do RNAm do MCH1R no Acb. Dentre as observações que o uso de drogas antipsicóticas atípicas é associado ao aumento do apetite e de episódios deliberados de ingestão de alimentos, a influência da olanzapina na expressão do RNAm do MCH1R no Acb pode ser um provável mecanismo pelo qual tais drogas aumentam o iniciativa pela busca de alimento (Guesdon et al., 2010).

Outra faceta funcional do MCH o envolve no controle de processos emocionais e cognitivos, como por exemplo, a resposta ao estresse e a ansiedade (Borowsky et al., 2002; Roy et al., 2006). A administração intracerebroventricular de MCH aumenta a expressão de comportamentos típicos de ansiedade em ratos, e por outro lado, um pré-tratamento com antagonista seletivo para o MCH1R reverte os efeitos ansiogênicos do MCH (Borowsky et al., 2002; Smith et al., 2006). Camundongos *Mch1r*^{-/-} apresentam uma redução da expressão de comportamentos típicos de ansiedade e reduções na concentração de 5-HT no córtex pré-frontal (CPF), seja em seu nível basal, ou em sua liberação provocada pelo modelo de estresse de nado forçado (Roy et al., 2006); a administração de antagonista MCH1R também reduziu a concentração de acetilcolina no dialisado obtido do CPF de ratos submetidos ao estresse provocado pelo odor de predador (Smith et al., 2006).

De modo interessante, a administração sistêmica de um antagonista MCH1R proporcionou ao mesmo tempo uma redução da ingestão do alimento, uma redução da ansiedade e comportamentos semelhantes a ações antidepressivas (Borowsky et al., 2002), o que se permite postular que tais características possuam um componente comum, ao menos em locais específicos do sistema nervoso.

Corroborando nesse ponto, a administração de MCH no AcbSh resultou em um aumento da ingestão de alimento e de comportamentos semelhantes a ações depressivas, enquanto a administração de um antagonista MCH1R reverteu as referidas ações (Georgescu et al., 2005).

O mecanismo exato pelo qual os neurônios ir-MCH exercem sua função na organização dos comportamentos motivados, sobretudo o alimentar, ainda não está definido. Contudo, o padrão de projeção assumido por seus neurônios permite algumas

pressuposições (Bittencourt et al., 1992). Ademais, também foi descrita a presença de receptores para o MCH na grande maioria das regiões que recebem inervação ir-MCH (Kokkotou et al., 2001; Saito et al., 2001; Abbott et al., 2003).

Um grupamento descrito como alvo das projeções ir-MCH, situado no prosencéfalo basal e detentor de um aspecto importante da sinalização de reforço que certo estímulo possa exercer para o organismo, é o Acb (Bittencourt et al., 1992; Kelley et al., 2005). Sua relação funcional com o MCH tem sido paulatinamente caracterizada, seja na ingestão de alimento (Georgescu et al., 2005) ou em processos aditivos para a cocaína (Chung et al., 2009) e do mesmo modo, são crescentes as hipóteses para estabelecer tais relações no âmbito estrutural, capazes de reafirmar a compreensão de sua organização nos comportamentos motivados.

2 OBJETIVOS

- 1 - Mapear as aferências ir-MCH do Acb;
- 2 - Identificar possíveis contatos sinápticos entre fibras ir-MCH e células ir-GABA e ir-ChAT, no AcbSh.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 127 ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Long-Evans, mantidos em caixas plásticas, em grupos com no máximo seis animais, com água e ração comercial *ad libitum*. A temperatura da sala onde os ratos foram dispostos foi controlada e mantida em 21 ± 1 °C, sob um ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas às 07:00). Os animais foram criados no Biotério do Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela “Comissão de Ética em Experimentação Animal” do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob o registro 96, nas fls. 49 do livro 2.

Divididos de acordo com a idade e massa corporal, os animais compuseram dois grupos experimentais que permitiram delinear os seguintes experimentos:

Grupo experimental 1: Utilizaram-se 13 ratos com cerca de 40 dias de vida, de massa corporal entre 150 e 180 g., com a finalidade de realização de reações de imuno-histoquímica reveladas pelo método da peroxidase, para a descrição do padrão de inervação por fibras imunorreativas ao MCH/NEI no Acb, e da verificação de possíveis contatos sinápticos entre fibras ir-MCH, e células ir-GABA e ir-ChAT;

Grupo experimental 2: Utilizaram-se 114 ratos com cerca de 60 dias de vida, de massa corporal entre 280 a 310 g., submetidos a cirurgias estereotáxicas para a realização de injeções de traçadores neuronais retrógrados ou anterógrados, procedimentos de imuno-histoquímica revelados pelos métodos da peroxidase e da fluorescência – este para o

mapeamento das origens das aferências ir-MCH do AcbSh -, e de histoquímica, para revelação do controle anterógrado.

3.2 Cirurgia estereotáxica

Os animais do grupo experimental 2 foram inicialmente submetidos, via subcutânea, a uma solução anestésica contendo acepromazina (1mg/mL), xilazina (5 mg/mL) e cetamina (25 mg/mL), em veículo aquoso, com dosagem de 0,2 mL/100g de massa corporal. Verificado o efeito anestésico, seguiu-se a tricotomia na região superior da cabeça, e fixação do animal em aparelho estereotáxico (David-Kopf Instruments, EUA). O escalpo foi rebatido, e a trepanação seguiu as coordenadas adaptadas do atlas estereotáxico do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998).

Para as injeções focadas no AcbSh, seguiram-se os seguintes valores: AP: +1,4 mm; ML: -0,75 mm; DV: -5,6 mm; para as injeções focadas no AcbC, os valores foram: AP: +1,6mm; ML: -1,4 mm; DV: -5,8 mm; já para as injeções realizadas na LHA, seguiram-se: AP: -1,5 mm; ML: -1,6 mm; DV: -5,9 mm.

Realizada a trepanação (com atenção para a manutenção da integridade da dura-máter, condição necessária inclusive para a determinação da coordenada em seu eixo DV), foi realizada a injeção do traçador neuronal FluoroGold® (Fluoro-Chrome Inc., EUA), no AcbSh, por meio de micropipetas de vidro com diâmetro interno da ponta da ordem de 15µm, e injetado por iontoforese (5µA de corrente pulsátil, 7s. *on*/7s. *off*), por 5 minutos, provida de aparelho da marca CS3 (Midgard Electronics). Após o período de injeção, as micropipetas foram deixadas no local por 10 minutos, para se evitar o escoamento do traçador ao longo do trajeto da micropipeta.

Para uma comparação da efetividade de transporte retrógrado, também foi realizada a injeção do traçador neuronal retrógrado CTb (subunidade β da toxina colérica) no AcbSh, por meio de micropipetas de vidro com diâmetro interno da ponta da ordem de 15 μ m, e injetado por iontoforese (5 μ A de corrente pulsátil, 7s. *on*/7s. *off*), por 15 minutos, provida de aparelho da marca CS3 (Midgard Electronics). Após o período de injeção, as micropipetas também foram deixadas no local por 10 minutos, com a mesma finalidade de se evitar o escoamento do traçador ao longo do trajeto da micropipeta.

O controle anterógrado foi conduzido com o traçador neuronal anterógrado BDA (DextranaAmina Biotinilada) a partir dos resultados obtidos com os traçadores FG[®] e CTb. Foram realizadas injeções na LHA, por meio de micropipetas de vidro com diâmetro interno da ponta da ordem de 15 μ m, e injetado por iontoforese (3-5 μ A de corrente pulsátil, 7s. *on*/7s. *off*), por 20 minutos, provida por fonte de corrente marca CS3 (Midgard Electronics). Após o período de injeção, as micropipetas também foram deixadas no local por 10 minutos, antes de sua retirada.

Após a retirada da micropipeta de vidro, os animais foram submetidos ao fechamento da incisão cirúrgica no escalpo por meio de grampos, e a região tratada com antibiótico tópico [sulfato de neomicina (5mg/g) + bacitracina (250 UI/g), laboratórios Medley, SP]. Ao restabelecimento de suas ações motoras, os ratos foram devolvidos ao biotério.

3.3 Preparação do tecido

Os animais do grupo experimental 2 permaneceram um período pós-cirúrgico de ou 15 a 20 dias, para FG[®] e CTb - necessário para o transporte e preenchimento adequado do traçador retrógrado ao corpo celular e em tempo hábil para a não ocorrência de captação do fluoróforo por células gliais - ou de 7 a 10 dias, para BDA, necessário para o transporte do traçador anterógrado ao longo do axônio sem ocorrência de transporte retrógrado paradoxal.

Após o respectivo tempo pós-cirúrgico, os animais foram anestesiados mediante aplicação intraperitoneal de uma solução de hidrato de cloral a 35%, na dose de 1mL/animal. Sendo observado seu efeito, iniciou-se o procedimento para posicionamento de cânula de bomba infusora, via transcardíaca/aorta ascendente, primeiramente para lavagem do leito vascular com de cerca de 150 mL de solução salina a 0,9%. Em seguida, o leito vascular foi perfundido com de cerca de 700 mL de formaldeído a 4% (preparado previamente a partir de paraformaldeído aquecido a 60-65 °C), acrescido de bórax a 3,8% (ambos obtidos de LabSynth, Diadema – BR), durante 25 min.

Os encéfalos foram retirados, e pós-fixados na mesma solução fixadora descrita acima, acrescida de 20% de sacarose (LabSynth, Diadema – BR) em KPBS - da sigla em inglês, salina tamponada em fosfato de potássio -, e mantidos sob refrigeração (4 °C) por um período de aproximadamente 18h.

Os animais do grupo experimental 1 foram perfundidos de maneira semelhante, com única exceção ao tempo de pós-fixação a que seus encéfalos foram submetidos - por um período de 1 ½h -, sendo posteriormente imersos em solução de crioproteção,

obtida com 20% sacarose em KPBS, por um período aproximado de 18h, sob refrigeração a 4 °C.

O corte dos encéfalos foi realizado por meio de micrótomo de congelção (Leica Instruments, Alemanha), no plano frontal com espessura de 30µm, em 5 séries de 1 em 5, e armazenados em solução anticongelante (composta de 30% de etilenoglicol e 20% de glicerol, tamponada em KPBS), sob temperatura de -22 °C.

3.4 Localização do traçador

O local de injeção obtido com o uso do FluoroGold[®] foi visualizado por meio de microscópio de epifluorescência, sob filtro de luz ultravioleta, na faixa entre 340 a 380 nm. Havendo indícios de um correto depósito do traçador no AcbSh, a partir de comparação com o atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1998) e sem a ocorrência de contaminação ao longo do trajeto de introdução da micropipeta, o material foi submetido aos passos sequenciais que objetivam este estudo.

O local de injeção obtido com o CTb foi examinado a partir da reação de imuno-histoquímica revelada pela peroxidase (descrita adiante), e ao mesmo modo, comprovado o correto depósito do traçador no AcbSh, e a ausência de alguma contaminação, o material foi submetido aos passos sequenciais do estudo.

Já o local de injeção obtido a partir do uso da BDA foi visualizado após reação de histoquímica, também descrita adiante. Os critérios para inclusão dos casos de controle anterógrado aos passos sequenciais desse estudo seguiram as mesmas condições impostas aos casos de traçadores retrógrados.

3.5 Técnica de Nissl

Utilizamos-nos desta técnica com a finalidade de descrição citoarquitetônica, tanto das regiões alvo do traçador, assim como das regiões que possuam células retrogradamente marcadas. Para isso, os cortes de uma série seguinte foram montados em lâminas gelatinizadas, secas em estufa por aproximadamente 24h e, a seguir foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, deslipidificados em xilol, reidratadas e imersas em 0,25% tionina. A cobertura das lâminas com lamínulas utilizou como meio de montagem o DPX (Aldrich Chemical Co.).

3.6 O método da imuno-histoquímica

3.6.1 Imunoperoxidase

A técnica de imuno-histoquímica revelada pelo método da peroxidase foi utilizada para a detecção e descrição da imunorreatividade referente: 1) às fibras ir-MCH que inervam o Acb; 2) aos neurônios aferentes do Acb, ir-FG[®] e ir-CTb.

Consistiu inicialmente em lavagens dos cortes dos encéfalos em KPBS 0,02M, pH 7,4 e tratamento com solução de 0,3% de peróxido de hidrogênio (LabSynth, Diadema – BR) para remoção da peroxidase endógena. Novamente o material foi lavado em KPBS para posterior incubação em 0,3% de Triton X-100 em KPBS, 3% de soro normal do animal de origem do anticorpo secundário e anticorpo primário: anti-MCH ou anti-NEI, [1:100.000], policlonais, gerados em coelho a partir de antígeno de rato – cedido pelos Dra. Joan Vaughan e Dr. Wylie W. Vale, do “Peptide Biology Laboratory” do Instituto Salk para Estudos Biológicos, La Jolla, Califórnia, EUA -

especificidade já testada, vide Bittencourt et al. (1992); anti-FG[®], na [1:60.000], policlonal, gerado em coelho contra antígeno de rato, produzido por Chemicon International Incorporation. CA, USA; anti-CTb, [1:60:000], policlonal, gerado em cabra contra antígeno de rato, produzido por Chemicon International Incorporation. CA, USA. Os cortes permaneceram nas respectivas soluções cerca de 18h, em temperatura ambiente, sob constante agitação. Após esse período, os cortes foram lavados em KPBS, e posteriormente incubados em anticorpo secundário para a Ig-G, biotinilado, gerado em cabra (para os anticorpos anti-MCH/NEI e anti-FG[®]) ou gerado em cavalo (para os anticorpos anti-CTb) – ambos produzidos por Vector Laboratories, Burlingame, EUA -, [1:800], por 1h e sob constante agitação. Ao término deste período, o material foi lavado novamente em KPBS, e em seguida, incubado no complexo avidina-biotina, [1:333] (Kit Elite, Vector Laboratories, Burlingame – EUA), por 1h, sob constante agitação. Em seguida, os cortes foram lavados em KPBS e tampão acetato, e logo após, submetidos à reação de peroxidase, fornecida por solução tampão acetato, cromógeno tetracloreto de diaminobenzidina (DAB, Sigma), 0,05% níquel sulfato de amônia e 0,01% de peróxido de hidrogênio. A reação foi finalizada com lavagens em KPBS. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratados e cobertos com lamínulas, usando DPX como meio de montagem.

3.6.2 Dupla reação de imunoperoxidase

Esta técnica foi utilizada para a detecção das fibras ir-MCH que supostamente fazem contatos sinápticos com células de determinadas assinaturas bioquímicas, no AcbSh.

Trata-se da realização sequencial de dois procedimentos de imuno-histoquímica revelados pelo método da peroxidase (descritos anteriormente), atentando-se à diferença necessária quanto à escolha do animal fonte do anticorpo primário, para que a incubação no anticorpo secundário não resulte em reação cruzada.

Os procedimentos de realização de cada reação da dupla marcação envolvendo o MCH e o GABA são os mesmos descritos no item anterior, excetuando-se que a segunda reação com o cromógeno DAB não apresentou o tampão acetato em sua solução, e sim tampão Tris 0,05M, pH 7,2 (Sigma-Aldrich Inc. MO, USA). A primeira reação consistiu da incubação dos cortes em solução contendo o anticorpo anti-MCH (descrito no item anterior), especificidade já testada por Bittencourt et al., 1992, [1:100.000], por cerca de 72h, sob constante agitação e a 4 °C. Nesta primeira reação foi usado o níquel na solução de reação com o cromógeno DAB. Após sua finalização, os cortes foram lavados em KPBS a cada 5 minutos, durante 60 minutos e então incubados em solução contendo o anticorpo anti-GABA, [1:3.000] – policlonal, gerado em porco-da-índia contra antígeno de rato, fabricado por Protos Biotechnologies Corporation, NY, USA – por cerca de 18h, sob constante agitação e em temperatura ambiente. Os passos sequenciais são idênticos aos descritos no item anterior, ressaltando o uso do anticorpo secundário contra porco-da-índia, feito em cabra (Vector Laboratories, Burlingame – EUA), uso do tampão Tris 0,05M, pH 7.2 (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA) e a ausência do níquel na solução de reação com o cromógeno DAB.

A dupla marcação envolvendo o MCH e o ChAT, ressalta-se, apresentou uma mudança na ordem de realização das referidas incubações, como descrito a seguir:

Consistiu inicialmente em lavagens dos cortes dos encéfalos em KPBS 0,02M, pH 7,4 para posterior incubação em solução 0,4% de Triton X-100 em KPBS e 10% soro normal de burro, por 30 min. Após esse período, os cortes foram imediatamente

incubados em nova solução contendo 0,4% de Triton X-100 em KPBS, 2% soro normal de burro e anticorpo primário anti-ChAT – produzido por Chemicon International Incorporation, CA, USA - [1:750], por cerca de 48h, a 4 °C e sob constante agitação.

Passadas as 48h, os cortes foram lavados em KPBS e incubados em solução contendo 0,4% de Triton X-100 em KPBS e anticorpo secundário anti-IgG de cabra, feito em burro, biotinilado – produzido por Jackson ImmunoResearch Laboratories Incorporation, USA -, [1:2000], por um período de 2h, em temperatura ambiente, sob constante agitação. Em seguida os cortes foram novamente lavados em KPBS para posterior incubação em solução contendo o complexo avidina-biotina (Kit Elite, Vector Laboratories, Burlingame – EUA), [1:333], em KPBS, por 2h, em temperatura ambiente, sob constante agitação. A finalização do procedimento consistiu de nova lavagem em KPBS e incubação dos cortes em solução tampão fosfato de sódio, 0,05% do cromógeno tetracloreto de diaminobenzidina (DAB), 0,6% glicose oxidase, 0,4% cloreto de amônia, por 10 min. A reação com a peroxidase foi iniciada com a adição de 10% β -D-glicose, com duração de cerca de 6 min. e finalizada com lavagens em KPBS.

Após extensas lavagens, iniciou-se a incubação para a segunda reação imuno-histoquímica, com anticorpo anti-MCH. Os cortes foram incubados em solução contendo 0,4% de Triton X-100 em KPBS e 10% soro normal de burro, por 30 min. Após esse período, os cortes foram imediatamente incubados em nova solução contendo 0,4% de Triton X-100 em KPBS, 2% soro normal de burro e anticorpo primário anti-MCH (descrito anteriormente) [1:10.000], por cerca de 48h a 4 °C, sob constante agitação. Os passos sequencias se desenvolveram à mesma maneira da primeira reação, excetuando-se a utilização de anticorpo secundário biotinilado anti-IgG de coelho, feito de cabra, [1:2.000], e o acréscimo de 0,5% de sulfato de níquel à solução de reação com a peroxidase.

3.6.3 Imunofluorescência

Utilizou-se esta técnica para a visualização dos corpos neuronais duplamente marcados pela ir-MCH e também captação retrógrada de traçador, FG[®] ou CTb.

O traçador FG[®] é caracterizado por sua autofluorescência, o que permite sua visualização direta, por meio de excitação fluorescente com filtro UV. Assim, para a investigação de sua colocação em neurônios ir-MCH, realizou-se apenas a etapa de visualização do MCH, caracterizada por uma reação de imunofluorescência com anticorpo anti-MCH, conjugado a um fluoróforo excitável sob filtro distinto.

Para tanto os cortes foram inicialmente lavados em tampão KPBS e incubados em solução contendo o anticorpo primário anti-MCH, [1:1000], 3% soro normal de burro e 0,3% de Triton X-100 em KPBS por 18h, sob agitação, à temperatura ambiente e protegidos da luz. Após esse período os cortes foram novamente lavados em KPBS e a seguir incubados em solução contendo anticorpo secundário feito em burro contra as imunoglobulinas de coelho, marcado com o fluoróforo FITC (isoticianato de fluoresceína) – produzido por Jackson ImmunoResearch Laboratories Incorporation, USA -, [1:200], e 0,3% de Triton X-100 em KPBS, sob constante agitação, em temperatura ambiente, por 2h; algumas observações posteriores levaram à substituição do fluoróforo conjugado ao anticorpo secundário, que passou a se constituir pelo Cy3, seguindo as mesmas concentrações e condições de temperatura e tempo de incubação descritas anteriormente. Na sequência, os cortes foram lavados novamente em KPBS, montados em lâminas gelatinizadas, dispostos para secagem em temperatura ambiente por cerca de 30 min. ao abrigo da luz e cobertos com lamínulas, utilizando como meio de montagem o tampão glicerol. As lâminas foram examinadas em microscópio de

epifluorescência com filtros de luz ultravioleta entre 340 a 380 nm para a visualização da autofluorescência do FG[®], de luz azul a 493 nm para a visualização do FITC ou de 554 nm para a excitação do Cy3.

Por outro lado, a visualização do traçador CTb é realizada de maneira indireta, por meio de imuno-histoquímica, neste caso, com anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo.

Como os anticorpos para o CTb e para o MCH são produzidos em animais distintos (em cabra e em coelho, respectivamente), as duas reações de imunofluorescência são conduzidas simultaneamente, em uma mesma solução, conforme a seguinte descrição. Houve uma lavagem inicial dos cortes em tampão KPBS e seguinte incubação em solução contendo anticorpo primário anti-MCH [1:1000], um segundo anticorpo primário anti-CTb [1:1000], 3% soro normal de burro, 3% soro normal de cavalo e 0,3% de Triton X-100 em KPBS por 18h, sob agitação, à temperatura ambiente e protegidos da luz. Após esse período os cortes foram novamente lavados em KPBS e a seguir incubados em solução contendo anticorpo secundário feito em burro contra as imunoglobulinas de coelho - marcado com o fluoróforo Cy2 -, um segundo anticorpo secundário feito em cavalo contra as imunoglobulinas de cabra - marcado com o fluoróforo Cy3 -, ambos na concentração de 1:200 e 0,3% de Triton X-100 em KPBS, sob constante agitação, em temperatura ambiente, por 2h. Em seguida, os cortes foram lavados novamente em KPBS, montados em lâminas gelatinizadas, dispostos para secagem em temperatura ambiente por cerca de 30 min. ao abrigo da luz e cobertos com lamínulas, utilizando como meio de montagem o tampão glicerol. As lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência com picos de emissão de luz a 492 nm, para excitação do fluoróforo Cy2, e de 554 nm, para a excitação do Cy3.

3.7 Histoquímica para revelação do BDA

Inicialmente os cortes foram lavados em KPBS e tratados com peróxido de hidrogênio a 0,3%. Em seguida, os cortes foram novamente lavados em KPBS, para posteriormente serem incubados no complexo avidina-biotina, [1:333] (Kit Elite), por 1h, sob constante agitação. Após nova lavagem em KPBS os cortes foram submetidos à reação de peroxidase, fornecida por solução contendo KPBS, 0,005% do cromógeno DAB e 0,01% de peróxido de hidrogênio. A reação foi finalizada com lavagens em KPBS. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratados e encaminhados ao procedimento sequencial de intensificação pela prata e ouro.

3.8 Intensificação pela prata e ouro

O procedimento foi utilizado para melhorar a visualização do padrão de distribuição das fibras ir-MCH do Acb e da marcação resultante do uso do traçador anterógrado BDA. Sua utilização realça a coloração obtida pela reação do DAB, e permite um maior contraste na visualização das fibras em campo escuro, que se tornam mais espessas e com coloração dourada/brilhante. Uma contra-indicação deste procedimento é o emprego de níquel na solução utilizada ainda durante a revelação do DAB, pois a prata se ligaria inespecificamente a essa molécula, aumentando a “marcação de fundo” no tecido.

Esse método consistiu na desidratação e reidratação em concentrações crescentes e decrescentes, respectivamente, de álcool etílico. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de nitrato de prata a 1% (em água destilada e hidróxido de amônio), em banho a 56 °C, por 60 minutos. Após isso, as lâminas permaneceram sob água

corrente para a remoção do excesso da solução de prata. Na seqüência, as lâminas foram imersas em solução de ouro a 0,1%, sob constante agitação, por 10 minutos. Novamente foram expostas à água corrente para remoção do excesso da solução, e então submetidas ao tiosulfato de sódio a 5%, sob constante agitação, por 5 minutos. A finalização do procedimento consistiu em lavagem do material em água corrente, desidratação, deslipidificação e cobertura com lamínulas utilizando como meio dióptrico o DPX.

3.9 Osmicação

Esta técnica foi utilizada para a visualização dos neurônios ir-FG[®], visto que também intensifica o produto de reação do DAB, amplificando a sensibilidade da técnica de imunoperoxidase para a análise da citoarquitetura neuronal.

As lâminas contendo os cortes foram primeiramente desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico e deslipidificadas em xilol histológico, reidratadas e imersas em solução de ósmio a 0,005%, por 30 minutos. Após, foram expostas a água corrente para remoção do excesso de ósmio das lâminas.

O passo seguinte foi a imersão em tiocarbohidrazida a 0,05% por 15 minutos. Houve uma reexposição em água corrente, e em seguida novamente a imersão na mesma solução de ósmio utilizada, por 30 minutos. Para a finalização do procedimento, as lâminas foram dispostas em água corrente, desidratadas e deslipidificadas, e então cobertas com lamínulas utilizando como meio dióptrico, o DPX.

3.10 Aquisição de imagens

Utilizou-se o microscópio óptico Leica DMR (Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com epifluorescência Leica EL6000 (Leica, Wetzlar, Alemanha).

As imagens foram adquiridas com a câmera digital, acoplada ao microscópio, da marca Nikon – digital sight DS-Ri1 (Nikon Corporation, Japão), utilizando-se o software de captura e análise de imagens NIS-Elements BR 3.0 (Nikon Corporation, Japão).

Os ajustes gráficos das imagens foram realizados por meio do software Adobe Photoshop Elements 6.0.

4 RESULTADOS

4.1 O Acb pelo método de Nissl

A utilização do método de Nissl, com uso da tionina, permitiu uma pronta diferenciação entre os limites, de um modo geral, do estriado e dos demais núcleos prosencefálicos adjacentes; para isso, o tamanho menor dos corpos neuronais estriatais e o sobressalente feixe de fibras da banda diagonal de Broca foram características fundamentais.

Uma maior densidade celular destacou regiões como o epêndima do ventrículo olfatório, o tubérculo olfatório e as ilhotas maiores de Calleja, permitindo a identificação da sintopia geral do estriado ventral, e de modo especial, do Acb; exemplos são apresentados em três divisões fundamentais do Acb em seu eixo rostro-caudal: seu pólo rostral e suas porções rostral e caudal, na figura 1.

A multicompartimentalização e citoarquitetura típicas do Acb puderam ser observadas principalmente ao se comparar com o que é apresentado pelo complexo caudado-putâme, cujo tipo de compartimento predominante é em estriossoma (ou *patches*). No Acb, verificaram-se pontos de distribuição aleatória, e interposta, dos tipos de compartimento – estriossoma e matrix -, principalmente no AcbSh. Observa-se também que o Acb é composto por neurônios cujos corpos possuem um tamanho menor, por exemplo, quando comparados aos de neurônios dispostos no septo medial/VDB.

Figura 1. Apresentação do núcleo *accumbens* pelo método de Nissl. Fotomicrografias de seção frontal de encéfalo de rato, visualizadas em campo claro e coradas pela fionina para observação da sintopia do núcleo *accumbens*, em seu pólo rostral (A) e porções rostral (B) e caudal (C). Legenda: E/OV: epândima do ventrículo olfatório; ac: comissura anterior; Tu: tubérculo olfatório; CPU: caudado-putâame; ICJM: ilhotas maiores de Cálla. Barra de escala:

4.2 Distribuição das fibras ir-MCH/NEI no Acb

O padrão de distribuição de fibras e terminais ir-MCH/NEI foi examinado detalhadamente para cada porção e subregião do Acb, atentando-se inclusive a possíveis relações com os padrões de compartimentalização; uma avaliação semiquantitativa, referendada em símbolos, representou a densidade de inervação encontrada para cada porção e/ou subregião do Acb. Nessa avaliação, “+” representa uma baixa densidade; o símbolo “+ / +++” representa um nível intermediário, de baixa a moderada densidade e o símbolo “++” representa uma moderada densidade de fibras e/ou terminais ir-MCH/NEI (tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Avaliação semiquantitativa da distribuição das fibras e terminais ir-MCH nas diferentes porções e subregiões do Acb.

Nível AP	Pólo Septal	Shell Medial	Shell Ventral	Shell Lateral	Core	Pólo Rostral
-2,7	Ø	Ø	Ø	Ø	+	+
-2,2	Ø	+ / +++	+	Ø	+	Ø
-1,7	Ø	++	+	+	+	Ø
-1,6	Ø	++	+	+	+	Ø
-1,2	++*	+ / +++	+	+	+	Ø
-1	++*	+ / +++	+ / +++	+	+	Ø
-0,7	++*	+ / +++	+ / +++	+	+	Ø
-0,4	++	+ / +++	Ø	Ø	+	Ø

*= para território ventromedial ao LV

Os símbolos +, + / +++ e ++ representam: baixa, baixa a moderada e moderada densidades, respectivamente. Já o símbolo Ø, representa a ausência da subregião no referido eixo Ântero-Posterior (AP); n= 5. De acordo com Paxinos e Watson, 1998.

Tabela 2 - Avaliação semiquantitativa da distribuição das fibras e terminais ir-NEI nas diferentes porções e subregiões do Acb.

Nível AP	Pólo Septal	Shell Medial	Shell Ventral	Shell Lateral	Core	Pólo Rostral
-2,7	Ø	Ø	Ø	Ø	+	+
-2,2	Ø	+/++	+	Ø	+/++	Ø
-1,7	Ø	+/++	+	+	+	Ø
-1,6	Ø	++	+	+	+	Ø
-1,2	++*	++	+	+	+	Ø
-1	++*	++	+ / ++	+	+	Ø
-0,7	++*	++	+ / ++	+	+	Ø
-0,4	++	++	Ø	Ø	+/++	Ø

*= para território ventromedial ao LV

Os símbolos +, +/+ e ++ representam: baixa, baixa a moderada e moderada densidades, respectivamente. Já o símbolo Ø, representa a ausência da subregião no referido eixo Ântero-Posterior (AP); n= 5. De acordo com Paxinos e Watson, 1998.

Fibras e terminais ir-MCH/NEI apresentam uma distribuição heterogênea dentro do Acb, e inervam preferencialmente a subregião AcbSh. De modo mais específico, a inervação ir-MCH/NEI predomina na parte medial do AcbSh, sob uma densidade moderada de fibras e terminais, enquanto as mais baixas densidades de inervação são observadas no AcbC (figura 2).

O pólo rostral apresenta uma baixa densidade de fibras e terminais ir-MCH/NEI, distribuídos, de modo geral, de maneira homogênea – embora com ligeiro predomínio em um território ventral -. Ressalta-se que a diferença na densidade de fibras e terminais ir-MCH/NEI destaca inteiramente o pólo rostral dos neurônios adjacentes, pertencentes à região olfatória.

Na porção rostral do Acb, onde se inicia uma clara distinção territorial entre o AcbSh e AcbC, observa-se a nítida preferência assumida pela inervação ir-MCH/NEI à parte medial da subregião AcbSh, disposta sob uma densidade moderada de fibras e terminais. Já as partes ventral e lateral do AcbSh, assim como o AcbC, apresentam respectivamente um padrão decrescente na densidade de inervação ir-MCH/NEI.

Figura 2. Padrão de distribuição das fibras e terminais ir-MCH/NEI no Acb. Fotomicrografias de seção frontal de encéfalo de rato, visualizadas em campo escuro, apresentando as diferentes densidades de inervação ir-MCH (A, B e C) e ir-NEI (D, E e F) nas porções e subregiões do Acb. Legenda: E/OV: epéndima do ventrículo olfatório; LV: ventrículo lateral; ac: comissura anterior. Barra de escala: 500 μm.

A porção caudal do Acb apresenta um padrão de inervação semelhante ao descrito para a porção rostral, mas com relevância para o pólo septal – parte dorsocaudomedial do AcbSh -, que passa a apresentar um território específico, ventromedial ao ventrículo lateral, como o local da mais alta densidade de fibras e terminais ir-MCH/NEI, observada para o Acb.

4.3 Injeções de traçador neuronal retrógrado

Em vista da maior densidade de fibras ir-MCH ser observada na parte medial do AcbSh, principalmente em seu pólo septal, tal território foi selecionado como alvo de injeção dos traçadores retrógrados FG[®] e CTb para o mapeamento das aferências ir-MCH. Para o delineamento dessa etapa do trabalho, obtivemos 21 casos com sucesso de injeções de FG[®] e 04 casos com sucesso de injeção de CTb; exemplos de casos positivos são apresentados na figura 3. Detentor da mais baixa densidade de fibras ir-MCH, o AcbC também foi alvo das injeções de FG[®], com o intuito de se obter um controle a respeito das aferências hipotalâmicas do Acb. Para tanto, foram obtidos 3 casos positivos.

A disposição geral das injeções dos traçadores retrógrados utilizados neste estudo são apresentadas sob a forma de esquemas ilustrativos, adaptados do atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson, 1998 (figura 4).

As injeções em ambas subregiões do Acb resultaram em células retrogradamente marcadas nas seguintes regiões: 1) após injeções no AcbSh: córtex infra-límbico, nos núcleos paraventricular, central medial e paracentral do tálamo, nos complexos amigdalóides basolateral e basomedial, na área tegmental ventral, e em regiões

Figura 3. Exemplos das injeções dos traçadores retrógrados no AcbSh. Fotomicrografias de secções de encéfalos de rato, visualizadas diretamente pela autofluorescência do FG (A) ou por imunofluorescência anti-CTb (B). Legenda - ac: comissura anterior; LV, ventrículo lateral. Barra de escala: 500 μ m.

Figura 4. Esquematisação dos locais de injeção dos traçadores retró-grados no Acb. Os pontos representam o centro das injeções, realizadas com FG (para AcbSh e AcbC) ou CTb (para AcbSh), para posterior mapeamento e investigação de duplas marcações. Adaptado de Paxinos e Watson (1998).

hipotalâmicas como a LHA, a PeF, o PVH, a IHy, a área internuclear (I), hipotálamo posterior (PH), núcleo arqueado; 2) a partir do AcbC: encontramos marcação retrógrada no córtex pré-límbico, nos núcleos paraventricular e paracentral do tálamo e no complexo amigdalóide basolateral.

Observamos que a diferença na ir-FG[®] observada no hipotálamo se dá especificamente para as partes tuberal e mamilar da LHA e da PeF, e são decorrentes de injeções do traçador na subregião AcbSh, que resultam em uma densidade moderada de neurônios retrogradamente marcados; por outro lado, as injeções no AcbC, mostram evidente ausência de imunorreatividade em secção de nível semelhante (figura 5).

As injeções de CTb, do mesmo modo, apresentaram uma adequada captação retrógrada. Os resultados obtidos por meio das injeções de CTb corroboraram os achados descritos para as aferências do AcbSh, seja na literatura, ou com os obtidos com o uso do FG[®]. Em relação às aferências hipotalâmicas do AcbSh, o CTb revelou uma maior densidade de neurônios retrogradamente marcados no hipotálamo, revelando inclusive ramificações dendríticas primárias das células da LHA.

Figura 5. Aferências hipotalâmicas do Acb. Observa-se uma injeção de traçador retrógrado FG no AcbSh (A) e sua captação por neurônios da LHA e PeF (C e E); em B, a injeção do traçador no AcbC não resultou em captação por neurônios hipotalâmicos em território semelhante (D e F). Legenda - LV: ventrículo lateral; ac: comissura anterior; f: fórnice; opt: trato óptico. Barra de escala: A e B, 500µm; C e D, 200 µm; E e F, 100µm.

4.4 As aferências ir-MCH do AcbSh

A investigação da colocalização entre a marcação retrógrada no hipotálamo e a ir-MCH foi conduzida por imunofluorescência, a partir de dois diferentes traçadores, com efetividade amplamente atestada para suas características de captação retrógrada.

A partir do uso da autofluorescência do FG[®], a captação retrógrada nas células hipotalâmicas foi observada apenas em objetivas de 100X. Evidenciou-se uma grande quantidade de fluoróforo agrupada em forma de grânulos ao longo do citoplasma de alguns neurônios, não preenchendo-o uniformemente.; uma grande quantidade de neurônios hipotalâmicos da LHA e da PeF, principalmente em suas partes tuberal e mamilar, exibiram tais características, sendo inclusive colocalizados com ir-MCH.

Para a confirmação da descrição dos locais de ocorrência das duplas marcações, principalmente se referindo às condições de disposição do FG[®] no interior do citoplasma, utilizou-se o CTb. Sua imunorreatividade, revelada pela imunofluorescência, abrangeu completamente o citoplasma de neurônios hipotalâmicos e assim, proporcionou melhor acurácia, seja para a detecção das células com captação retrógrada, ou para a observação das duplas marcações com o MCH (figura 6).

Assim, os neurônios duplamente marcados pela ir-MCH e pela captação retrógrada de traçador, revelaram como locais de origem das projeções ir-MCH confluentes no AcbSh: LHA, PeF, IHy, I, PVH, PH, o núcleo subincertal e o núcleo entopeduncular (ou globo pálido medial). A distribuição das duplas marcações no hipotálamo foi representada sob a forma de esquemas adaptados do atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1998) (figura 7).

Figura 6. Células duplamente marcadas no hipotálamo. Fotomicrografias de seções de encéfalos de ratos observadas em epifluorescência, ilustrando: o aspecto de preenchimento citoplasmático, pela autofluorescência do FG (A) e pela ir-CTb (D); a ir-MCH (B e E) e sua colocalização em neurônios hipotalâmicos [merge (C e F)]. Legenda - 3V: terceiro ventrículo. Barra de escala - B: 10 μ m e E: 100 μ m.

continua

conclusão

Figura 7. Distribuição das aferências hipotalâmicas do AcbSh e dos neurônios ir-MCH. Esquematização organizada em um eixo rostro-caudal (A-L) onde os neurônios ir-MCH são representados em vermelho, as aferências do AcbSh, em preto e os neurônios duplamente marcados, em azul. Adaptação de Paxinos & Watson, 1998.

Quantificamos os neurônios retrogradamente marcados (ir-CTb) e duplamente marcados (ir-MCH + ir-CTb) nas referidas regiões hipotalâmicas e estabelecemos a relação percentual das duplas marcações para cada região. A LHA foi a região com o maior número de células retrogradamente marcadas encontradas para o hipotálamo ($92,33 \pm 2,65$), mas por outro lado, com o menor percentil estabelecido para ocorrência de duplas marcações, 7,58%. A IHy, ainda que com um número mediano de células retrogradamente marcadas ($16 \pm 0,93$), apresentou o maior percentil para visualização de duplas marcações (33,33%) (tabela 3).

Tabela 3 - Quantificação das células hipotalâmicas retrogradamente marcadas (ir-CTb) e duplamente marcadas (ir-MCH + ir-CTb).

	LHA	PeV	IHy	PeF	I	PH
Células RM	92,33 ($\pm 2,65$)	37,33 ($\pm 1,68$)	16 ($\pm 0,93$)	28,33 ($\pm 1,92$)	13 ($\pm 1,24$)	9 ($\pm 2,04$)
Células DM	7 ($\pm 1,26$)	9,33 ($\pm 0,87$)	5,33 ($\pm 0,66$)	4,66 ($\pm 0,57$)	3 ($\pm 0,95$)	2,66 ($\pm 0,47$)
DM/RM (%)	7,58	25	33,33	16,47	23,07	29,62

Legenda - RM: retrogradamente marcadas; DM: duplamente marcadas; LHA: área hipotalâmica lateral; PeV: área periventricular; I, área internuclear; IHy: área incerto-hipotalâmica; PeF: área perifornical; PH: hipotálamo posterior.

Contagem realizada manualmente em seções de encéfalos de ratos submetidas à dupla reação de imunofluorescência. Os ratos foram injetados com o traçador CTb no AcbSh. Valores expressos em média ($\pm$ desvio padrão), para n=3.

4.5 Controle anterógrado das aferências hipotalâmicas do AcbSh

Em vista da maior densidade de neurônios hipotalâmicos retrogradamente marcados pertencerem à área hipotalâmica lateral, esta foi a região escolhida para a realização do controle anterógrado deste estudo.

As injeções de BDA constituíram 6 casos positivos, de acordo com os mesmos critérios de validação expostos na sessão de materiais e métodos. É válido ressaltar que as referidas injeções abrangem territórios distintos da LHA, o que facilita uma compreensão mais ampla de uma possível distribuição topográfica das fibras provindas da LHA que confluam no AcbSh; o caso BDA#1 é caracterizado por uma injeção em um território ventral ao fórnice, enquanto o caso BDA#2, por uma injeção imediatamente lateral ao fórnice. O caso BDA#3, atingiu um território dorsolateral, o caso BDA#4, um território dorsal, e os casos BDA#5 e BDA#6, territórios dorsomediais, todos em relação ao fórnice (figura 8).

Marcações anterógradas foram observadas no pólo septal do AcbSh, especialmente no território ventromedial ao ventrículo lateral (figura 9). Tal aspecto foi obedecido especialmente nos casos onde as injeções ocuparam os territórios ventral e mediais da LHA, com a maior densidade resultante do caso BDA#2.

Figura 8. Locais de injeção para controle anterógrado. Fotomicrografias de secções de encéfalos de ratos, visualizadas em campo escuro e submetidas à histoquímica para visualização da disposição da BDA, em diferentes territórios da LHA, obtidos em seis casos positivos. Legenda: f: fórnice; 3V: terceiro ventrículo. Barra de escala: 1000 μ m.

Figura 9. Inervação do AcbSh oriunda da LHA. Fotomicrografias de encéfalos de ratos, visualizadas em campo escuro, evidenciando as fibras e/ou terminais revelados pela histoquímica do BDA inervando preferencialmente o território ventromedial - contínuo à zona subependimária - do AcbSh. Legenda: ac: comissura anterior; LV: ventrículo lateral. Barra de escala: 500µm.

4.6 Aposições entre terminais ir-MCH e neurônios ir-GABA e ir-ChAT, no AcbSh

A inervação ir-MCH do AcbSh é caracterizada não somente pela existência de fibras de passagem – provindas sobremaneira do feixe prosencefálico medial, que atravessa a LHA e interliga, por exemplo, a área tegmental ventral e o Acb -, mas também pela presença de brotamentos de botões sinápticos, condição *sine qua non* para a ocorrência da comunicação intercelular modulatória atribuída ao MCH.

Observou-se frequentemente a existência de longas fibras ir-MCH dispostas no AcbSh, detentoras de um grande número de botões sinápticos, presentes inclusive nas extremidades de seus brotamentos colaterais (figura 10).

Os indícios de uma comunicação celular, trazidos pela visualização dos brotamentos colaterais de botões sinápticos, foram corroborados por duplas reações de imuno-histoquímica, que permitiram a identificação de aposições entre terminais ir-MCH e neurônios caracterizados pela ir-GABA e ir-ChAT, no interior do AcbSh.

Os corpos neuronais trazem adequados preenchimento e contorno citoplasmáticos e dimensões de acordo com o que sua identidade neuroquímica prediz: os interneurônios ir-ChAT exibem um corpo maior quando comparado ao neurônio ir-GABA, e de fato são apontados como as maiores células de todo o estriado.

Os terminais ir-MCH circundam completamente os referidos neurônios em aposição, emitindo botões sinápticos ao longo de todo processo de envolvimento pelo brotamento colateral. Além disso, sua visualização ocorre por um contraste adequado entre a fibra e o neurônio imunorreativo. Tais características sugerem fortemente que as aposições observadas resultem em um provável contato sináptico entre fibras ir-MCH e neurônios, ir-GABA e ir-ChAT, no AcbSh (figura 11).

Figura 10. Descrição de fibras e/ou terminais ir-MCH no AcbSh. Fotomicrografia de encéfalo de rato em seções frontais, submetido à reação de imunoperoxidase anti-MCH, visualizado em microscopia óptica de campo claro. Em A, observa-se o aspecto da disposição anatômica da fibra ir-MCH no AcbSh, com destaque para dois pontos de brotamento de botões sinápticos. Em B, detalhamento da região apontada pela seta. Em C, detalhamento da região apontada pela cabeça de seta. LV: ventrículo lateral. Barra de escala - A: 50 μ m; B e C: 10 μ m.

Figura 11. Aposições entre terminais ir-MCH no AcbSh. Fotomicrografias de encéfalos de ratos, visualizados em campo claro e submetidos a duplas reações de imunoperoxidase: anti-MCH e anti-ChAT (A) e anti-MCH e anti-GABA (B). O aspecto de envolvimento dos corpos neuronais pelos terminais ir-MCH sugere fortemente a ocorrência de sinapses entre os referidos sistemas no AcbSh. Barra de escala: 10 μ m.

5 DISCUSSÃO

5.1 A compartimentalização neuroquímica do Acb

Nosso estudo citoarquitetônico inicial do Acb, por meio do método de coloração de Nissl, constatou e corrobora a proposta de Jongen-Rêlo et al. (1993) que conceitua o Acb num padrão multicompartimentalizado. Em concordância, observamos que o Acb não apresenta um tipo específico de compartimento - seja matriz ou estriossoma - e sim que o Acb seja constituído a partir de uma organização aleatória desses dois elementos, onde dificilmente possa ser estabelecida alguma predominância entre eles; tal padrão é ainda mais diversificado na parte medial do AcbSh.

A multicompartimentalização do Acb reflete uma organização não somente em seu aspecto estrutural, mas em padrões típicos de distribuição da imunorreatividade a diversos neurotransmissores e neuromoduladores, que passam a se concentrar em territórios específicos, principalmente do AcbSh (Voorn et al., 1989).

Os dados apresentados em relação ao padrão de inervação de fibras ir-MCH/NEI revelam uma heterogeneidade em sua distribuição ao longo das subregiões do Acb, confirmando e suplementando os dados de Bittencourt et al. (1992). Suplementam tais informações a partir da descrição da maior densidade de fibras e terminais ir-MCH/NEI na parte medial do AcbSh, cuja tendência é diminuir à medida que se observam as partes ventral e lateral do AcbSh e o AcbC. Ainda, apontamos um território específico da parte medial do AcbSh – ventromedial ao ventrículo lateral e contínuo à zona subependimária, no pólo septal – como local da mais alta densidade de inervação ir-MCH/NEI do Acb.

Todtenkopf e Stellar (2000), baseados na distribuição da ir-dopamina (DA), propuseram uma divisão adicional do AcbSh em cinco territórios distintos, dos quais três se referem à sua parte medial. Nesta nova divisão, parte de um de seus componentes se sobrepõe ao referido território de maior densidade de inervação ir-MCH/NEI; por sua vez, Jongen-Rêlo et al. (1993) apresentam a ir-encefalina (ENK) como argumento que corrobore a proposta de uma multicompartimentalização do AcbSh. Em seus resultados, uma região de intensa ir-ENK é apontada como o mesmo território ventromedial ao LV, contínuo à zona subependimária, no pólo septal.

Assim, Voorn et al. (1989), Jongen-Rêlo et al. (1993), Todtenkopf e Stellar (2000) usaram a distribuição imuno-histoquímica da ENK, DA, Substância P, Calbindina, para identificar que o AcbSh era constituído de uma interposição aleatória dos *patches* e *matrix*, diferentemente dos outros componentes do estriado, onde um ou outro tipo é predominante. Esse padrão apresentado pelo AcbSh parece ser o responsável pela distribuição imunorreativa desses neuropeptídeos em “ilhas”, o que lhe é clássico. Nossos dados referentes à distribuição de fibras ir-MCH/NEI tornam-se argumentos adicionais da ocorrência de “ilhas” de imunorreatividade a diversos neuropeptídeos, principalmente no AcbSh.

5.2 A alça Hipotálamo-Acb

A hodologia do Acb é outro fator que corrobora a sua heterogeneidade (Groenewegen et al., 1999; Voorn et al., 2004). Heimer et al. (1991) e Brog et al. (1993)

examinaram, respectivamente, as projeções e as aferências do Acb no rato e observaram uma notória exclusividade de comunicação entre o AcbSh e o hipotálamo.

Tal informação já era conhecida desde estudos de investigação hodológica, como o realizado por Powel e Leman (1976) que descreveram as eferências e aferências do Acb por meio de métodos autoradiográficos e de impregnação pela prata, respectivamente. Os estudos atuais, com injeções de traçador por meio de iontoforese, com menor risco de contaminação de territórios adjacentes, vieram então a confirmar, ou mesmo pormenorizar os achados. Kampe et al. (2009), utilizando-se de traçador viral, apontaram o hipotálamo como uma das estações da via multisináptica percorrida pelo vírus, a partir de sua inoculação no AcbSh.

Utilizamos parâmetros metodológicos de iontoforese semelhantes em alguns pontos aos de Brog et al. (1993), em seu trabalho de mapeamento sistemático das aferências do Acb, a partir de injeções de FG[®]. A maior diferença se concentrou no tempo pós-cirúrgico necessário para a ocorrência da captação retrógrada; enquanto eles optaram por 3 a 4 dias, nosso estudo foi desenvolvido mediante 15 dias de tempo pós-cirúrgico. Embora a rotina de nosso laboratório seja ciente que um curto período de tempo pós-cirúrgico (por exemplo, 3 dias) satisfaça a captação retrógrada, nossa opção por um tempo prolongado foi determinante para um maior preenchimento consecutivo do citoplasma neuronal, tornando-o fluoróforo mais denso no interior celular e proporcionando assim uma melhor visualização de sua autofluorescência; ainda, sem ocorrência de sua transposição para células gliais.

Nossos resultados referentes a esta etapa do trabalho condizem com Brog et al., (1993). Corroboramos a característica de heterogeneidade hodológica do Acb, no que concerne às aferências hipotalâmicas, ao apontarmos a LHA e a PeF – principalmente

em seus níveis tuberal e mamilar – como locais de uma moderada densidade de marcação retrógrada, e exclusiva, a partir de injeções na parte medial do AcbSh, especialmente em seu pólo septal. Ainda, observamos marcações esparsas em núcleos da zona medial e periventricular do hipotálamo. E conforme esperado, nossas injeções localizadas no AcbC, consideradas um controle positivo para nosso estudo, não resultaram em marcações retrógradas no hipotálamo.

Obtivemos com isso, mais um indício que nos certificou uma correta disposição do traçador no AcbSh, assim como um parâmetro pertinente para se comparar, e atestar, uma adequada captação pelas células aferentes.

Em outra etapa da investigação que envolveu as aferências do Acb, utilizamos o CTb. Sua discussão é apresenada em outra seção dessa dissertação, mas torna-se cabível o apontamento de sua captação retrógrada. Embora não haja na literatura um mapeamento sistemático das aferências do Acb a partir de injeções de CTb, consideram-se suas ações retrógradas semelhantes (Bittencourt e Elias, 2007) . E de fato, as regiões imunorreativas ao CTb estão em conformidade com as apresentadas pelo FG[®], apresentando do mesmo modo uma moderada marcação em regiões hipotalâmicas, de modo especial em sua zona lateral.

As aferências hipotalâmicas que encontramos para o AcbSh foram ainda submetidas a um controle anterógrado. Realizamos injeções do traçador anterógrado BDA na LHA, pelo maior contingente de neurônios retrogradamente marcados e pelas proposições funcionais estabelecidas na literatura.

Uma dificuldade que permeia as investigações acerca das eferências da LHA é a presença do feixe prosencefálico medial, em torno do qual se dispõem neurônios com

suas projeções altamente ramificadas, bi (ou multi) direcionais (Swanson, 1987; Simerly, 2004); injeções nessa região, ainda que restritas, apresentam um alto risco de marcações falso-positivas em decorrência da lesão de fibras desse feixe no momento de injeção do traçador.

Não observamos contaminações ao longo do trajeto de descida da micropipeta e fomos cautelosos quanto à confecção de seu diâmetro interno, adequando-o para minimizar a ocorrência de lesão, sem prejuízo de injeção do traçador. Os casos que culminaram em investigação das projeções contaram com exemplos obtidos a partir de diferentes territórios da LHA e de um caso para a PeF, e notamos que as maiores densidades de inervação observadas no território ventromedial ao ventrículo lateral partiram de injeções localizadas nos territórios mais mediais da LHA, e especialmente a partir de um caso obtido justalateralmente à PeF.

Nossos dados de controle anterógrado, além de validar os resultados de marcação retrógrada, permitem incorrer também na existência de uma comunicação recíproca entre a parte medial do AcbSh e a LHA/PeF, quando comparados aos apresentados por Heimer et al. (1991). Permitem também a distinção entre as subregiões AcbSh e AcbC, resguardadas na parte caudal do Acb.

Assim, há uma grande contribuição para a compreensão da circuitaria entre o AcbSh e a LHA, sobre a qual foram levantadas hipóteses acerca da relação entre diversas substâncias neuroativas (Stratford, 2005; Kelley et al., 2005), principalmente no desenvolvimento de comportamentos de aquisição de alimento ou de estímulos hedônicos .

5.3 O MCH na alça Hipotálamo-Acb

A LHA e PeF são regiões classicamente definidas como locais de síntese de peptídeos que atuam no controle da ingestão alimentar e no balanço energético (Schwartz, 2000; Morton et al., 2006; Coll et al., 2007), dentre os quais destacamos o MCH. A grande quantidade de células ir-MCH na LHA permitiu aos autores (Bittencourt et al., 1992), logo após sua descoberta, considerarem esse neuropeptídeo como um marcador da LHA (Bittencourt et al., 1992); por este aspecto, é muito provável que as células dessa região que apresentem imunorreatividade a alguma substância neuroativa apresentem também uma colocalização com o MCH. Partindo dessa mesma visão, alguns trabalhos especulam e antecipam que o sistema MCH-érgico que inerva o AcbSh é oriundo da LHA (Saper et al., 2002), deixando de destacar outras regiões importantes, como a IHy, entre os possíveis locais de aferência ir-MCH para o AcbSh.

Nossos resultados são originais e pioneiros em detalhar as regiões hipotalâmicas responsáveis pelas aferências ir-MCH do Acb. A partir de então, pode-se apontar com propriedades metodológicas anatômicas/neuroquímicas os locais que compõem a circuitaria Hipotálamo-Acb responsável pelo delineamento, por exemplo, de resultados funcionais amplamente estudados, como realizados pelos grupos de Denis Richard, Ralph DiLeone e Olivier Civelli, citados anteriormente.

Comumente encontram-se descrições que restringem a origem da inervação ir-MCH para o neuroeixo à LHA, ou ainda à IHy (Saper et al., 2002; Roy et al., 2006; Shung et al., 2009), ainda que Bittencourt et al. (1992) tenha apontando regiões das

zonas medial e periventricular como locais de expressão do gene que sintetiza o MCH; obviamente, por questões práticas, mencionam-se os locais de maiores densidades de expressão de seus genes. E nesse sentido nosso trabalho traz outras contribuições relevantes, que direcionam o olhar da comunidade científica para regiões como o PVH, a I, o PH, o núcleo subincertal e o núcleo entopeduncular, além das regiões clássicas, como a IHy e a LHA. Algumas hipóteses a cerca de um possível papel funcional referendado a tais regiões serão levantadas em sessão a seguir.

Fortes indícios obtidos pela realização isolada de cada etapa imuno-histoquímica preconizavam a existência de um alto grau de colocalização entre a captação do traçador e a ir-MCH; mas surpreendentemente tal quadro não foi observado: a relação entre neurônios duplamente marcados e marcados unicamente pela captação retrógrada revelou-se em níveis “baixos a medianos”.

Por um lado, atentando-se ao aspecto de distribuição granular do FG[®] no interior de neurônios ir-MCH, diferentemente do que ocorre com o preenchimento citoplasmático em outros locais, a baixa relação obtida pode ser resultado de uma possível interferência do FG[®] na revelação de neurônios duplamente marcados, ou ainda na expressão neuropeptidérgica pelas células que o captaram. Estudos adicionais de comparação de duplas marcações, delineados inclusive em outras regiões do neuroeixo, devem ser conduzidos para melhor posicionamento diante tal dificuldade.

Outros estudos envolvendo duplas marcações citoplasmáticas utilizaram a colchicina e apresentaram valores distintos dos nossos para a quantificação das células duplamente marcadas (Lima, 2005; Kampe et al., 2009). Um dos fatores que podem ter exercido influência foi o próprio emprego da colchicina, cuja ação impede o transporte axoplasmático de qualquer substância no interior dos neurônios, e assim, concentrando

os neuropeptídeos no corpo celular, permite uma marcação com maior intensidade (Bittencourt e Elias, 2007). Por outro lado, Lima et al. (2005) usaram como traçador retrógrado o *True Blue*, implantado no hipocampo sob a forma de cristais, e por isso, necessário o uso de micropipetas com diâmetro interno em uma ordem 10X maior que o utilizado neste trabalho. Já Kampe et al. (2009), utilizaram traçador viral da pseudo-raiva, injetados também por micropipetas de vidro, com diâmetro interno entre 30-50 µm. Assim, os resultados obtidos com a quantificação de duplas marcações dificilmente podem ser comparados, haja vista fatores como diferentes traçadores retrógrados utilizados, e o núcleo em questão, no caso de Lima et al. (2005).

Por outro lado, podemos compreender que a baixa relação entre neurônios duplamente marcados e que captaram unicamente o traçador pode estar relacionada a um alto grau de colaterização de seus axônios, de maneira que neurônios isolados apresentem muitas e consecutivas projeções colaterais a partir de seu axônio principal, capazes de inervar consideravelmente territórios do AcbSh. Exemplos da alta colaterização dos axônios ir-MCH foram apontados por Bittencourt e Elias (1998) e Elias et al. (2008), no qual um mesmo neurônio ir-MCH/NEI inerva simultaneamente territórios prosencefálicos e do tronco cerebral.

Em nosso outro método de dupla marcação, investigamos as aposições que envolviam fibras e/ou terminais ir-MCH e células com identidades neuroquímicas caracterizadas para o Acb, como GABA e ChAT.

Para ambas as reações nossos dados detém sua originalidade, e corroboram com bases anatômicas, sob microscopia óptica, a probabilidade da existência de sinapses que envolvam esses sistemas, amplamente requeridos em aspectos específicos do comportamento alimentar, conforme sugerido primeiramente por Stratford e Kelley

(1997). Logicamente, a real comprovação da ocorrência da sinapse deve contar com metodologia de microscopia eletrônica de transmissão.

Nesta etapa pudemos confrontar alguns “dogmas” metodológicos que cercam as duplas imunoperoxidasas, como a realização inicial da reação que envolva o níquel – destinada à visualização da fibra -. De modo especial na investigação da ir-MCH/ir-ChAT, a reação final que envolvia a marcação do ChAT não se revelava de modo satisfatório. Sendo assim, e pela característica de potente marcação do anticorpo anti-MCH, optamos por realizar a reação que envolveu o níquel após a primeira reação.

Essa alteração, surpreendentemente, proporcionou a visualização adequada das duas marcações, sob um contraste que permitiu a identificação das aposições. Assim, pudemos acrescentar que, a alternância de ordem da reação na metodologia de dupla marcação pode se comportar como uma maneira de contornar eventuais ausências de marcação, pelo menos quando envolver o anticorpo anti-MCH.

5.4 Considerações funcionais

5.4.1 MCH e Acb: hedonismo e aquisição

Observamos que maior a densidade de inervação ir-MCH ocorre na parte medial do AcbSh. Haja vista que o papel funcional do MCH na organização do comportamento alimentar se relaciona à ingestão aguda de alimento, apresenta-se cabível presumir que manipulações farmacológicas desta região, que deflagrem atos motores próprios ao

comportamento de ingestão alimentar, influenciem, ou sejam mediadas, pelo sistema MCH.

O NEI, neuropeptídeo originado a partir do pré-pró-MCH, apresenta uma taxa de 96% de co-localização com o MCH. Do mesmo modo, apresenta uma forte correspondência entre o padrão de distribuição da inervação ir-MCH; conforme esperado, demonstramos que no Acb, o NEI também exibe um padrão de distribuição semelhante ao adotado pelo MCH, pois Bittencourt et al. (1992) já as descreveram sob esse aspecto para todo o neuroeixo. Mas informações funcionais a respeito do NEI ainda são poucas, o que dificulta alguma tentativa da discussão de sua participação no campo morfofuncional.

Georgescu et al. (2005) observaram que a administração de MCH detinha maior resposta orexígena quando realizada na parte medial do AcbSh, em comparação com o AcbC. E de fato, nossos apontamentos estruturais, ao definir a parte medial do AcbSh como local de maior densidade de inervação ir-MCH, fundamentam esse quadro funcional.

Os trabalhos do grupo de Kelley, desde 1995, observaram que a administração do agonista GABA-érgico muscimol, ou do antagonista glutamatérgico tipo AMPA DNQX, especificamente no AcbSh, deflagrava um quadro de hiperfagia em ratos. O envolvimento desses dois neurotransmissores na regulação da ingestão alimentar, especificamente nos circuitos que bloqueiam as aferências excitatórias ou que facilitam as aferências inibitórias para os neurônios de projeção do AcbSh, pode sofrer influência da transmissão do MCH, mediada por uma modulação inibitória pós-sináptica da sinalização, principalmente por meio de receptores glutamatérgicos (Gao e van den Pol, 2001).

Devido a inibição dos neurônios de projeção GABA-érgicos do AcbSh desencadear a iniciação da ingestão alimentar (Stratford e Kelley, 1997), e à intermediação da transmissão MCH-érgica na modulação dessa inibição (Sears et al., 2010), muito provavelmente seja essa a maneira com a qual o MCH caracterize o início da ingestão alimentar pelo Acb.

Nossos resultados obtidos por meio de duplas marcações por imunoperoxidase revelaram uma aposição entre terminais ir-MCH e neurônios ir-GABA, o que se traduz como a demonstração estrutural de um forte indício da ocorrência de uma comunicação entre os referidos sistemas, que fundamentaria o papel de modulação inibitória pelo MCH, responsável pela deflagração do comportamento ingestivo. Ainda neste campo, Georgescu et al. (2005), por meio de uma análise bioquímica, revelaram que a sinalização do MCH, especificamente no AcbSh, bloqueia a fosforilação de receptores glutamatérgicos tipo AMPA, subunidade GluR1 – provavelmente localizados nos neurônios de projeção GABA-érgicos -, e é induzida pela dopamina.

Devido à contribuição dos sistemas dopaminérgico e opioidérgico para a caracterização de um aspecto motivacional e hedônico que influencie a busca de alimento, paralelo à influência GABA-érgica, (Wise, 2005, Kelley et al., 2005) a alta densidade de ir-DA e ir-ENK observada no mesmo território da também mais alta densidade de ir-MCH, no Acb, permite comparar uma possível sobreposição territorial entre os resultados apresentados por tais estudos e supor a existência de uma provável aposição entre tais sistemas, que ateste os dados funcionais obtidos para o reforço positivo do comportamento alimentar.

O MCH apresenta outras facetas funcionais que extrapolam ações características do comportamento alimentar, pelo menos diretamente. Um exemplo é observado pela

influência de antagonistas MCH1R; Saito et al. (2001) relatam o Acb como local de relevante expressão do MCH1R, e em conformidade, Georgescu et al. (2005) observaram que a administração de antagonistas do MCH1R, especificamente no AcbSh, resulta na deflagração de comportamentos semelhantes a ações antidepressivas. Já a inativação genética do MCH1R imprime em camundongos ações comportamentais semelhantes a efeitos ansiolíticos, que refletem em uma menor concentração de 5-HT liberada no córtex pré-frontal medial - uma região do sistema límbico altamente associada à emoção e à cognição - mesmo quando os animais são submetidos a paradigmas estressores (Roy et al., 2006).

A característica multifuncional do MCH pode ser compreendida, por um lado, pela ativação de diferentes tipos de proteínas-G, G_i , G_o e G_q , acopladas aos receptores de MCH (no caso de roedores, descreve-se apenas o MCH1R), cuja alta densidade observada no Acb reflete na ocorrência de uma diversidade provavelmente maior de tipos de proteínas-G, e que assim contemplem os distintos comportamentos observados pelo MCH, relacionados ao Acb, ou em circuitos por ele diretamente influenciados.

O Acb é intimamente relacionado a quadros de adição de drogas, com substancial envolvimento do sistema dopaminérgico mesolímbico (Wise, 2005). Diante dessa característica, tornou-se presumível que a relação exclusiva do AcbSh com a LHA, e de modo especial o MCH, pudessem estar envolvidos em alguma parte com a questão aditiva. E de fato pode ser uma nova função para o MCH, que respondesse na modulação do valor de recompensa atribuído às drogas, no caso, a cocaína (Chung et al., 2009). Neste trabalho, o grupo de Olivier Civelli observou que o MCH potencializava o sistema dopaminérgico confluyente nessa região, facilitando a hiperatividade do sistema locomotor induzida pela aquisição da cocaína. Também,

demonstraram por dupla marcação por hibridização *in situ* a colocalização do MCH1R com receptores dopaminérgicos tipo D1 e D2.

Sabe-se que para a instalação de um quadro caracterizado como vicioso também é necessária a participação do sistema opioide, hábil para incutir a característica reforçadora própria de cada estímulo, relacionada ao quão “agradável” possa representar ao organismo. A encefalina e a dinorfina são exemplos de neuropeptídeos opiáceos endógenos e caracterizam duas subpopulações neuronais do Acb, de distintos alvos de projeção (Gerfen et al., 1990). Em ambas, uma observação realizada a partir de duplas marcações por hibridização *in situ* demonstrou sua colocalização com MCH1R (Georgescu et al., 2005), onde muito provavelmente possam ser encontrados terminais ir-MCH, mas que devem ser investigadas ou por métodos de hibridização *in situ*, ou por duplas peroxidases em animais tratados previamente com colchicina..

Uma terceira faceta aborda o sistema colinérgico como facilitador da atribuição hedônica, agora do estímulo palatável, sendo o bloqueio de receptores colinérgicos um fator que reduz sobremaneira a ingestão de alimento gorduroso (Kelley et al., 2005). Corroborando a relação do MCH com sistemas diretamente relacionados à recompensa, nossos resultados obtidos por meio de dupla marcação por imunoperoxidase revelam aposições entre terminais ir-MCH e interneurônios ir-ChAT, o que sugere fortemente a existência de sinapses entre os elementos desses sistemas, fundamentando estruturalmente uma modulação agora indireta do MCH, agindo no “tônus” colinérgico facilitador da atribuição da qualidade hedônica ao estímulo.

Assim, pode-se suspeitar que a sinalização do sistema MCH, no Acb, também pode exercer uma modulação nos sistemas de recompensa, que extrapole a questão única do comportamento alimentar.

5.4.2 Circuitaria Hipotálamo-Acb no comportamento alimentar

Retomando o campo do comportamento alimentar, Thomas Stratford (2005), com metodologia semelhante à utilizada em seu trabalho conjunto com Kelley em 1997, observou um pronunciado comportamento ingestivo em ratos após a administração de muscimol na parte medial do AcbSh, e investigou as regiões encefálicas que apresentavam imunorreatividade à proteína *Fos*, um marcador de atividade neuronal. Seus resultados indicaram marcações imunopositivas em núcleos das zonas medial e lateral do hipotálamo, e nesta, a LHA e a PeF. Com isso, propôs-se a existência de uma pequena circuitaria que envolvesse o AcbSh e a zona lateral do hipotálamo, especificamente a LHA, na regulação do comportamento alimentar.

Kelley et al. (2005) apresentaram uma hipótese que, para o comportamento ingestivo, a sinalização eferente do Acb não ocorria diretamente em neurônios da LHA; a hiperfagia induzida pela administração de muscimol no AcbSh era abolida com o uso de antagonistas glutamatérgicos administrados na LHA, sugerindo a ocorrência de uma sinapse glutamatérgica interposta entre neurônios de projeção do AcbSh e neurônios relacionados à ingestão alimentar na LHA.

Tal suposição foi comprovada por Sano e Yokoi (2007), por meio de manipulações genéticas que marcavam com moléculas fluorescentes as projeções dos neurônios principais do *estriado*, combinadas a técnicas de hibridização *in situ* e imunofluorescência. Demonstraram que suas projeções observadas na LHA terminavam em um território onde supostamente estabeleciam sinapses com neurônios

glutamatérgicos, marcados pelo RNA-complementar para *VGLUT*, que por sua vez se projetavam para neurônios ir-MCH.

5.4.3 Zonas hipotalâmicas e respectivas funções

As divisões funcionais do hipotálamo em zonas periventricular, medial e lateral são propostas por seus diferentes papéis nas respostas autonômicas elaboradas pelo organismo (Swanson, 1987; Swanson, 2000; Simerly, 2004) e podem auxiliar na especulação de funções específicas para as células duplamente marcadas encontradas em determinadas regiões.

A zona periventricular é relacionada ao controle neuroendócrino, tendo em vista que a maioria de seus neurônios se constitui como a via efetora final que se projeta para a hipófise, como controladores da síntese ou secreção de seus hormônios. A POMC, além do núcleo arqueado (Schwartz et al., 2000; Cowley et al., 2001; Berthoud, 2004; Coll et al., 2007), também é expressa nas partes anterior e intermédia da hipófise (Khachaturian et al., 1985). Um derivado de seu metabolismo é a β -endorfina, considerada um terceiro elemento da família dos opióides, conjuntamente à encefalina e dinorfina. Assim, uma provável compreensão do significado da célula duplamente marcada no núcleo periventricular, representante da zona periventricular, seria um controle ou alguma relação com a síntese desse elemento, pertencente ao grande grupo opioidérgico que se relaciona fortemente com o Acb.

A zona medial é funcionalmente descrita como local de iniciação de comportamentos motivados específicos, como a questão primária de ingestão de

alimento. Estabelece conexões com as partes límbicas do telencéfalo, com o diencéfalo e com o tronco encefálico, mediadores da integração somatomotora necessária para a elaboração de comportamentos motivados adequados às necessidades impostas em questão (Simerly, 2004). Dentre seus constituintes, observou-se a ocorrência de duplas marcações na área internuclear, na área incerto-hipotalâmica e no hipotálamo posterior, locais que podem estabelecer conexões bidirecionais com o AcbSh e áreas motoras do telencéfalo ou do tronco encefálico, iniciadoras de comportamentos de busca do estímulo aditivo, ou do alimento como questão ingestiva primária.

A zona lateral deve ser examinada com cautela, a título funcional. É uma região que comporta seus neurônios sob uma maneira esparsa, distribuídos ao redor do feixe prosencefálico medial, e por isso, qualquer manipulação dessa região pode influenciar, na verdade, a informação que transita através dessas fibras (Swanson, 1987; Simerly, 2004). Seus neurônios exibem um campo de projeção marcadamente amplo e difuso, podendo alcançar todo o neuroeixo (Swanson, 1987), como é o caso das projeções do MCH (Bittencourt et al., 1992). Com isso, essa região é envolvida na associação de informações sensoriais e na manutenção de um estado de alerta do organismo, regulando também comportamentos motivados associados especificamente com a modulação do equilíbrio hídrico e energético, de reprodução e de defesa (Simerly, 2004).

A área hipotalâmica lateral é o principal componente dessa região, e suas células duplamente marcadas podem estar envolvidas com a modulação do estado de alerta necessário em situações que necessitem de uma maior sensibilização para o reconhecimento de pistas associadas aos estímulos aditivos, seja o alimento palatável ou mesmo a cocaína. Também podem estar envolvidas com a questão primária da ingestão

de alimento, modulando a expressão de ações motoras atribuídas à necessidade consecutiva de ingestão do alimento, como estímulo não-condicionado, relacionada ao AcbSh.

A área perifornical, disposta entre as zonas medial e lateral, contém células duplamente marcadas que podem compartilhar o papel funcional exibido por ambas as regiões.

Finalmente, os nossos achados corroboram achados anteriores e adicionam dados novos a respeito da circuitaria entre territórios hipotalâmicos e o Acb, estabelecendo dessa maneira, o substrato anatômico para as inferências funcionais sobre o controle do comportamento motivado de ingestão de alimentos e/ou do comportamento de adição à drogas

6 CONCLUSÕES

- 1 – As aferências ir-MCH do Acb se localizam na área hipotalâmica lateral, na área perifornical, na área incerto-hipotalâmica, na área internuclear, no hipotálamo posterior, no núcleo periventricular, no núcleo subincertal e no núcleo entopeduncular;
- 2 – As aposições observadas entre fibras ir-MCH e neurônios ir-GABA e ir-ChAT sugerem a ocorrência de sinapses entre esses dois sistemas, no AcbSh.

REFERÊNCIAS⁴

- Abbott CR, Kennedy AR, Wren AM, Rossi M, Murphy KG, Seal LJ, Todd JF, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR. Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of Melanin-Concentrating Hormone. *Endocrinology*. 2003;144(9):3943-49.
- Baker BI, Ball JN. Evidence for a dual pituitary control of teleost melanophores. *Gen Comp Endocrinol*. 1975;25(2):147-52.
- Baker BI, Rance TA. Further observations on the distribution and properties of teleost melanin concentrating hormone. *Gen Comp Endocrinol*. 1983;50(3):423-31.
- Baldo BA, Sadeghian K, Basso AM, Kelley AE. Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. *Behav Brain Res*. 2002;137:165-77.
- Berendse HW, Galis-de Graaf Y, Groenewegen HJ. Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J Comp Neurol*. 1992;316(3):314-47.
- Berthoud HR. Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol Behav*. 2004;81:781-93.
- Berthoud HR, Mogenson GJ. Ingestive behaviour after intracerebral and intracerebroventricular infusions of glucose and 2-deoxy-D-glucose. *Am J Physiol*. 1977;233:R127-R133.
- 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;319:218-45.
- 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, Elias CF. *Métodos em Neurociência*. São Paulo: Roca; 2007.
- 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.

⁴De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniforms requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the “accumbens” part of the rat ventral striatum: Immunohistochemical detection of retrogradely transported Fluoro-Gold. *J Comp Neurol.* 1993;338:255-78.

Chen Y, Hu C, Hsu CK, Zhang Q, Bi C, Asnicar M, Hsiung HM, Fox N, Sliker LJ, Yang DD, Heiman ML, Shi Y. Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology.* 2002;143(7):2469-77.

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.

Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. The hormonal control of food intake. *Cell.* 2007;129:251-62.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 2001;411:480-84.

Dallvechia-Adams S, Smith Y, Kuhar MJ. CART peptide-immunoreactive projection from the nucleus accumbens targets substantia nigra pars reticulata neurons in the rat. *J Comp Neurol.* 2001;434:29-39.

Dallvechia-Adams S, Kuhar MJ, Smith Y. Cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide projections in the ventral midbrain: colocalization with γ -aminobutyric acid, melanin-concentrating hormone, dynorphin, and synaptic interactions with dopamine neurons. *J Comp Neurol.* 2002;448:360-372.

de Olmos JS, Heimer L. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;877: 1-32.

DeLong M, Wichmann T. Update on models of basal ganglia function and dysfunction. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15(3):S237-40.

DeLong MR. Os núcleos da base. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, editors. *Princípios da neurociência.* 4th ed. Barueri: Manole; 2003. p. 853-867.

Dodd GT, Williams SR, Luckman. Functional magnetic resonance imaging and c-fos mapping in rats following a glucoprivic dose of 2-deoxy-D-glucose. *J Neurochem.* 2010;113(5):1123-32.

Durieux PF, Bearzatto B, Guiducci S, Buch T, Waisman A, Zoli M, Schiffmann SN, de Kerchove d'Exaerde A. D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. *Nat Neurosci.* 2009;12(4):393-5.

Eder U, Mangweth B, Ebenbichler C, Weiss E, Hofer A, Hummel M, Kemmler G, Lechleitner M, Fleischhacker WW. Association of olanzapine-induced weight gain with an increase in body fat. *Am J Psych.* 2001;158:1719-22.

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. *J Comp Neurol.* 1998;402(4):442-59.

Elias CF, Lee CE, Kelly JF, Ahima RS, Kuhar M, Saper CB, Elmquist JK. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol.* 2001;432(1): 1-19.

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.

Elliott JC, Harrold JA, Brodin P, Enquist K, Backman A, Bystrom M, Lindgren K, King P, Williams G. Increases in melanin-concentrating hormone and MCH-receptor levels in the hypothalamus of dietary-obese rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004;128:150-9.

Farrar AM, Segovia KN, Randall PA, Nunes EJ, Collins LE, Stopper CM, Port RG, Hockemeyer J, Müller 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.

Gao XB, van den Pol AN. Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *J Physiol.* 2001;533:237-52.

Georgescu D, Sears RM, Hommel JD, Barrot M, Bolaños CA, Marsh DJ, Bednarek MA, Bibb JA, Maratos-Flier E, Nestler EJ, DiLeone RJ. The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone acts in the nucleus accumbens to modulate feeding behavior and forced-swim performance. *J Neurosci.* 2005;25(11):2933-40.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.* 1990;250(4986):1429-32.

Gerfen CR. Basal ganglia. In: Paxinos G (editor). *The Rat Nervous System*. 3rd ed. Elsevier Academic Press. 2004; p. 455-478.

Gomori A, Ishihara A, Ito M, Mashiko S, Matsushita H, Yumoto M, Ito M, Tanaka T, Tokita S, Moriya M, Iwaasa H, Kanatani A. Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284:583-8.

Groenewegen, HJ, Wright, CI, Beijer, AVJ, Voorn, P. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann New York Acad Sci.* 1999;877:49-63.

Guesdon B, Paradis E, Samson P, Richard D. Effects of intracerebroventricular and intra-accumbens melanin-concentrating hormone agonism on food intake and energy expenditure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(3):R469-75.

Guesdon B, Denis RG, Richard D. Additive effects of olanzapine and melanin-concentrating hormone agonism on energy balance. *Behav Brain Res*. 2010;207(1):14-20.

Haber Sn, Wolfe DP, Groenewegen HJ. The relationship between ventral striatal efferent fibers and the distribution of peptide-positive wooly fibers in the forebrain of the rhesus monkey. *Neuroscience*. 1990;39:323-338.

Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*. 1991;41:89-125.

Huang M, Li Z, Ichikawa J, Dai J, Meltzer HY. Effects of divalproex and atypical antipsychotic drugs on dopamine and acetylcholine efflux in rat hippocampus and prefrontal cortex. *Brain Res*. 2006;1099(1):44-55.

Jean A, Conductier G, Manrique C, Bouras C, Berta P, Hen R, Charnay Y, Bockaert J, Compan V. Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT₄ receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(41):16335-40.

Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci*. 2010;13(5):635-41.

Jongen-Rêlo NA, Groenewegen HJ, Voorn P. Evidence for a multi-compartmental histochemical organization of the nucleus accumbens in the rat. *J Comp Neurol*. 1993;337:267-76.

Kampe J, Tschöp MH, Hollis JH, Oldfield BJ. An anatomic basis for the communication of hypothalamic, cortical and mesolimbic circuitry in the regulation of energy balance. *Eur J Neurosci*. 2009;30(3):415-30.

Katsuura Y, Taha SA. Modulation of feeding and locomotion through mu and delta opioid receptor signaling in the nucleus accumbens. *Neuropeptides*. 2010;44(3):225-32.

Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker BI. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*. 1983;305:321-3.

Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav*. 2005;86:773-95.

Khachaturian H, Lewis ME, Tsou K, Watson S. β -endorphin, α -MSH, ACTH and related peptides. In: Björklund A, Hökfelt T, editors. *Handbook of Chemical Neuroanatomy: Elsevier Science Publishers BV*; 1985. v.4: GABA and neuropeptides in CNS, part 1. Cap 5; p. 216-272.

- Kokkotou EG, Tritos NA, Mastaitis JW, Sliker L, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain. *Endocrinology*. 2001;142(2):680-6.
- Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Kuhar MJ. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol*. 1998;391:115-32.
- Le Moine C, Bloch B. Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience*. 1996;73(1):131-43.
- Lima FFB. Estudo da origem das aferências do hipocampo do rato imunorreativas ao hormônio concentrador de melanina [dissertação]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2005.
- Ligorio M, Descarries L, Warren RA. Cholinergic innervation and thalamic input in rat nucleus accumbens. *J Chem Neuroanat*. 2009;37(1):33-45.
- Maldonado-Irizarry CS, Kelley AE. Differential behavioral effects following microinjection of an NMDA antagonist into nucleus accumbens subregions. *Psychopharmacology*. 1994;116:65-72.
- Mark GP, Rada P, Pothos E, Hoebel BG. Effects of feeding and drinking on acetylcholine release in the nucleus accumbens, striatum, and hippocampus of freely behaving rats. *J Neurochem*. 1992;58(6):2269-74.
- Meredith GE, Agolia R, Arts M, Groenewegen HJ, Zahm DS. Morphological differences between the projection neurons in the core and shell of the nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*. 1992;50:149-62.
- Meredith GE, Baldo BA, Andrezjewski ME, Keley AE. The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. *Brain Struct Funct*. 2008;213:17-7.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006;443:289-95.
- Nahon JL, Presse F, Bittencourt JC, Sawchenko PE, Vale W. The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus. *Endocrinology* 1989;125(4):2056-65.
- Nahon JL. The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *C R Biol*. 2006;329(8):623-38.
- Oomura Y, Ono T, Ooyama H, Wayner MJ. Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature*. 1969;222:282-284.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. San Diego (CA): Academy Press; 1998.

Powell EW, Leman RB. Connections of the nucleus accumbens. *Brain Res.* 1976;105(3):389-403.

Pratt WE, Blackstone K, Connolly ME, Skelly MJ. Selective serotonin receptor stimulation of the medial nucleus accumbens causes differential effects on food intake and locomotion. *Behav Neurosci.* 2009;123(5):1046-57.

Prensa L, Richard S, Parent A. Chemical anatomy of the human ventral striatum and adjacent basal forebrain structures. *J Comp Neurol.* 2003;460:345-367.

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

Rance T, Baker BI. The teleost melanin-concentrating hormone -- a pituitary hormone of hypothalamic origin. *Gen Comp Endocrinol.* 1979;37(1):64-73.

Reynolds SM, Berridge KC. Fear and feeding in the nucleus accumbens shell: rostrocaudal segregation of GABA-elicited defensive behavior versus eating behavior. *J Neurosci.* 2001;21(9):3261-70.

Riedel A, Härtig W, Seeger G, Gärtner U, Brauer K, Arendt T. Principles of rat subcortical forebrain organization: a study using histological techniques and multiple fluorescence labeling. *J Chem Neuroanat.* 2002;23(2):75-104.

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.

Roy M, David NK, Danao JV, Baribault H, Tian H, Giorgetti M. Genetic inactivation of melanin-concentrating hormone receptor subtype 1 (MCHR1) in mice exerts anxiolytic-like behavioral effects. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31(1):112-20.

Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SH, Leslie F, Civelli O. Molecular characterization of the melanin-concentrating hormone receptor. *Nature.* 1999;400:265-9.

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

Sano H, Yokoi M. Striatal medium spiny neurons terminate in a distinct region in the lateral hypothalamic area and do not directly innervate orexin/hypocretin- or melanin-concentrating hormone-containing neurons. *J Neurosci.* 2007;27(26):6948-6955.

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

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

Sears RM, Liu RJ, Narayanan NS, Sharf R, Yeckel MF, Laubach M, Aghajanian GK, DiLeone RJ. Regulation of nucleus accumbens activity by the hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone. *J Neurosci*. 2010;30(24):8263-73.

Shi Y. Beyond skin color: emerging roles of melanin-concentrating hormone in energy homeostasis and other physiological functions. *Peptides*. 2004;25:1605-11.

Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*. 1998;396:670-674.

Simerly RB. Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: Paxinos G (editor). *The rat nervous system*. 3rd ed. Elsevier;2004. cap. 14; p. 335-368.

Simpson EH, Kellendonk C, Kandel E. A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuron*. 2010;65(5):585-96.

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 DG, Davis RJ, Rorick-Kehn L, Morin M, Witkin JM, McKinzie DL, Nomikos GG, Gehlert DR. Melanin-concentrating hormone-1 receptor modulates neuroendocrine, behavioral, and corticolimbic neurochemical stress responses in mice. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(6):1135-45.

Smith KS, Berridge KC. Opioid limbic circuit for reward: interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *J Neurosci*. 2007;27(7):1594-1605.

Stratford TR, Kelley AE. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci*. 1997;17(11):4434-40.

Stratford TR, Kelley AE. Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci*. 1999;19(24):11040-8.

Stratford TR. Activation of feeding-related neural circuitry after unilateral injections of muscimol into the nucleus accumbens shell. *Brain Res*. 2005;1048(1-2):241-50.

Swanson LW. The hypothalamus. In: Björklund A, Hökfelt T, Swanson LW, editors. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier Science Publishers BV; 1987, vol 5: Integrated Systems of the CNS, part 1, cap 1; p. 1-122.

Swanson LW. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res*. 2000; 886(1-2):113-164.

- Swanson LW, Sanchez-Watts G, Watts AG. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parcelling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neurosci Lett*. 2005;387(2):80-4.
- Todtenkopf MS, Stellar JR. Assessment of tyrosine hydroxylase immunoreactive innervation in five subregions of the nucleus accumbens shell in rats treated with repeated cocaine. *Synapse*. 2000;38:261-70.
- Voorn P, Gerfen CR, Groenewegen HJ. The compartmental organization of the ventral striatum of the rat: immunohistochemical distribution of enkephalin, substance P, dopamine and calcium binding protein. *J Comp Neurol*. 1989;289:189-201.
- Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CM. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci*. 2004;27(8):468-74.
- Van Dongen YC, Deniau JM, Pennartz CMA, Galis de Graaf Y, Voorn P, Thierry AM, Groenewegen HJ. Anatomical evidence for direct connections between the shell and core subregions of the rat nucleus accumbens. *Neuroscience*. 2005;136:1049-71.
- Vaughan JM, Fischer WH, Hoeger C, Rivier J, Vale W. Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology*. 1989;125(3):1660-5.
- Wilson CJ. Basal Ganglia In: Shepard GM. The synaptic organization of the brain. 4th ed. Oxford University Press NY:2004; cap. 6; p. 363-371.
- Wise RA. Forebrain substrates of reward and motivation. *J Comp Neurol*. 2005;493:115-21.
- Wise RA. The parsing of food reward. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291(5):R1234-5.
- Yin HH, Mulcare SP, Hilário MRF, Clouse E, Holloway T, Davis MI, Hansson AC, Lovinger DM, Costa RM. Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat. Neurosci*. 2009; 12 (3):333-341.
- Záborszky L, Alheid GF, Beinfeld MC, Eiden LE, Heimer L, Palkovits M. Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience*. 1985;14(2):427-53.
- Zahm DS, Brog JS. On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*. 1992;50(4):751-67.
- Zahm DS, Heimer L. Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. *J Comp Neurol*. 1993;327(2):220-32.
- Zimmermann P, Privou C, Huston JP. Differential sensitivity of the caudal and rostral nucleus accumbens to the rewarding effects of a H1-histaminergic receptor blocker as

measured with place-preference and self-stimulation behavior. *Neuroscience*. 1999;94(1):93-103.