HELDER CRAVO DA COSTA

CARACTERIZAÇÃO DA ORIGEM DAS FIBRAS IMUNORREATIVAS AO HORMÔNIO CONCENTRADOR DE MELANINA NA LÂMINA INTERNA DA EMINÊNCIA MEDIANA E NA HIPÓFISE POSTERIOR DURANTE A LACTAÇÃO EM RATAS 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 2013

HELDER CRAVO DA COSTA

CARACTERIZAÇÃO DA ORIGEM DAS FIBRAS IMUNORREATIVAS AO HORMÔNIO CONCENTRADOR DE MELANINA NA LÂMINA INTERNA DA EMINÊNCIA MEDIANA E NA HIPÓFISE POSTERIOR DURANTE A LACTAÇÃO EM RATAS 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.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientador: Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt.

Versão original.

São Paulo 2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Costa, Helder Cravo da Costa.

Caracterização da origem das fibras imunorreativas ao hormônio concentrador de melanina na lâmina interna da eminência mediana e na hipófise posterior durante a lactação em ratas Long-Evans (*Rattus norvegicus*) / Helder Cravo da Costa Costa. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Neuroanatomia.

Versão do título para o inglês: Characterization of the origin of the melanin-concentrating hormone immunoreactive fibers in the internal layer of the median eminence and in the posterior hypophysis during the lactation period in Long-Evans rats (*Rattus novergicus*).

1. Ocitocina 2. Comportamento maternal 3. Hipófise 4. Hipotálamo 5. Fluoro-gold 6. Área pré-óptica medial I. Bittencourt, Prof. Dr. Jackson Cioni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB071/2013

	INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Candidato(a):	Helder Cravo da Costa Costa.
Título da Disserta	ição: Caracterização da origem das fibras imunorreativas ao hormônio concentrador de melanina na lâmina interna da eminência mediana e na hipófise posterior durante a lactação em ratas Long-Evans (<i>Rattus norvegicus</i>).
Orientador(a):	Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt.
A Comissão J em sessão p	ulgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, ública realizada a/////, considerou
()	Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 070 nas fls. 88 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a Jackson Cioni Bittencourt, Coordenador(a) da Linha de pesquisa Caracterização da origem e da ultraestrutura de fibras MCH-érgicas e ocitocinergicas na lâmina interna da eminência mediana durante a lactação do qual participou(aram) o(s) Helder Cravo da Costa e o pesquisador José de Anchieta de Castro e Horta Junior, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em 01.07.2010, com validade de 3 anos.

São Paulo, 01 de julho de 2010.

Prof.Dr.Wothan Tavares de Lima Coordenador CEEA - ICB/USP

atrian

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA Secretária CEEA – ICB/USP

Aos meus pais,

Darcy Cravo da Costa e Lidia Cravo da Costa que sempre me apoiam em todos os meus projetos. A minha querida Jô, que ao longo dessa jornada foi minha estrela guia em todos os aspectos,

sem ela esse trabalho não teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho tem muitos co-autores. Sei que algumas palavras não vão de fato mostrar o quanto que cada uma dessas pessoas contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho, mas gostaria de salientar que guardo comigo a prazerosa lembrança da convivência e do apoio recebido pelas tantas pessoas que fizeram deste trabalho uma realidade.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por conceder-nos a vida e a oportunidade do aprendizado constante em todas as esferas evolutivas da humanidade e por permitir a realização desse trabalho.

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

Agradeço o apoio e carinho da minha família, por entender minha ausência ao longo dos dias! Meus amados pais, Darcy e Lídia, por tudo que as palavras somente não seriam capazes de expressar.

Meu irmão Alessandro e minha cunhada Michele e minhas queridas sobrinhas Júlia e Lauren. A minha irmã Dalete e meu cunhado Felipe. Aos meus demais familiares, tias e tios, em especial a minha tia Maria Cravo de Oliveira Palácios, que me ampara no aspecto espiritual.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt, sobretudo, pela confiança depositada em mim desde o primeiro momento. Sinto-me lisonjeado por poder dizer que fui orientado pelo senhor.

A professora Luciane V. Sita, pela amizade e colaboração ao longo desses anos de trabalho, principalmente pelas sugestões extremamente úteis e pelo auxilio na captação das imagens.

Ao professor José de Anchieta pelo exemplo, dedicação, orientação e ensinamentos e acima de tudo pela amizade.

A Jô por todo amor, amizade, carinho e apoio que sem sombra de dúvida tornaram a realização desse trabalho algo possível.

A minha grande amiga Renatinha, sempre me dando bronca, mas um coração maior que todas as broncas juntas (e olha que foram muitas).

A todos os colegas/amigos do LNQ que de forma direta contribuíram como meu crescimento pessoal e profissionale na elaboração deste trabalho: Daniela Batagello, Débora Bueno, Giovanni Diniz.

Aos meus grandes amigos/irmãos Tchuga, Cris, Renato, Michelle, Mineiro, Cibelle sempre presentes, tornando prazeroso até os momentos mais difíceis.

Aos colegas da Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais que conhecem a nossa luta de cada dia.

Aos amigos que me ajudaram na técnica de Western Blotting: Aline, Daniel, Regina, Joice, Priscila, Fábio, Caroline, Ivson, Marcelo. Em especial principalmente a Camila, a Mônica Malheiros e ao Mike Yoshio,, que não tem preço o que fizeram por mim.

As professoras Dra. Marúcia Chacur, Dra. Maria Luiza Chaves, Dra. Claudimara F. P. Lotfi, que me apoiaram prontamente para a realização da técnica de Western Blotting, abrindo as portas de seus laboratórios.

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

Ao grande amigo Adilson da S. Alves pelo apoio e conselhos no uso do microscópio confocal.

Aos professores que gentilmente participaram do exame de Qualificação deste trabalho, Prof. Dr. Jairo Bauer, a Profa. Dra. Claudimara F. P. Lotfi e Profa. Dra Claudia Latronico.

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

A todos os funcionários do ICB, principalmente os da biblioteca, pela dedicação e atenção constantes.

Ao pessoal do biotério do Departamento de Anatomia, sem a ajuda de vocês esse trabalho não seria possível, muito obrigado pela atenção!

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

A Cristiane Freire pelo suporte técnico.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro e ao CNPQ.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro para o projeto temático do Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt – FABESP N° 2010/52068-0.

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

MUITO OBRIGADO

Here's a "little work" I wrote, You might want to "read it word for word". Don't worry, be happy. In every life we have some trouble, But when you worry you make it double. Don't worry, be happy. Don't worry, be happy now

(Adaptado de Bob McFerrin)

RESUMO

Costa, HC. Caracterização da origem das fibras imunorreativas ao hormônio concentrador de melanina na lâmina interna da eminência mediana e na hipófise posterior durante a lactação em ratas Long-Evans (*rattus norvegicus*). [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2013.

Introdução: Em ratos, encontramos a expressão de RNAm do prépró-hormônio concentrador de melanina (ppMCH) e o peptídeo MCH principalmente nas áreas hipotalâmica lateral e incerto hipotalâmica. Entretanto, durante a lactação novos sítios de expressão do ppMCH e de imunorreatividade ao MCH (MCH-ir) foram identificados, como a parte ventral da área préóptica medial (MPOA), ocorrendo o máximo de sua expressão no término da lactação (entre os dias 19º e 21º), e sem colocalização entre os neurônios produtores de ocitocina (OT) e de MCH no hipotálamo. Entretanto, também já foi demonstrado que o MCH induz a secreção de ocitocina na hipófise posterior (PPit) de ratos machos. Além disso, as fibras MCH-érgicas e OT-érgicas transitam pela lâmina interna da eminência mediana (MEi), mas não se conhece a origem das fibras MCH-ir e nem a sua possível relação com as fibras OT-érgicas. Objetivos: 1) descrever a origem das fibras imunorreativas ao MCH na MEi e na PPit em ratas lactantes; 2) descrever através da microscopia óptica as fibras MCH-érgicas e OT-érgicas e as relações entre elas na passagem pela MEi em direção à PPit em ratas lactantes; 3) quantificar o peptídeo ppMCH e OT na PPit em ratas lactantes. Material e Métodos: utilizamos ratas da linhagem Long-Evans, e os seguintes métodos: 1) a microscopia confocal para caracterizar as fibras MCH-ir e OT-ir que estão na MEi e na PPit; 2) a injeção de traçador neuronal retrógrado fluorescente, o Fluoro-gold® (FG) via intravascular e a combinação dos métodos de hibridização in situ e imuno-histoquímica para identificar as possíveis células duplamente marcadas (FG + RNAm ppMCH) no hipotálamo; 3) utilizamos a técnica de Western Blotting para quantificar o peptídeo ppMCH e OT na PPit. Resultados: 1) foi evidenciado, pela primeira vez, que há uma proximidade entre as fibras MCH-ir e OT-ir, 2) evidenciamos, também pela primeira vez, a colocalização de neurônios retrogradamente marcados com FG e que expressam RNAm do ppMCH na MPOA e na porção anterior do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVHa), 3) demonstramos que há um aumento do peptídeo MCH e uma diminuição da OT na PPit no 19º dia de lactação. Conclusão: os dados demonstram que o surgimento da plasticidade neuronal para expressão do ppMCH na MPOA, a proximidade das fibras MCH-ir e OT-ir na MEi e a maior quantidade de MCH e menor de OT na PPit fazem parte de um controle neuroendócrino para o término do período de lactação e o comportamento maternal.

Palavras chaves: Ocitocina. Comportamento maternal. Hipófise. Hipotálamo. Fluoro-gold. Área pré-óptica medial.

ABSTRACT

Costa, HC. Characterization of the origin of melanin-concentrating hormone immunoreactive fibers in the internal layer of the median eminence and the posterior hypophysis during the lactation period in Long-Evans rats (*Rattus norvegicus*). [dissertation (Masters thesis in Science)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Introduction: It has been described that the expression of prepro-melanin-concentrating hormone (ppMCH) mRNA and MCH peptide are mainly localized in the lateral hypothalamic and in the incerto hypothalamic areas of the rat. However, during lactation new sites of ppMCH mRNA expression and MCH immunoreactivity (MCH-ir) were identified in the ventral part of the medial preoptic area (MPOA), with its peak at the end of lactation period (between the 19th and 21st days), besides, there is not colocalization between MCH and oxytocin-producing neurons (OT) in the hypothalamus. However, it has also been demonstrated that the MCH induces secretion of oxytocin in the posterior hypophysis (PPit) in male rats. Furthermore, MCH-ir and OT—ir fibers are described by passing in the internal layer of the median eminence (MEi). However, the origin of the MCH-ir fibers and its possible relationship with the OT-ir fibers are not known. Objectives: 1) describe the origin of the MCH immunoreactive fibers in the MEi and PPit in lactating rats, 2) describe through the optical microscopy the MCH-ir and OT-ir fibers and the relationship between them in passing by MEi toward PPit in lactating rats, 3) quantify the amount of ppMCH and OT in the PPit of lactating rats. Material and Methods: we have used Long-Evans rats, and the methods were: 1) confocal microscopy to characterize the relationship between MCH-ir and OT-ir fibers that are in the MEi and PPit, 2) injection of a fluorescent retrograde neuronal tracer, Fluoro-Gold ® (FG) intravascularly to identify possible sites of double-labeled cells (FG + ppMCH mRNA) in the hypothalamus by using a combination of methods of in situ hybridization and immunohistochemistry; 3) the technique of Western blotting was used to quantify ppMCH and OT in PPit. **Results**: 1) it was demonstrated for the first time, that there is a closeness between the MCH-ir and OT-ir fibers in the MEi, 2) it was evidenced also for the first time, the colocalization of ppMCH mRNA-producing neurons and FG in the MPOA and in the anterior portion of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVHA), 3) there is an increase of ppMCH in the PPit, but a decrease of OT amount on the 19th day of lactation. **Conclusion**: the data found in this work allow us to suggest that there is a neuronal plasticity mechanism in the MPOA of the MCH-producing neurons and, the proximity of MCH-ir and OT-ir fibers in the MEi, and that at the same time an increase of MCH-ir and a decrease of OT-ir in the PPit are part of a neuroendocrinological control that would work at the final stages of lactation and maternal behavior.

Keywords: Oxytocin. Maternal behavior. Hypophysis. Hypothalamus. Fluoro-Gold. Medial preoptic area

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	-	Perfil celular do lavado vaginal	27
Figura 2	-	Controles positivos e negativos dos anticorpos primários utilizados	41
Figura 3	-	Localização de células MCH-ir e a OT-ir no PVH, IHy e LHA em ratas Long-	
		Evans em fase diestro, 5° e 19° dias de lactação	42
Figura 4	-	Localização de células e fibras MCH-ir e OT-ir na MPOA e ME em ratas	
		Long-Evans em fase de diestro, 5° e 19° dias de lactação	43
Figura 5	-	Localização de células e fibras OT-ir no PVH e SO em ratas Long-Evans em	
		fase de diestro, 5° e 19° dias de lactação	44
Figura 6	-	Localização de fibras MCH-ir e OT-ir na eminência mediana em rata em fase	
		de diestro, 5° e 19° dias de lactação	46
Figura 7	-	Localização de fibras MCH-ir e OT-ir na hipófise posterior em rata em fase	
		diestro, 5° e 19° dias de lactação	47
Figura 8	-	Local de captação de FG injetado intravascularmente em ratas Long-Evans em	
		fase diestro, 5° e 19° dias de lactação	49
Figura 9	-	Expressão do RNAm do prepro-MCH e células retrogradamente marcadas	
		com FG na MPOA em ratas na fase diestro e no 19º dia de lactação	50
Figura 10) -	Western blotting para ppMCH e OT na hipófise posterior de ratas Long-	
		Evans em fase diestro, 5° e 19° dias de lactação	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 V -	Terceiro ventrículo
ABC -	Complexo avidina-biotina
ACTH -	Hormônio adrenocorticotrófico
AgRP -	Peptídeo relacionado à proteína agouti
BST -	Núcleo intersticial da estrial terminal
CART -	Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
DAB -	Diaminobenzidina
EM -	Eminência mediana
EMi -	Lâmina interna da eminência mediana
FG -	Fluorogold®
GABA -	Ácido gama-aminobutírico
GH -	Hormônio do crescimento
GnRH -	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
IHy -	Área Incerto Hipotalâmica
Ip -	Intraperitoneal
KPBS -	Tampão potássio fosfato de sódio
LH -	Hormônio luteinizante
LHA -	Área Hipotalâmica Lateral
MCH -	Hormônio Concentrador de Melanina
MCH-ir-	Imunorreativo ao MCH
MCHR1-	Receptor 1 do Hormônio Concentrador de Melanina
MPO -	Núcleo pré-óptico medial
MPOA -	Área pré-óptica medial
NEI -	Neuropeptídeo EI
NEG -	Neuropeptídeo EG
NPY -	Neuropeptídeo Y
ORX -	Orexina
OT -	Ocitocina
OT-ir -	Imunorreativo à ocitocina

PB -	Tampão fosfato
PBS -	Tampão fosfato de sódio
Pe -	Núcleo periventricular do hipotálamo
POMC -	Pro-opiomelanocortina
PPit -	Hipófise posterior
ррМСН-	Prépro-hormônio concentrador de melanina
PRL -	Prolactina
PTH -	Paratormônio
PVH -	Núcleo paraventricular do hipotálamo
PVHa -	Região anterior do núcleo paraventricular do hipotálamo
rMCH -	Hormônio concentrador de melanina do rato
sMCH -	Hormônio concentrador de melanina do salmão
RNAm -	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
SNC -	Sistema nervoso central
SO -	Núcleo supra-óptico
TBS -	Tampão Tris em solução salina
TBST -	Tampão Tris em solução salina e Tween 20 1%
TSH -	Hormônio tireóideo-estimulante
α- MSH-	Alfa hormônio estimulador de melanócito

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Características fisiológicas da lactação	19
2.1.1 Ação da prolactina e ocitocina durante a lactação	19
2.1.2 Homeostasia energética durante a lactação	20
2.1.3 Inibição da reprodução durante a lactação	21
2.1.4 Indução ao comportamento maternal durante a lactação	22
2.2 Hormônio concentrador de melanina (MCH)	22
2.3 Hormônio concentrador de melanina na eminência mediana	24
2.4 Hormônio concentrador de melanina na área pré-óptica medial	24
2.5 Justificativa	25
2.6 Objetivos	25
2.6.1 Objetivos gerais	25
2.6.2 Objetivos específicos	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais de experimentação	27
3.2 Grupos experimentais	27
3.3 Determinação do ciclo estral	
3.4 Sacrifício e preparação dos tecidos	
3.5 Controle da especificidade dos anticorpos	30
3.6 Método de dupla marcação com imunoperoxidase	
3.6 Método de dupla marcação com imunofluorescência na MEi e PPit	32
3.7 Cirurgia de acesso à veia femoral para injeção de Fluoro-gold® (FG) na corre	nte
sanguínea	32
3.8 Método de dupla marcação com hibridização <i>in situ</i> e imuno-histoquímica	33
3.9 Método de Western Blotting	
3.9.1 Método de Imunoprecipitação	
3.9.2 Método de Imunoblotting	
3.10 Método de aquisição de imagem	
3.11 Aspectos éticos	
4 RESULTADOS	
5 DISCUSSÃO	52

6 CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE – Artigo publicado	67

1 INTRODUÇÃO

O hormônio concentrador de melanina (MCH) tem sido muito estudado nos últimos anos como um dos principais neuromoduladores do comportamento alimentar em mamíferos (Elmquist, 2001; Elmquist et al., 1999; Niswender et al., 2004; Sawchenko, 1998; Smith, Grove, 2002; Woods, D'Alessio, 2008).

No entanto, outras funções podem ser atribuídas ao MCH, principalmente pelo fato de ser expresso essencialmente no hipotálamo. Provavelmente é um regulador de respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais que garante a homeostasia do indivíduo, sua sobrevivência e, portanto, a manutenção da espécie.

Algumas características inerentes aos mamíferos e de suma importância para a sobrevivência da espécie estão nos períodos de gestação e de lactação. A lactação é um estado fisiológico natural posterior ao parto, caracterizado pela alta demanda energética, pela inibição da função ovariana, dentre outras alterações fisiológicas e comportamentais da fêmea requeridas pelas circunstâncias (Numan, 2006).

Estudos como o de Knollema et al. (1992) e Rondini et al. (2010) colocam o MCH como um possível regulador envolvido no processo de lactação, uma vez que relataram que ocorre a expressão do RNAm do pré-pró-hormônio concentrador de melanina (ppMCH) e a presença do peptídeo MCH, principalmente na parte ventral da área pré-óptica medial (MPOA) somente no período lactante. Foi relatado, também, que o pico dessa expressão ocorre no término da lactação (entre os dias 19° e 21°). A MPOA está localizada na região rostral do hipotálamo e com evidências muito robustas de seu envolvimento no comportamento maternal (Numan, Stolzenberg, 2009).

Um hormônio que tem seu papel há muito tempo conhecido na reprodução, principalmente durante o parto e na lactação é a ocitocina (OT). A OT é um hormônio hipotalâmico produzido e transportado por neurônios neurossecretores para a hipófise posterior (PPit) onde é liberado. Esses neurônios neurossecretores antes de chegarem à PPit passam pela eminência mediana (ME). Estrutura essa que é dividida em lâmina interna e externa, onde encontramos principalmente axônios e terminais de axônios muito próximos aos capilares sanguíneos, estabelecendo uma região de contato neuro-humoral entre o hipotálamo e a hipófise. É descrito na literatura a presença na lâmina interna da ME (MEi), de fibras imunorreativas ao MCH (Bittencourt et al., 1992) e também de fibras imunorreativas à OT (Swanson, 1987). Essa associação entre fibras MCH-érgicas e OT-érgicas sugere uma relação entre o MCH e a OT e que o MCH deva ter alguma função no término do período de lactação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características fisiológicas da lactação

Durante o comportamento maternal as fêmeas executam ações para garantir a sobrevivência dos seus filhotes. Entre essas ações inclui-se a lactação, que é um dos comportamentos maternais indispensáveis para o crescimento e o desenvolvimento dos recém-nascidos (Numan, 2006; Voogt, 1978). A lactação é resultante de um mecanismo neuroendócrino sincronizado que envolve uma rede de conexões hipotalâmicas e extra-hipotalâmicas. As conexões regem atividades fisiológicas que estimulam a secreção de leite (Tucker, 1979). Tal secreção é um processo complexo de múltiplos estágios que inclui o desenvolvimento estrutural da glândula mamária, a produção e o início da secreção de leite após o advento do parto e a manutenção da produção de leite durante o período lacterífero na fêmea (Buhimschi, 2004).

Para garantir adaptação da lactante a essa nova condição pós-parto, várias alterações fisiológicas ocorrem, entre elas: o aumento dos níveis séricos de prolactina (PRL) e ocitocina (OT); um profundo efeito na homeostasia energética, com aumento no consumo de água e alimento; a interrupção do ciclo reprodutivo; e uma indução ao comportamento maternal (Grattan, 2001; Smith, Grove, 2002).

2.1.1 Ação da prolactina e ocitocina durante a lactação

Os aspectos hormonais da lactação envolvem hormônios da hipófise anterior (adenohipófise) e da posterior (neurohipófise). As alterações hormonais ocorridas durante a gestação contribuem para o desenvolvimento do tecido mamário permitindo a produção do leite (Buhimschi, 2004).

Os hormônios sexuais, progesterona e estrógeno estão presentes em grande quantidade durante a gravidez e alcançam níveis máximos perto do final da gestação. E a queda do nível dos mesmos após o nascimento do feto é que gera o estímulo para o início da lactação (Voogt, 1978).

Outros hormônios como o do crescimento (GH), o adrenocorticotrófico (ACTH), o tireóideo-estimulante (TSH), a insulina e o paratormônio (PTH) também contribuem para a lactação, no entanto é a PRL e a OT que ocupam um lugar de destaque nesse processo (Buhimschi, 2004; Freeman et al., 2000; Tucker, 1979).

A PRL é produzida principalmente por células especializadas da hipófise anterior (lactotróficos). Sua produção ocorre também em outros tecidos, incluindo a mama, a placenta,

e em regiões do encéfalo e também pelo sistema imunológico. A regulação de sua secreção é hipotalâmica e predominantemente com efeito inibitório mediado pela dopamina. A PRL é bem conhecida pelos efeitos que exerce sobre a glândula mamária, promovendo o seu desenvolvimento e a produção de leite. No entanto, ela também tem influência em outras ações relacionadas à reprodução dos mamíferos, como o acasalamento e o comportamento maternal (Freeman et al., 2000). A PRL promove a síntese láctea e, juntamente com a OT promovem o reflexo de ejeção de leite (Lee et al., 2009).

A OT é sintetizada principalmente nos neurônios magnocelulares dos núcleos paraventriculares (PVH) e supra-óptico (SO) do hipotálamo. Este hormônio é transportado por meio de proteínas transportadoras denominadas neurofisinas, dos neurônios magnocelulares dos PVH e SO, através lâmina interna da ME para a PPit, local onde é armazenado e liberado para a corrente sanguínea para atingir os seus órgãos-alvo (Kiss, Mikkelsen, 2005; Lee et al., 2009; Leng et al., 2008; Neumann, 2008).

A OT também tem uma ação central como um neuromodulador, sendo liberado no sistema nervoso central por meio dos neurônios parvocelulares, os quais estão localizados no PVH e em outras regiões do prosencéfalo (Lee et al., 2009; Numan, Stolzenberg, 2009).

A OT tem a função indutora da contração uterina durante o parto foi descoberta em 1906 e em 1911 a sua influência fundamental na ejeção do leite foi descrita. Estudos mais recentes têm investigado outras funções da OT, como por exemplo, a sua atuação sobre diversos comportamentos tanto em humanos como em outros animais. Entre estes comportamentos podemos citar: reconhecimento social, a monogamia, o orgasmo, a ansiedade, a agressividade, a confiança, afetividade e o comportamento maternal (Lee et al., 2009; Leng et al., 2008; Neumann, 2008).

A PRL e OT mantém a lactação, mas a quantidade de leite produzido está diretamente relacionada com a intensidade da sucção e do número de filhotes junto ao mamilo da rata lactante (Lincoln, Paisley, 1982).

2.1.2 Homeostasia energética durante a lactação

Regulando o comportamento alimentar encontramos uma série de hormônios e neuropeptídeos, tais como a leptina, o MCH, o neuropeptídio Y (NPY), o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), o pró-ópio-melanocortina (POMC), o alfa hormônio estimulador de melanócito (α -MSH), a orexina (ORX) e o peptídeo relacionado à proteína *agouti* (AgRP), que são extensivamente descritos na literatura como envolvidos no

comportamento alimentar e no controle do peso corporal (Elmquist, 2001; Elmquist et al., 1999; Niswender et al., 2004; Sawchenko, 1998; Smith, Grove, 2002; Woods, D'Alessio, 2008).

É provável que o comportamento alimentar durante a lactação também seja regulado por esses hormônios e neuropeptídeos. Sendo que uma das características da lactante é a hiperfagia associada a um estado de balanço energético negativo (Smith, Grove, 2002). Tanto o aumento do consumo de alimentos como o aumento do gasto energético é uma adaptação da exigência de energia para síntese e ejeção do leite (Wade et al., 1996).

2.1.3 Inibição da reprodução durante a lactação

Durante a lactação há uma inibição da secreção do hormônio luteinizante (LH) independentemente dos hormônios ovarianos, o que promove uma inibição da ovulação (Fox, Smith, 1984; Tsukamura, Maeda, 2001), também foi sugerido que a supressão do LH ao longo da lactação é regulada tanto por fatores metabólicos e não metabólicos. É colocado também, que o fator de supressão da secreção de LH durante a primeira metade do período de lactação seja o estímulo de sucção gerado pelo contato do filhote com a mãe, enquanto que na segunda metade do período de lactação é o aumento da drenagem do leite e consequente aumento do gasto energético (Tsukamura, Maeda, 2001).

Adicionalmente Williamson-Hughes et al. (2005) descreveram que neurônios GnRH coexpressam o receptor 1 para o MCH (MCHR-1) e terminais MCH-ir são encontrados em justaposição com corpos celulares e fibras GnRH-ir em ratas fêmeas. Rondini et al. (2010) descreveram que os neurônios MCH na MPOA coexpressam o neurotransmissor inibitório, ácido gama-aminobutírico (GABA). Os neurônios gabaérgicos na MPOA também estão envolvidos na ação de retroalimentação negativa do estrógeno sobre a secreção de LH (Herbison et al., 1991). Portanto, os neurônios MCH/GABA da MPOA podem atuar diretamente sobre os neurônios GnRH inibindo a secreção pulsátil de LH (Rondini et al., 2010).

Esta influência dos neurônios MCH sobre a secreção de LH, não está totalmente esclarecida, sendo necessário identificar o real papel do MCH na inibição da função reprodutiva durante a lactação.

2.1.4 Indução ao comportamento maternal durante a lactação

O comportamento maternal é responsável por ações bem caracterizadas que as fêmeas executam para garantir a sobrevivência dos seus filhotes. No caso dos ratos essas ações incluem: o recolhimento dos filhotes, a construção do ninho, lambidas e a limpeza do filhote, agrupamento dos filhotes no ninho com posicionamento sobre eles para a lactação e aquecimento (Numan, 2006). Os filhotes começam a mamar logo após o nascimento e esse período dura em média de 21 dias (Mann, Bridges, 2001; Numan, Stolzenberg, 2009). No entanto, esse período pode se estender até próximo do 35º dia em ratas em ambiente selvagem (Cramer et al., 1990).

Durante o período da lactação, as ratas apresentam o comportamento de cuidar dos filhotes, sendo que o recolhimento dos filhotes, a construção do ninho e a amamentação podem ser bem observados durante as duas primeiras semanas após o parto. Posteriormente, esses comportamentos começam a declinar até desaparecerem em torno da quarta à quinta semana após o parto (Cramer et al., 1990; Numan, 2006).

Acrescentando aos eventos citados anteriormente, as ratas lactantes apresentam também um comportamento de agressividade. Essa agressão maternal consiste na execução de ações realizadas pela mãe em relação a algum tipo de intruso, que possa colocar em risco sua ninhada (Giovenardi et al., 2005).

Existem evidências que a MPOA e a região ventral do núcleo intersticial da estria terminal (BST) são essenciais para o início e manutenção do comportamento maternal em ratas. Estudos têm mostrado que neurônios na MPOA contêm receptores para PRL, progesterona e estrógeno, hormônios estes que atuam estimulando o início do comportamento maternal (Numan, Stolzenberg, 2009).

Estudos realizados por Knollema et al. (1992) e Rondini et al.(2010) demonstraram um aumento da expressão do RNAm do ppMCH, com ápice no 19º dia de lactação, principalmente na MPOA, e ausência dessa expressão fora do período lactante. Indicando uma possível influência do MCH no período terminal da lactação em ratas.

2.2 Hormônio concentrador de melanina (MCH)

Podemos observar que na maioria das características fisiológicas resultantes da lactação há uma provável influência direta ou indireta do MCH, seja na homeostasia energética, na inibição da reprodução, na indução ao comportamento maternal ou na própria

lactação (Elmquist, 2001; Knollema et al., 1992; Rondini et al., 2010; Schwartz, 2001; Smith, Grove, 2002; Williamson-Hughes et al., 2005).

O MCH é um peptídeo que foi isolado pela primeira vez na hipófise de salmão e posteriormente encontrado no sistema nervoso central de mamíferos (Vaughan et al., 1989). Nahon et al., (1989) isolou do hipotálamo do rato um peptídeo cuja estrutura assemelha-se ao do MCH do salmão (sMCH) e a definiu como sendo cíclica e composta por 19 aminoácidos, diferenciando-se do sMCH em dois aminoácidos da porção amino-terminal e quatro substituições. O MCH é um neuropeptídeo que requer processamento pós-tradução do ppMCH, que também codifica outros neuropeptídeos como o NEI, neuropeptídeo ácido glutâmico-isoleucina, e o NGE, neuropeptídeo glicina-ácido glutâmico (Nahon et al., 1989).

Bittencourt et al. (1992) a partir do isolamento do MCH do hipotálamo do rato (rMCH), delimitaram as regiões imunorreativas ao MCH e NEI no sistema nervoso central do rato. As principais regiões de expressão de RNAm do pré-pró-MCH e da imunorreatividade ao peptídeo são, no macho e na fêmea, a área hipotalâmica lateral (LHA) e a área incerto-hipotalâmica (IHy). Todo o neuroeixo, com exceção do cerebelo e a maioria dos núcleos motores do tronco encefálico, recebem em maior ou menor grau, fibras MCH-ir oriundas de pericários localizados no diencéfalo, cuja distribuição ocorre por meio do fascículo prosencefálico medial (Bittencourt et al., 1992; Bittencourt et al., 1990; Elias, Bittencourt, 1993; Nahon et al., 1989)

Desde sua descoberta atribui-se ao MCH uma ampla gama de funções, dentre elas podemos citar: mudanças adaptativas na pigmentação em peixes, anfíbios e répteis (Kawauchi et al., 1983), modulação da liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Bluet-Pajot et al., 1995), regulação osmótica (Presse, Nahon, 1993), regulação de água e eletrólitos do meio interno (Parkes, Vale, 1993; Presse et al., 1996), modulação da retenção de memória (Monzon et al., 1999), redução da ansiedade (Monzon et al., 2001), envolvimento na integração sensório-motora (Miller et al., 1993), integração de processos complexos associados a resposta emocional, cognição e excitação geral (Baker, 1994; Nahon, 1994), participação no controle da ingestão alimentar e do balanço energético (Bahjaoui-Bouhaddi et al., 1994; Flier, Maratos-Flier, 1998; Presse et al., 1996; Qu et al., 1996), e participando também da regulação do peso corporal mediando mudanças nas concentrações dos hormônios Tritos, Maratos-Flier, 1999), apresenta ainda circulantes (Kokkotou et al., 2001; envolvimento nos circuitos que controlam o comportamento de procura de alimentos (Casatti et al., 2002), participação em circuitos autonômicos e somatomotores (Elias, Bittencourt, 1997), circuitos relacionados ao controle de comportamentos motivados (Elias et al., 2008; Sita et al., 2007) e participação nos controles dos comportamentos maternal e reprodutivo (Chiocchio et al., 2001; Knollema et al., 1992).

2.3 Hormônio concentrador de melanina na eminência mediana

A ME representa a interface entre o hipotálamo e a hipófise, estando no rato, localizada na região ventrocaudal do hipotálamo. Sendo dividida em duas camadas: lâmina interna, constituindo o assoalho do terceiro ventrículo nessa região tuberal; e a lâmina externa onde encontramos terminais de neurônios neurossecretores de diferentes núcleos hipotalâmicos em contato com o sistema porta-hipotálamo-hipofisário (Kobayashi et al., 1970; Page, 2006).

Bittencourt et al. (1992) ao estudarem a distribuição de fibras e varicosidades imunorreativas ao MCH observaram uma moderada densidade de fibras imunorreativas ao MCH (MCH-ir) na lâmina interna e pouca densidade de fibras na lâmina externa da ME em ratos.

Também em 1992 Knollema et al. pressupondo uma relação entre MCH e neurônios neurossecretores ocitocinérgicos na MEi, combinaram a técnica de hibridização *in situ* para o RNAm do ppMCH e imuno-histoquímica para OT em ratas em diferentes fases do ciclo reprodutivo, chegando ao resultado de que apesar de não haver co-localização entre os novos locais de síntese de MCH/NEI com a OT, ambas as projeções transitam pela MEi a caminho da PPit.

Essa aparente associação entre o sistema MCH com neurônios neurosecretores magnocelulares ocitocinérgicos sugerem uma possível relação entre MCH e OT.

2.4 Hormônio concentrador de melanina na área pré-óptica medial

Outro dado importante descrito por Knollema et al. (1992) é a presença tanto de RNAm do ppMCH e seus derivados (MCH e NEI) na MPOA e na região anterior do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVHa), durante o período lactante em ratas e a ausência dos mesmos em qualquer outra fase do ciclo reprodutivo destas fêmeas.

Estudos realizados por Rondini et al. (2010) também relataram a expressão tanto de RNAm do ppMCH como do peptídeo MCH na MPOA e na PVHa, exclusivamente em ratas lactantes. Nesse experimento encontraram a seguinte cinética de expressão: 1) níveis baixos de RNAm do ppMCH no quinto dia de lactação; 2) moderada expressão no décimo segundo

dia; 3) e uma grande expressão no décimo nono dia de lactação; 4) enquanto que nenhum sinal de expressão foi encontrado após o período de lactação, na gestação ou qualquer outra fase do ciclo estral nas ratas observadas.

Os resultados são compatíveis com estudos anteriores implicando as áreas hipotalâmicas rostrais e pré-óptica no controle da lactação e do comportamento maternal (Numan, Stolzenberg, 2009) e sugerem a possibilidade de que os peptídeos codificados pelo ppMCH possam participar dessas funções (Knollema et al., 1992).

2.5 Justificativa

Visto a presença de fibras MCH-ir e OT-ir na MEi em direção à PPit e a expressão de RNAm do ppMCH na MPOA apenas em ratas lactantes, e somente no final desse período, sugere-se a existência de uma associação entre MCH, OT, MPOA e o término da lactação. Dessa maneira, seria justificável procurar pela origem das fibras MCH-ir encontradas na MEi e a sua possível relação com as fibras OT-ir.

2.6 Objetivos

2.6.1 Objetivos gerais

• Contribuir para o estabelecimento do papel do MCH na lactação.

2.6.2 Objetivos específicos

- Descrever através da microscopia óptica as fibras MCH-ir e OT-ir e as relações entre elas na passagem pela MEi em direção à PPit em ratas lactantes;
- Descrever a origem das fibras imunorreativas ao MCH na MEi e na PPit em ratas lactantes;
- Quantificar o ppMCH e OT na PPit em ratas lactantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizadas ratas fêmeas virgens da linhagem Long-Evans, com idade inicial de três meses, pesando aproximadamente 350 g, todas em fase reprodutiva. Esses animais foram criados no Biotério do Departamento de Anatomia e mantidos em ambiente controlado, a temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, ciclo claro/escuro (12/12 h), sendo as luzes acesas às 7 h, com água e ração *ad libitium*. O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do ICB/USP (70/10).

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram designados aleatoriamente, sendo realizada apenas a análise do ciclo estral para determinar o grupo controle e o momento de acasalamento. A divisão dos grupos foi baseada em outros experimentos realizados por Knollema et al. (1992) e Rondini et al. (2010). Os grupos foram divididos em diestro, 5º dia de lactação e 19º dia de lactação, compreendendo o controle, o início e o término do período lactante, respectivamente. Sendo assim os grupos foram distribuídos da seguinte forma:

- <u>Grupo 1</u> (n= 15): Fêmeas virgens e fêmeas lactantes. Os animais desse grupo foram utilizados para estudos de imuno-histoquímica para microscopia de luz, microscopia de fluorescência e microscopia confocal. Esses animais foram distribuídos da seguinte maneira:

- Fase diestro (n= 5): Fêmeas virgens perfundidas na fase diestro.

- 5° dia de lactação (n= 5): Fêmeas lactantes perfundidas no 5° dia de lactação.

- 19° dia de lactação (n= 5): Fêmeas lactantes perfundidas no 19° dia de lactação.

<u>Grupo 2</u> (n= 15): Fêmeas virgens e fêmeas lactantes. Os animais desse grupo foram utilizados para estudo combinado de hibridização *in situ e* imuno-histoquímica anti-Fluoro-gold® (FG). Esses animais foram distribuídos da seguinte maneira:

- Fase diestro (n=5): Fêmeas virgens nas quais foi realizada a cirurgia de acesso à veia femoral para injeção intravascular do FG. Após, no mínimo quatro dias, mais precisamente na fase diestro, foi realizada a perfusão.

 - 5º dia de lactação (n= 5): Fêmeas lactantes nas quais foi realizada a cirurgia de acesso à veia femoral para injeção do FG no 1º dia de lactação com perfusão após quatro dias;

 - 19º dia de lactação (n= 5): Fêmeas lactantes nas quais foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico para aplicação do FG no 15º dia de lactação com perfusão após quatro dias. <u>Grupo 3</u> (n= 15): Fêmeas virgens e fêmeas lactantes. Os animais desse grupo foram utilizados para estudos de *Western Blotting*. Esses animais foram distribuídos da seguinte maneira:

- Fase diestro (n=5): Fêmeas virgens decapitadas na fase diestro.
- 5° dia de lactação (n= 5): Fêmeas lactantes decapitadas no 5° dia de lactação.
- 19° dia de lactação (n= 5): Fêmeas lactantes decapitadas no 19° dia de lactação.

3.3 Determinação do ciclo estral

Esse procedimento foi utilizado para analisar a regularidade do ciclo estral e determinar o momento propício ao acasalamento. O ciclo estral das ratas foi determinado por meio da técnica de lavado vaginal, que consiste na introdução de uma pipeta de plástico no canal vaginal para a aplicação e imediata coleta de um pequeno volume de solução salina 0.9%. O líquido coletado foi colocado em lâminas de vidro e observado no microscópio óptico (Marcondes et al., 2002). Considera-se a fêmea na fase diestro quando é observada no lavado uma grande quantidade de leucócitos, na fase proestro é observada uma grande quantidade de células epiteliais, na fase estro observa-se apenas grande quantidade de células cornificadas, enquanto que na fase metaestro encontramos uma variedade de células: leucócitos, epiteliais e corneificadas (Marcondes et al., 2002) (Figura 1).





Fotomicrografia ilustrando o lavado vaginal de ratas, fases do ciclo estral: a, b) proestro; c, d) estro; e, f) metaestro; g, h) diestro. Abreviações: L, leucócitos; C, células corneificadas; E, células epiteliais. Fonte: Adaptado de Marcondes, 1999.

Este procedimento foi realizado no período da manhã entre 9:00 e 11:00 horas para respeitar as diferentes fases do ciclo estral. O ciclo estral dos animais foi acompanhado por um período médio de 10 dias antes do início do protocolo experimental, de forma que apenas as ratas que apresentaram dois ciclos estrais regulares (presença de dois proestros) foram utilizadas neste estudo. Identificada à regularidade do ciclo, as ratas na tarde do proestro com início de estro foram colocadas para o acasalamento, com o uso de um macho experiente (90 dias de idade) para cada duas fêmeas, ou seja, trata-se de um acasalamento poligâmico. No dia seguinte, após a confirmação da fecundação, através da certificação da presença de espermatozóides no lavado vaginal, as fêmeas foram então colocadas em uma gaiola individual e aguardou-se a evolução da gestação. No segundo dia após o parto foi pareada a quantidade de filhotes, sendo 8 para cada rata lactante. Consideramos o primeiro dia de lactação o dia seguinte ao parto (Balonan, Sheng, 2000; Castellano, Oliverio, 1976; Oliverio, 1975).

3.4 Sacrifício e preparação dos tecidos

Os animais do grupo 1 e 2 foram submetidos à perfusão transcardíaca. Primeiramente esses animais foram anestesiados intraperitonealmente (ip) com 1 ml de uma solução anestésica de hidrato de cloral a 35%. Logo após sofreram toracotomia e foram perfundidos inicialmente com solução salina 0,9% (\approx 100 ml/ 1 min) e posteriormente com fixador a 4% de formaldeído e 3,8% de bórax com pH 9,5 (700-900 ml/ 25 min). Logo após a perfusão os encéfalos e as hipófises dos animais foram retirados da caixa craniana e pós-fixados na mesma solução fixadora acrescida de 20% de sacarose por um período de aproximadamente 1 h à 4 °C e em seguida colocados em solução até o momento da microtomia. Os encéfalos foram cortados em micrótomo de congelação em um plano frontal com 30 µm de espessura, enquanto as hipófises foram cortas em criostato em um plano transversal com 15 µm de espessura.

Os animais do grupo 3 foram sacrificados por decapitação, utilizando-se uma guilhotina apropriada. Não foi utilizado qualquer tipo de anestesia antes ou durante o sacrifício. Tal procedimento foi realizado de forma rápida, visando minimizar qualquer forma de sofrimento ou estresse, por parte dos animais. Foram retiradas as hipófises posteriores dos animais e congeladas em nitrogênio líquido e depois armazenadas em freezer -80 °C.

3.5 Controle da especificidade dos anticorpos

Os anticorpos utilizados nos experimentos foram testados através da técnica de imunofluorescência (como será descrito a seguir), sendo que no controle positivo todas as etapas do procedimento foram realizadas e no controle negativo exclui-se apenas a etapa de incubação no anticorpo primário. Os anticorpos primários utilizados: o anti-MCH (anticorpo policlonal, PBL #234) fornecido pelos Dr. Wylie W. Vale e Joan Vaughan do Instituto Salk para Estudos Biológicos, San Diego, Califórnia, EUA – esse anticorpo já teve a sua especificidade testada, vide Nahon et al., 1989 e Bittencourt et al., 1992); e o anticorpo anti-OT feito em *guinea-pig* (Península Labs # T-5021).

3.6 Método de dupla marcação com imunoperoxidase

Visando observar a distribuição das células e fibras imunorreativas ao MCH e à OT em ratas da linhagem Long-Evans foi realizada uma dupla marcação pelo método de imunoperoxidase utilizando como cromógeno o tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) associado ao níquel para MCH e sem níquel para OT, de modo a visualizar um antígeno em preto (com níquel) e outro em castanho claro (sem níquel). Foram utilizados nesse experimento cortes de encéfalos das ratas do grupo 1.

Antes da exposição ao anticorpo os cortes receberam um pré-tratamento que consistiu em 2 lavagens de 10 min em solução de KPBS para remover a solução anti-congelante dos cortes. Posteriormente, os cortes foram incubados durante 30 min em solução KPBS + 0,3% Triton X-100 contendo 0,3% de peróxido de hidrogênio. Os cortes foram lavados diversas vezes em KPBS até que todas as bolhas resultantes da exposição ao peróxido de hidrogênio desaparecessem e após essa etapa os cortes foram incubados durante 1 hora em solução KPBS + 0,3% Triton X-100 contendo 3% de soro normal de burro (Vector Laboratories). Depois, foi adicionado na mesma solução o anticorpo primário, produzido em coelho e específico contra antígenos de rato, e os cortes permaneceram incubados à temperatura ambiente por 18 h, no caso o anticorpo primário anti-MCH (anti-rMCH) na concentração de 1:10.000 (anticorpo policlonal, PBL #234, fornecido pelos Dr. Wylie W. Vale (*in memorian*) e Joan Vaughan do Instituto Salk para Estudos Biológicos, San Diego, Califórnia, EUA – esse anticorpo já teve a sua especificidade testada, vide Nahon et al., 1989 e Bittencourt et al., 1992), e mantidos em constante agitação a temperatura ambiente. No dia seguinte, os cortes foram lavados duas vezes de 10 min cada com KPBS e incubado com anticorpo secundário biotinilado produzido em burro e específico contra antígenos de coelho (Jackson Labs) na concentração 1:200 (Vector # BA-1000) por 1h. Procedemos a novas lavagens com KPBS (2 vezes de 10 min) e incubação dos cortes no Complexo Avidina-Biotina (ABC – Vectastain Kit elite PK 6100) diluído em KPBS na concentração 1:500, durante o período de 1 hora. Os cortes foram submetidos a duas lavagens de 10 min cada com KPBS. A reação de imunoperoxidase foi realizada com 0,05% diaminobenzidina (DAB- Sigma) como cromógeno e peróxido de hidrogênio 0,03%. Foi acrescido na solução 0,25% de sulfato de amônia-níquel. O uso do sulfato de amônia-níquel teve como objetivo intensificar a marcação obtida pelo DAB e foi uma estratégia utilizada para a obtenção de colorações distintas nas duplas marcações. Os cortes foram mantidos em contato com o cromógeno DAB até que fosse constatada a eficácia da reação por meio de observação visual. A reação foi interrompida por meio de várias lavagens em KPBS.

Na sequência os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-OT produzido em coelho e específico contra antígenos de *guinea-pig* (Península Labs # T-5021) na concentração 1:10.000, em solução de KPBS, Triton X-100 0,3% e 3% de soro normal de cabra. Concentração foi determinada através de teste de titulação.

No dia seguinte, os cortes foram lavados duas vezes de 10 min cada em KPBS e incubados em anticorpo secundário biotinilado produzido em burro e específico contra antígenos de *guinea pig* (Jackson Labs) na concentração 1:200 (Vector # BA-1000) por 2h. Procedemos a novas lavagens com KPBS (2 vezes de 10 min) e incubação dos cortes no Complexo Avidina-Biotina (ABC – Vectastain Kit elite PK 6100) diluído em KPBS na concentração 1:500, durante o período de 1 hora. Os cortes foram submetidos a duas lavagens de 10 min cada com KPBS. A reação de imunoperoxidase foi realizada com 0,05% diaminobenzidina (DAB - Sigma) como cromógeno DAB até que fosse constatada a eficácia da reação por meio de observação visual. A reação foi interrompida por meio de 3 lavagens de 10 min cada em KPBS.

Após a coloração, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e deixados secar em estufa a 37 °C por um período mínimo de 18 horas. Posteriormente, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico a 50%, 70%, 95% (2 vezes) e 100% (3 vezes) durante 3 min cada banho e deslipidificados com xilol (primeiro banho de 5 min e segundo de pelo menos 30 min). As lâminas foram então cobertas com DPX e lamínula.

3.7 Método de dupla marcação com imunofluorescência na MEi e PPit

O método de dupla marcação com imunofluorescência para microscopia confocal foi utilizado para verificarmos a posição das fibras MCH-ir e OT-ir na MEi, uma vez que é reportado na literatura a presença dessas fibras na MEi, mas não havendo descrição de relação topográfica entre elas, o mesmo método também foi utilizado para verificarmos a posição das fibras MCH-ir e OT-ir na PPit. Foram utilizadas nesse experimento cortes das ratas do grupo 1.

Uma série de cortes de cada animal foi lavada em KPBS (seis vezes de 5min cada) e incubadas em um coquetel de anticorpo primário anti-rMCH feito em coelho na concentração de 1:1.000 (detalhes do anticorpo anti-rMCH descritos anteriormente) e anti-OT feito em *guinea-pig* (detalhes do anticorpo anti-OT descrito anteriormente) na concentração 1:1.000, em solução de KPBS, Triton X-100 0,3% e 3% de soro normal de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e mantidos em constante agitação a temperatura ambiente por aproximadamente 18 h. No dia seguinte, os cortes foram lavados seis vezes de 5 min cada uma em KPBS e incubadas em um coquetel de anticorpo secundário feito em coelho Alexa Fluor 594 e anticorpo secundário feito em *guinea-pig* Alexa Fluor 488, na concentração de 1:200 (Molecular Probes/USA). Após 2 h, os cortes foram novamente lavados por seis vezes de 5 min cada em KPBS e na sequência montados em lâminas, deixados secar em temperatura ambiente e cobertos com lamínulas e tampão glicerol. Posteriormente as lâminas foram mantidas a temperatura de 4 °C.

3.8 Cirurgia de acesso à veia femoral para injeção de Fluoro-gold® (FG) na corrente sanguínea

O Fluoro-gold® (FG) é um traçador neuronal retrógrado fluorescente utilizado no estudo de mapeamento retrógrado nas partes central e periférica do sistema nervoso. O FG pode ser utilizado na forma de injeções vasculares que se difundem para regiões do hipotálamo devido à ausência de barreira hemato-encefálica na região. Em nossos experimentos realizamos a injeção por pressão do FG com acesso intravenoso pela veia femoral. Foram utilizadas nesse experimento ratas do grupo 2.

Os animais foram anestesiados com uma solução anestésica aquosa composta de cloridrato de cetamina (5 mg/100g), cloridrato de xilasina (1 mg/100g) e acepromazina (0,2 mg/100 g). Foi injetado intraperitonealmente 0,2 ml dessa solução por cada 100 gramas de

peso corporal do animal. O animal anestesiado foi colocado em decúbito dorsal e sua pata posterior esquerda foi fixada, realizou-se uma pequena incisão na região medial da coxa para ter acesso à veia femoral.

Após a exposição da veia femoral foi introduzido uma agulha gengival G30 (com 318 μ m de diâmetro) ligada uma cânula de plástico (PE-60) e acoplada a uma seringa de 1 ml. A agulha, a cânula e a seringa foram fixadas por aquecimento. Tanto a seringa como a cânula foram totalmente preenchidas por FG, tendo sido injetado na veia femoral cerca de 700 μ l de solução de FG na concentração de 0,6 mg FG/100 μ l de salina (0,9%) (Cvetkovic et al., 2003).

Na sequência, a agulha foi retirada e realizada a limpeza e o fechamento da incisão cirúrgica. Os animais permaneceram no biotério do Departamento de Anatomia. Após quatro dias da realização da injeção do FG, tempo esse necessário para a captação e transporte do traçador pelos terminais da ME e PPit os animais foram submetidos à perfusão e microtomia.

3.9 Método de dupla marcação com hibridização in situ e imuno-histoquímica

Este experimento consistiu na realização de uma dupla marcação usando hibridização *in situ* para o RNAm do ppMCH e imuno-histoquímica anti-FG. A utilização de um anticorpo dirigido contra esse traçador torna possível a realização de outras técnicas de pesquisas associadas ao traçamento neuronal. Em nosso experimento, mesmo ele sendo um traçador fluorescente, foi utilizada a técnica de imunoperoxidase para detecção do FG com intuito de aumentar a sensibilidade do material depositado, facilitando assim a visão de neurônios com marcações retrogradas pouco visíveis em fluorescência, principalmente após o tratamento dos cortes para hibridização *in situ*.

Esse método foi utilizado com o propósito de identificar o RNAm do ppMCH e a imunorreatividade ao FG das células marcadas retrogradamente com o mesmo, visando encontrar na MPOA neurônios com ambas as marcações. Foram utilizadas nesse experimento ratas do grupo 2

Inicialmente foi realizada a hibridização *in situ*. com a sonda para o RNAm do ppMCH. O plasmídeo contendo a sonda para o RNAm do ppMCH foi gentilmente cedido pelo Prof. Paul Sawchenko (Laboratório de Estrutura e Função Neuronal do Instituto Salk para Pesquisa Biológica, San Diego – EUA). Essa sonda foi previamente testada conforme descrição de Bittencourt et al. (1992). Os plasmídeos foram linearizados através da enzima de restrição SmaI (Promega) conforme orientação do laboratório de origem, e isolados com

Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico. A sonda teve nucleotídeos radioativos (³⁵S-UTP, Perkin Elmer) incorporados através de transcrição *in vitro* no nosso laboratório, usando a enzima polimerase T3 (Promega). As transcrições foram realizadas a 37 °C por 1 hora. O molde de DNA complementar utilizado na transcrição foi removido com a adição de RNAsin (Promega) e RQ1 DNAse (Promega) a 37 °C e os nucleotídeos não incorporados foram removidos através de passagem por micro-colunas de resina (Probe Quant G-50, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway – EUA). Realizado esse procedimento, foi feita a contagem de incorporação do ³⁵S-UTP na sonda em cintilador (TRI-CARB 2100 TR, Packard Instrumental Company, Meriden – EUA).

Todo material utilizado recebeu cuidados para que não houvesse contaminação com a enzima RNAse. Os cortes foram montados em lâminas estéreis com aderência eletrostática para o procedimento de hibridização *in situ* e deixados secar a temperatura ambiente. As lâminas foram acondicionadas em caixa plásticas contendo cápsulas de sílica e armazenadas em freezer a 30 °C. No dia seguinte as mesmas foram pré-tratadas, e passaram pelas seguintes etapas: 1) fixação em 4% de formaldeído em 0,1 M PBS por 5 min; 2) desproteinização com proteinase K (10 mg/mL em solução contendo tampão 0,05M EDTA e 0,1 M Tris em pH 8 por 30 min a 37 °C); 3) acetilação com solução de TEA-HCl contendo 0,25% de anidrido acético por 10 min; 4) desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 95% e 100% 1 min cada); 5) deslipidificação em xilol (15 min) e rápida reidratação em álcool etílico 100% e 95%. Após essas etapas, cada lâmina com os cortes pré-tratados recebeu 100 μ L da solução de hibridização contendo a sonda marcada com ³⁵S-UTP e uma lamínula flexível para sua cobertura, e foram incubadas a 56 °C por aproximadamente 16 h na estufa de hibridização. As lâminas foram acondicionadas em badejas de acrílico com papel filtro umedecido com 4x SSC/50% formamida.

No dia seguinte, realizou-se a pós-hibridização, sendo as lamínulas removidas por meio de banho em tampão 2X SSC, quando, então, a série foi incubada em solução com 0,002% de RNase A (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemanha) em 0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA (pH 8), durante 30 min. Posteriormente, as lâminas passaram por banhos de estringência crescente com SSC ($2 \times$ SSC a 50 °C por 1 hora, 0,2X SSC a 55 °C por 1 hora e 0,2X SSC a 60 °C por 1 hora, sempre com adição de 0,02% de 5M DTT).

Após o banho as lâminas foram transferidas para cassetes e em sala escura onde foram colocadas em contato com filme autoradiográfico (BMR-2, Kodak, Rochester, EUA). Após dois a três dias os filmes foram revelados com revelador e fixador Kodak.

Na sequência teve início o procedimento de imuno-histoquímica. Sendo as lâminas lavadas duas vezes em KPBS por dez minutos em mesa agitadora e em temperatura ambiente. Logo após as lâminas foram incubadas durante 30 min em solução KPBS + 0,3% Triton X-100 contendo 0,3% de peróxido de hidrogênio. Em seguida, foram lavados em KPBS até que todas as bolhas fossem retiradas e após essa etapa os cortes foram incubados durante 1 hora em solução KPBS, 0,3% Triton X-100 e 3% de soro normal de burro (Vector Laboratories). Posteriormente adicionamos a esta mesma solução o anticorpo anti-rFG na concentração de 1:10.000 (Chemicon#23030794), e deixados nessa solução por aproximadamente 18 h em temperatura ambiente.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas duas vezes em KPBS durante 10min cada e incubadas em uma nova solução KPBS, 0,3% Triton X-100 contendo o anticorpo secundário biotinilado na concentração de 1:200, durante 1 h. Logo após, foram realizadas 2 lavagens de 10 min cada utilizando KPBS e em seguida foram incubados numa solução contendo o complexo ABC diluído em KPBS na concentração de 1:500, durante o período de 1 h. As lâminas foram lavadas 2 vezes de 10 min em KPBS. A reação de imunoperoxidase foi realizada com 0,05% de DAB e peróxido de hidrogênio 0,03%, e a após análise visual da reação a mesma foi interrompida com KPBS, procedendo na sequência 2 lavagens em KPBS por 10 min cada.

As lâminas foram acondicionadas em caixas de lâminas com cápsula de sílica e estocadas em freezer -30 °C até o momento em que foi embebida em emulsão autoradiográfica (NBT-II, Kodak). A emulsão foi diluída em 50% de água ultrapurificada e mantida em banho térmico a 40 °C. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas cuidadosamente na emulsão e levadas a estufa com a temperatura de 37 °C durante o período de 3 h. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em caixas de lâminas com cápsula de sílica, temperatura de 4 °C, durante o período de 30 dias. Passado este período as lâminas foram reveladas em câmera escura, com revelador e fixador (Kodak) na temperatura de 16 °C.

As lâminas foram lavadas abundantemente em água por 15 min, e então desidratadas em concentrações crescentes de alcoóis, (1 vez em álcool etílico a 50%, 1 vez em álcool etílico 70%, 2 vezes em álcool etílico a 95%, 3 vezes em álcool etílico 100%, cada uma com duração de 3 min). Posteriormente os cortes foram submetidos a dois banhos de xilol, 3 min cada, seguidos da montagem das lâminas com lamínula e DPX (meio de montagem para lâminas permanentes, Aldrich). As lâminas foram observadas em microscópio de luz (Leica DMR) e fotografadas.

3.10 Método de Western Blotting

Este experimento consistiu na quantificação dos peptídeos ppMCH (precursor do MCH) e OT na PPit. Optamos por identificar o peptídeo precursor do MCH, o ppMCH, devido o peso molecular do MCH ser inferior a 6 kD, sendo inviável sua identificação pelo método de *Western Blotting*, em contrapartida, o ppMCH tem um peso molecular de 20 kD (Sandig et al., 2007). Foram utilizadas nesse experimento as PPit das ratas do grupo 3.

A técnica de *Western blotting* consiste na detecção de uma proteína em uma amostra de tecido usando um anticorpo específico. Para isso, inicialmente realizamos a extração da proteína da amostra utilizando o Kit QProteome Mammalian Protein (QIAGEN, Hilden, Germany), promovendo a formação de um lisado proteico da PPit. A separação foi realizada em centrifuga a 4 °C, 14.000 rpm, por 20 min. O conteúdo proteico total do sobrenadante isolado foi dosado pelo método de Bradford.

Após essa quantificação, para detectar a presença de ppMCH, os lisados proteicos passaram pelo processo de imunoprecipitação. Esse procedimento foi adotado devido a dificuldade em identificar o ppMCH nas amostras, sendo essa mesma dificuldade relatada por Sanding et al. (2007) que optou também em realizar a técnica de imunoprecipitação. A técnica de imunoprecipitação foi realizada conforme Mendonça e Lofti (2011). Enquanto que para a detecção de OT não foi necessária essa etapa. Foi preparado também um lisado proteico de hipotálamo e de córtex cerebelar de ratos Long-Evans para serem utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente, no experimento para identificação do ppMCH.

3.10.1 Método de Imunoprecipitação

Das amostras de PPit foram retirados o volume correspondente a 300 μ g, de proteína total conforme quantificação realizada anteriormente, e incubados com 10 μ l de soro normal de cavalo por 1 hora em gelo. Depois incubado com 20 μ l de proteína A-agarose (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) por 1 h a 4 °C, sob suave agitação. Depois as amostras foram centrifugadas (11.000 rpm) por 10 min, e o sobrenadante foi retirado e incubado com 0,4 μ g de anticorpo anti ppMCH (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) por aproximadamente 18 h a 4 °C em suave agitação. No dia seguinte as amostras foram incubadas em mais 20 μ l de proteína A-agarose por 4 horas e centrifugadas à 11.000 rpm por 10 min. Retirou-se o sobrenadante e foi colocado 100 μ l de tampão de lise RIPA (Tris-HCl ph 7,5, 1% desoxicolato de sódio, 1% triton x-100, solução Nacl 150mM e SDS 0,1%) e

retornou-se para a centrifuga (11.000 rpm) por 10 min. Repetiu-se este procedimento de lavagem por 4 vezes. O sobrenadante foi utilizado para realização da β-actina. Após a última lavagem o precipitado das amostras foi misturado com 20 µl de tampão de amostra (Tris-HCl ph 6,8, glicerol, SDS, beta mercaptoetanol e azul de bromofenol) e seguiu-se para a realização do *imunoblotting* descrito a seguir.

3.9.2 Método de Imunoblotting

Todas as amostras, para a OT (sem imunoprecipitação), para o ppMCH (com imunoprecitação) e os controles foram fervidas por 5 min acrescidas de tampão de amostra (Tris-HCL ph 6,8, glicerol, SDS, beta mercaptoetanol e azul de bromofenol) e o material foi aplicado em gel de poliacrilamida 15% (de acordo com a quantificação realizada anteriormente) e submetidos a eletroforese com corrente contínua de 100 V. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,2 µm de diâmetro) de acordo com a técnica descrita por Towbin et al. (2009). Os antígenos presentes na membrana de nitrocelulose serão submetidos à caracterização imunoenzimática.

As membranas contendo a proteína total das amostras obtidas tiveram os sítios inespecíficos bloqueados por aproximadamente 18 h em leite desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) a 5% dissolvido em TBST (solução de tampão de tris-HCL pH 7,4, NaCl e Tween 20 1%) à 4 °C. As membranas foram lavadas e incubadas com os anticorpos primários anti-ppMCH (descrito anteriormente) ou anti-OT (Abcam67457, Cambridge, USA) ambos produzidos em coelho e especifico contras antígenos de ratos na concentração de 1:1000.

Após a incubação em cada anticorpo específico, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho ou anti-camundongo (Amershan, GE Healthcare, Litle Chalfont, Buckinghamshire, Reino unido) por uma hora à temperatura ambiente sob agitação. O anticorpo secundário IgG é conjugado com a peroxidase-estreptavidina (*HRP labelled streptavidin bridge system*). Para a revelação usa-se o kit ECL-Plus (Amershan) que utiliza o luminol como substrato, depois de degradado pela enzima do anticorpo secundário, emite luz e impressiona um filme de RX T-MAT G/RA (Carestream Health Inc., Rochester, NY, EUA). As bandas dos filmes foram analisadas utilizando-se um sistema de captura de imagem Gene Snap 6.05 (SynGene-Synoptic Ltd, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) e quantificadas pelo programa Gene Tools 3.06 (SynGene). Todos os dados inicialmente foram submetidos ao teste de homogeneidade (Levene), após foram submetidos à análise de comparação *ANOVA one-way*, quando encontradas diferenças

significativas, procedeu-se à comparação das médias a partir do *post-hoc* de TUCKEY. Para todos os testes foram adotados o nível de significância de p<0,05. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa estatístico *GraphPad Prism* versão 5 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão médio (E.P.M.). Foram analisados os resultados de pelo menos 3 animais por grupo.

Posteriormente a membrana foi incubada com o anticorpo anti-ß-actina (Abcam49900, Cambridge, USA) produzido em camundongo e específico contra antígenos de ratos, na concentração de 1:2000, sendo utilizado como controle.

3.10 Método de aquisição de imagem

As lâminas foram observadas em microscópio de luz Leica DMR (Leica, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram adquiridas em câmera digital DS – Ri1 – Nikon (Digital Sight) acopladas a um computador, digitalizadas utilizando o programa NIS- Elements 3.0. Posteriormente, as mesmas receberam ajustes apenas em relação a brilho, contraste e balanço de cores e foram organizadas em figuras através do programa Adobe Photoshop CS versão 8.0.1.

Nos experimentos com imunofluorescência as lâminas foram analisadas no microscópio confocal ZEISS modelo LSM 510 (ZEISS, Carl Zeiss Microscopy, Germany), digitalizadas utilizando o programa Carls Zeiss ZEN OME (Open Microscopy Environment, 2011) utilizando o recurso Z-stack, o qual obtemos cortes digitais com espessura inferior a 1 µm. O microscópio confocal encontra-se no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP).

3.11 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do ICB/USP, sob o registro nº 070 nas fls. 88 do livro 02 em 01.07.2010.

4 RESULTADOS

A especificidade dos anticorpos utilizados foi confirmada através do experimento de imunofluorescência com controle positivo e negativo para ambos os anticorpos, anti-MCH e anti-OT (Figura 2).

Iniciamos nossos experimentos determinando se os dados já publicados por (Knollema et al., 1992; Rondini et al., 2010), com animais de outra linhagem (Sprague-Dawley) eram idênticos aos resultados do presente estudo, mas com a utilização de animais da linhagem Long-Evans.

Utilizando a técnica de dupla imunoperoxidase encontramos células imunorreativas ao MCH (MCH-ir) distribuídas ao longo de LHA e da IHy em todos animais tanto na fase diestro como nas lactantes (Figura 3). Nas lactantes, somente no 19º dia de lactação, encontramos também células MCH-ir em toda extensão da área pré-óptica medial (MPOA), núcleo periventricular (Pe) e subdivisão anterior do núcleo paraventricular (PVHa) (Figura 4).

Quanto às células OT-ir, encontramo-las principalmente no PVH e SO (Figura 3 e 5). As fibras do sistema magnocelular se projetam a partir do PVH em direção lateroventral, contornando o fórnice e se unindo as fibras do SO e seguindo pela MEi em direção PPit, formando o trato hipotálamo-hipofisário (Figura 5). As células e fibras OT-ir nas ratas Long-Evans encontram-se nos mesmos sítios descritos na literatura em ratos de outras linhagens (Brownstein et al., 1980; Rhodes et al., 1981) Na ME, principalmente na lâmina interna encontramos fibras imunorreativas tanto para MCH como para OT. Pudemos observar também uma pequena densidade de fibras MCH-ir na MEi nas ratas em fase diestro e 5° dia de lactação, enquanto que em ratas no 19° dia de lactação uma maior densidade de fibras MCH-ir (Figura 4).



Fotomicrografías de imunofluorescência mostrando o controle positivo (A e B) e negativos (A' e B') dos anticorpos primários utilizados. Em A e A' anticorpo anti-OT, em B e B' anticorpo anti-MCH. Abreviaturas: 3V - terceiro ventrículo, f - fórnice, ox - quiasma óptico, LHA - área hipotalâmica lateral, MCH - hormônio concentrador de melanina, OT - Ocitocina, PVH - núcleo paraventricular do hipotalâmo. Escala de barra: 100 µm.



Figura 3 - Localização de células MCH-ir e a OT-ir no PVH, IHy e LHA em ratas Long-Evans em fase fase diestro, 5° e 19° dias de lactação.

Fotomicrografías de campo claro mostrando o PVH, IHy e LHA em ratas em fase diestro (A), 5° dia de lactação (B) e 19° dia de lactação (C, D, E, F). Note os neurônios imunorreativos à OT no PVH (DAB - marron) (A, B, C, D e E) e os neurônios imunorreativos ao MCH (DAB/níquel - preto) na IHy (A,B,C e E) e LHA (F). Abreviaturas: 3V - terceiro ventrículo, f - fórnice, IHy - área incerta hipotalâmica, LHA - área hipotalâmica lateral, MCH - hormônio concentrador de melanina, MCH-ir - imunorreatividade ao MCH, OT - Ocitocina, OT-ir - imunorreatividade à OT, PVH - núcleo paraventricular do hipotálamo. Barra de escala:100 µm (A,B e C) e 50 µm (D, E e F).



Figura 4 - Localização de células e fibras MCH-ir e OT-ir na MPOA e ME em ratas Long-Evans em fase de diestro, 5° e 19° dias de lactação.

Fotomicrografias de campo claro da MPOA e da ME em ratas em fase diestro (A)(A'), 5° dia de lactação (B)(B') e 19° dia de lactação (C) (C'). Note a ausência de imunorreatividade ao MCH (DAB/níquel) na MPOA (A) e (B), enquanto em (C) observamos neurônios imunorreativos ao MCH (DAB/níquel) na MPOA. Note que da fase diestro para o 19° dia de lactação há um aumento da densidade de fibras imunorreativas ao MCH na MEi (A', B' e C'). Abreviaturas: 3V - terceiro ventrículo, ox - quiasma óptico, MCH - hormônio concentrador de melanina, MCH-ir - imunorreatividade ao MCH, ME - eminência mediana, MEe - lâmina externa da eminência mediana, MPOA - Área pré-óptica medial, OT - Ocitocina, OT-ir - imunorreatividade à OT, PVH - núcleo paraventricular do hipotálamo. Barra de escala: 100 μ m.



Figura 5 - Localização de células e fibras OT-ir no PVH e SO em ratas Long-Evans em fase diestro, 5º e 19º dias de lactação.

Fotomicrografias de campo claro mostrando neurônios e fibras no PVH, SO em ratas em fase diestro (A), 5º dia de lactação (B) e 19º dia de lactação (C). Note as fibras ocitocinérgicas que compõem o sistema neurossecretor magnocelular se projetando para MEi. Abreviaturas: ox - quiasma óptico, MEi - lâmina interna da eminência mediana, OT - Ocitocina, OT-ir - imunorreatividade à OT, PVH - núcleo paraventricular do hipotálamo, SO - núcleo supraóptico. Barra de escala: 100 µm.

No experimento que envolve a técnica de dupla marcação imunofluorescente com uso de microscopia confocal, observamos a distribuição das fibras MCH-ir e OT-ir, tanto na MEi como na PPit, sendo encontrado em ambos os locais uma menor densidade de fibras MCH-ir na fase diestro e no 5° dia de lactação, enquanto que uma maior densidade de fibras no 19° dia de lactação. Além disso, pudemos perceber uma aproximação entre as fibras MCH (vermelho - Alexa Fluor 594) e OT (verde - Alexa Fluor 488), entretanto, sem haver colocalização (Figura 6 e Figura 7).



Figura 6 - Localização de fibras MCH-ir e OT-ir na eminência mediana em ratas Long-Evans em fase diestro, no 5º e 19º dias de lactação.

Fotomicrografias de imunofluorescência visualizada em microscópio confocal, evidenciando a justaposição das fibras OT-ir (verde) e MCH-ir (vermelho), sem entretanto haver colocalização. Em A, B e C fotomicrografias em menor aumento da ME. Em A', B' e C' as mesmas ME em maior aumento. Note que da fase diestro para o 19° dia de lactação há um aumento do número de fibras imunorreativas ao MCH. Abreviaturas: 3V - terceiro ventrículo, ME - eminência mediana, MEe - lâmina externa da eminência mediana, MEi - lâmina interna da eminência mediana, MCH - hormônio concentrador de melanina, MCH-ir - imunorreatividade ao MCH, OT - Ocitocina, OT-ir - imunorreatividade à OT. Escala de barra: (A, B e C) 100 μm e (A', B'e C') 20.000nm.



Figura 7 - Localização de fibras MCH-ir e OT-ir na hipófise posterior em ratas Long-Evans em fase de diestro, 5° e 19° dias de lactação.

Fotomicrografías de imunofluorescência visualizada em microscópio confocal, evidenciando a justaposição das fibras OT-ir (verde) e MCH-ir (vermelho) sem entretanto haver colocalização. Em A, B e C fotomicrografias em menor aumento da PPit. Em A', B' e C' as mesmas PPit ,no entanto, em maior aumento. Note que da fase diestro para o 19º dia de lactação há um aumento da densidade de fibras MCH-ir. Abreviaturas: APit - hipófise anterior, IPit - pars intermédia, MCH - hormônio concentrador de melanina, MCH-ir - imunorreatividade ao MCH, OT - Ocitocina, OT-ir - imunorreatividade à OT. Barra de escala: (A, B e C) 100 µm e (A', B'e C') 20.000nm.

Nos experimentos com injeção intravenosa de FG encontramos células retrogradamente marcadas em regiões já conhecidas pela literatura provenientes do sistema ocitocinérgico magnocelular (Kiss, Mikkelsen, 2005; Swanson, 1987).

Nos casos com marcações satisfatórias após a realização da hibridização *in situ* e imunoperoxidase, foram observadas células retrogradamente marcadas com FG em áreas específicas como: PVH, SO, Pe e MPOA (Figura 8 e 9). Encontramos duplas marcações de células retrogradamente marcadas com FG e expressando RNAm ppMCH apenas na MPOA e na porção anterior do PVH nos animais de 19º dia de lactação (Figura 9).

Para obter mais informações da relação entre MCH e OT na fase da lactação em ratas Long-Evans, utilizamos a técnica de *Western Blotting* para quantificar os peptídeos ppMCH e OT na PPit. Os resultados estão apresentados em gráficos para os diferentes grupos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas ao ppMCH (Figura 10A) e a OT (Figura 10B). Nenhuma diferença foi observada para a β -actina entre os grupos analisados. Observamos que há um aumento significativo da quantidade do ppMCH no 19° dia de lactação em relação a fase diestro e no 5° dia de lactação. Quanto a OT observamos o inverso, sendo a quantidade de OT significativamente maior na fase diestro em relação ao 5° e ao 19° dias de lactação (Figura 10).



Figura 8 - Local de captação de FG injetado intravascularmente em ratas Long- Evans em fase diestro, 5º e 19º dias de lactação.

Fotomicrografías de epifluorescência com filtro de luz ultravioleta mostrando o local de captação do FG na PPit em ratas em fase diestro (A), 5° dia de lactação (B) e 19° dia de lactação (C). Note os terminais de neurônios com FG na PPit (setas brancas). Abreviações: APit - hipófise anterior; FG - fluorogold, IPit - pars intermédia, PPit - hipófise posterior. Barras de escala: 100 µm.



Figura 9 - Expressão do RNAm do prepro-MCH e células retrogradamente marcadas com FG na MPOA em ratas na fase diestro e no 19º dia de lactação.

Fotomicrografías de campo claro mostrando células hibridizadas com a ribossonda do prepro-MCH com ³⁵S (grãos de prata) e imunoperoxidase de células retrogradamente marcadas com FG na MPOA de ratas em fase diestro (A) e no 19° dia lactação (B). Destaque em maior aumento de células duplamente marcadas (setas) (D). E a ausência de expressão do RNAm do ppMCH e da marcação retrógrada de FG na mesma região em ratas em fase diestro (A e C). Em menor aumento podemos ver a marcação retrógrada de FG na região Pe e PVH, confirmando a presença de transporte retrógrado pelo FG (C, E e F) e a expressão do RNAm do ppMCH na IHy em ratas em fase diestro, confirmando a hibridização in situ (E). Destaque para a dupla marcação na região PVHa em ratas no 19° de lactação (F). Abreviaturas: 3V - terceiro ventrículo, ox - quiasma óptico, IHy - área incerto hipotalâmica, MCH - hormônio concentrador de melanina, MPOA - área pré-óptica medial, PVH - núcleo paraventricular do hipotálamo, Pe - núcleo periventricular. Barra de escala: $50 \,\mu$ m (A,B,C e E) e 20μ m (D e F).





Gráficos da quantificação (média de 3 animais/grupo) entre os grupos experimentais e imagens das bandas imunorreativas. Em (A) membrana da PPit incubada com anticorpo anti-ppMCH e controles negativo e positivo. Em (B) membrana da PPit incubada com anticorpo anti-OT. β - actina utilizada como controle interno. Dados expressos como média ± erro padrão.

5 DISCUSSÃO

Inicialmente analisamos a distribuição das células MCH-ir em ratas da linhagem Long-Evans, já que descrições anteriores utilizaram ratos albinos. Ratos Long-Evans possuem uma acuidade visual melhor que outras linhagens (Prusky et al., 2002). Sendo a luz um modulador exógeno capaz de interferir em núcleos hipotalâmicos via trato retino-hipotalâmico (Pinato et al., 2007), essa acuidade visual poderia influenciar em controles neuroendócrinos e, portanto, talvez em mudanças morfológicas.

Observamos que, em ratas da linhagem Long-Evans as células MCH-ir distribuem-se principalmente na LHA e IHy, corroborando trabalhos anteriores realizados em animais de outras linhagens e gêneros (Bittencourt et al., 1992), e que as descreve nas mesmas áreas, tanto nas ratas em diestro como também nas lactantes (Knollema et al., 1992; Rondini et al., 2010; Rondini et al., 2007). Encontramos também fibras MCH-ir na ME, principalmente MEi e na PPit como no trabalho de Bitercourt et al. (1992). Na PPit encontramos as fibras MCH-ir concentradas na periferia da mesma, de acordo com o trabalho de Bittencourt et al. (1992), nesse mesmo local passam as fibras OT-ir conforme trabalho de van Leeuwen (1979).

Um achado importante já descrito tanto por Knollema et al. (1992) e por Rondini et al. (2010) é a presença do RNAm do ppMCH e do peptídeo MCH no MPOA, Pe e no PVHa, durante o período lactante em ratas, principalmente no 19º dia de lactação e a ausência do mesmo em qualquer outra fase do ciclo estral. Este mesmo padrão de distribuição foi encontrado por nós em ratas da linhagem Long-Evans no presente estudo, sugerindo que o MCH presente na MPOA das ratas Long-Evans, também, possa estar envolvido no comportamento maternal, incluindo lactação como já sugerido por outros autores em trabalhos envolvendo roedores de outras linhagens (Knollema et al., 1992; Rondini et al., 2010).

Quanto à distribuição das células OT-ir no PVH e SO e as projeções das fibras OT-ir para MEi e PPit, nossos dados corroboram com os resultados obtidos por Kiss e Mikkelsen (2005) e Rhodes et al. (1981) em ratos de outros gêneros e espécies.

Nos estudos com imunoperoxidase e imunofluorescência pudemos descrever e comparar a distribuição de fibras MCH-ir e OT-ir na MEi e na PPit nas diferentes fases estudadas (diestro, 5° e 19° dias de lactação). Encontramos, tanto na MEi como na PPit uma densidade maior de fibras MCH-ir no 19° dia de lactação, em relação à fase diestro e ao 5° dia de lactação. Observamos também, pela primeira vez, que essas fibras MCH-ir encontram-se na MEi e na PPit em grande aproximação (o que poderíamos sugerir, em resolução de microscopia confocal de "justaposição") com as fibras OT-ir. Importante ressaltar que apesar dessa aproximação não há colocalização em ambos locais. De qualquer forma, essa possível

justaposição sugere alguma relação entre MCH e OT, principalmente durante o término da lactação.

Na análise das imagens pela microscopia confocal com o uso do recurso de secção digital pelo feixe de laser (Neil et al., 1997), é sugestivo a existência de algum tipo de contato entre as fibras MCH-ir e OT-ir na MEi ou na PPit, uma vez que esse corte é de aproximadamente menos de 1 µm. Caracterizar o possível contato entre fibras MCH-ir e OT-ir é de suma importância para a inferência funcional do MCH sobre a OT, uma vez que o MCH já foi descrito como um peptídeo inibitório (Gao, van den Pol, 2002), atuando pré-sinapticamente reduzindo a liberação de transmissores ou pós-sinapticamente reduzindo o potencial de membrana. Além disso, os neurônios MCH-ir na MPOA coexpressam o neurotransmissor GABA (Rondini et al., 2010), conhecido neurotransmissor inibitório. No entanto, para uma análise detalhada da relação entre as fibras MCH-ir e OT-ir na MEi e PPit faz-se necessário o uso da técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

Por outro lado, no trabalho realizado pelo grupo de Tsukamura em (2011), sobre as fibras imunorreativas a Kisspeptina e a GnRH na ME, eles também observaram uma justaposição entres as mesmas, no entanto, nas imagens da microscopia eletrônica de transmissão não encontraram nenhum contato sináptico entre as referidas fibras na ME, sugerindo que poderia existir entre elas uma transmissão do tipo "transmissão por volume" (Agnati et al., 2010). A transmissão por volume pode ocorrer quando não há formação clássica de uma zona ativa de sinapse. Nesse caso, os neuropeptídeos se difundem ao longo do espaço extracelular e quando liberados de varicosidades ou de terminais axonais podem se difundir pelo líquido extracelular promovendo um potencial de ação dependendo do grau de degradação dos mesmos por peptidases extracelulares (Fuxe et al., 2010).

Os resultados da quantificação do peptídeo ppMCH na PPit pela técnica de *Western Blotting* também vem a somar na hipótese de que o MCH possa ter alguma relação com a OT na PPit, uma vez que, observamos um aumento da quantidade do ppMCH no 19° dia de lactação em relação ao 5° dia e à fase diestro. Inversamente aos resultados da quantificação do ppMCH, observamos um aumento da quantidade de OT na fase diestro e uma diminuição no 5° e 19° dias de lactação. Esse fato é explicado pela possibilidade de armazenamento de OT na PPit e, quando necessária no momento do parto e durante a lactação, ela é secretada para a circulação e age nos respectivos locais, útero e mama (Brownstein et al., 1980; Crowley, Armstrong, 1992) . Parkes & Vale (1998) descreveram que o MCH estimula a liberação de OT pelos terminais dos neurônios neurossecretores na PPit, entretanto, a descrição foi feita em ratos machos (Sprague Dawley) e em cultura de células da hipófise posterior. Contudo, os nossos resultados indicam uma relação inversa entre a presença de ppMCH e OT na PPit, pelo menos no 19° dia de lactação. Essa aparente contradição talvez possa ser explicada pelo fato de que Parkes & Vale (1998) descreveram esse resultado em machos e em cultura de células e também pelo fato de que a OT tem funções diferentes em machos e fêmeas, e mesmo ainda, teremos que considerar que à medida que o período de lactação vai chegando ao fim os níveis de OT devem diminuir na PPit (Van Tol et al., 1988). Ainda mais, os resultados obtidos por Van Tol et al. (1988) estão em concordância com os nossos, uma vez que em seus experimentos eles verificaram que depois de 15 dias de lactação a PPit continha um teor significativamente menor de OT do que durante a fase diestro.

Quanto a injeção de FG na veia femoral observamos a presença de células retrogradamente marcadas no PVH e no SO, confirmando os dados já citados por Leng et al. (2008), Neuman (2008), Lee et al. (2009), sobre a conexão entre os neurônios neurossecretores do PVH e do SO, com a PPit, através dos axônios que transitam pela MEi (Rhodes et al., 1981). Em concordância Knollema et al. (1992) e Cvetkovic et al. (2003) descreveram células retrogradamente marcadas nos referidos núcleos hipotalâmicos após injeção intravascular de FG. Dados esses que podemos usar como confirmação da captação e transporte do FG intravascular, uma vez que na literatura a ME e a PPit são relatadas como estruturas que estão desprovidas de barreira hemato-encefálica (Ganong, 2000; Summy-Long, Kadekaro, 2001), e assim, algumas substâncias injetadas no leito intravascular se difundem para regiões do hipotálamo (Sawchenko et al., 1990).

Algo que corrobora ainda mais o envolvimento do MCH no término da lactação é a presença de células retrogradamente marcadas com FG e que expressam o RNAm do ppMCH na MPOA e na porção anterior do PVH apenas em ratas no 19° dia de lactação, algo que ainda não havia sido observado. A mesma dupla marcação ou apenas a marcação retrógrada na MPOA na foram encontradas, na fase diestro ou no 5° dia de lactação. A presença do RNAm do ppMCH na MPOA no 19° dia de lactação infere uma possível influência do MCH no comportamento maternal, uma vez que a MPOA é notoriamente conhecida como moduladora desses comportamentos, incluindo a lactação (Numan, 2006; Numan, Stolzenberg, 2009).

Outro ponto importante, é que a marcação retrograda com FG, encontrada no 19º dia de lactação e coincidente com a expressão do RNAm ppMCH nessa única janela temporal é completamente inexistente na fase diestro e no 5º dia de lactação na MPOA. Esse novo dado encontrado por nós, o qual demonstra o aparecimento e o desaparecimento de neurônios MCH-ir/RNAm ppMCH em área e tempo restritos da MPOA, sugere fortemente o surgimento

de um mecanismo de neuroplasticidade morfológica para atender as necessidades funcionais do referido período.

Nos últimos anos têm sido reconhecida a existência de plasticidade neural fisiológica e morfológica significativa em adultos vertebrados homeotérmicos (Balthazart et al., 2010). A plasticidade fisiológica geralmente refere-se a mudanças duradouras na fisiologia sináptica, que podem ocorrer após diferentes padrões de estimulação, como a que ocorre em potenciais de longo prazo (LTP) e depressão de longo prazo (LTD) (Huang, 1998; Malenka, Bear, 2004). A plasticidade morfológica refere-se a alterações mensuráveis na morfologia das células, incluindo o tamanho, o número de células, a forma da célula e os contatos entre as regiões encefálicas (Stevenson et al., 2012).

A plasticidade neural morfológica é algo bastante estudado em aves canoras (Goldman, Nottebohm, 1983) e parece estar relacionada com ciclos anuais de atividade gonadal (Stevenson et al., 2012). Os núcleos do prosencéfalo de pássaros canoros que regulam a produção vocal, "high vocal center" (HVC), influenciados por mudanças sazonais dos níveis de testosterona apresentam plasticidade neural morfológica e funcional (Ball et al., 2002; Brenowitz, 2004). A ação da testosterona no HVC modula aspectos do canto, relacionados a um comportamento usado em defesa ao território de reprodução ou como atrativo sexual ao parceiro (Meitzen et al., 2007; Nottebohm, Arnold, 1976).

Outros estudos também realizados em aves mostraram uma variação significativa de neurônios imunorreativos ao hormônio liberador de gonadotrofina 1(GnRH1) no hipotálamo de aves em fase de procriação (Dawson et al., 1985). O GnRH1 é um regulador chave do sistema neuroendócrino reprodutivo na maioria das espécies, e o sistema neuronal GnRH1 é a última etapa de processamento para o controle da secreção de gonadotrofina, sendo essencial para a fertilidade e o sucesso da reprodução (Stevenson et al., 2012). Segundo Macdougall-Shackleton et al. (2009) várias espécies de aves mostram uma variação na quantidade de neurônios imunorreativos ao GnRH1 dependendo do estado reprodutivo e estes neurônios são altamente responsivos as condições hormonais.

Nos mamíferos, a expressão de RNAm do GnRH1 e os níveis do peptídeo GnRH1 aumentam durante desenvolvimento reprodutivo (na puberdade) e atingem um platô na fase adulta (Gore et al., 1999). Poucas espécies de vertebrados são conhecidas por apresentar plasticidade nos neurônios GnRH1 na idade adulta e quando isso ocorre o grau de plasticidade morfológica é mínima.(Dawson et al., 1985).

No entanto, em mamíferos de reprodução sazonal como as ovelhas e os hamster, tem sido associada à plasticidade neural dos neurônios Kiss 1 no hipotálamo (Goodman et al.,

2010; Lehman et al., 2010). Desde a descoberta da kisspeptina (Lee et al., 1996) um número maior de diferentes isoformas foi isolado, e a forma Kiss 1 foi demonstrada como sendo a que desempenha um papel crítico na regulação neuroendócrina da reprodução em uma ampla gama de mamíferos (Clarke, Smith, 2010; Popa et al., 2008; Simonneaux et al., 2009).

A plasticidade dos neurônios nos núcleos HVC em aves canoras e o aumento da imunorreatividade ao GnRH1 e Kiss1 em aves e mamíferos, respectivamente, durante a fase reprodutiva, mostram que a plasticidade neural possa ser regulada por hormônios envolvidos em comportamentos reprodutivos, em alterações ambientais e no dimorfismo sexual. Portanto, podemos inferir que estados fisiológicos como a lactação também podem estimular a formação de novos neurônios, e com a expressão temporal de hormônios que, como visto na MPOA de ratas no 19º dia de lactação, pode contribuir para o processo de finalização desse comportamento.

Os nossos resultados, portanto, indicam que a origem das fibras MCH-ir encontradas na MEi e na PPit está na MPOA e que esta apresenta um surgimento de neurônios possivelmente relacionados à fase de lactação, assim como, o aumento da densidade das fibras MCH-ir que se projetam para a PPit através da MEi em justaposição com fibras OT-ir, e a relação inversa entre a quantidade do peptídeo ppMCH e OT na PPit somente no 19º dia de lactação em ratas Long-Evans, reforçam a hipótese da atuação de um peptídeo sobre o outro no período final da lactação.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, e frente aos objetivos propostos, podemos concluir que:

- a) ocorre a justaposição entre as fibras MCH-ir e OT-ir na MEi e na PPit em ratas Long-Evans no 19º dia de lactação;
- b) há um aumento da densidade de fibras MCH-ir na MEi e PPit no 19º dia de lactação;
- c) existe uma relação inversa entre a quantidade do peptídeo ppMCH e OT na PPit no 19º dia de lactação;
- d) a origem das fibras MCH-ir que transitam pela MEi em direção a PPit na fase de lactação está na MPOA;
- e) existe o surgimento de neurônios na MPOA que expressam o RNAm do ppMCH e que são retrogradamente marcados no 19º dia de lactação, e que não aparecem fora desse período.

REFERÊNCIAS¹

Agnati LF, Guidolin D, Guescini M, Genedani S, Fuxe K. Understanding wiring and volume transmission. Brain Res Rev. 2010;64(1):137-59.

Bahjaoui-Bouhaddi M, Fellmann D, Griffond B, Bugnon C. Insulin treatment stimulates the rat melanin-concentrating hormone- producing neurons. Neuropeptides. 1994;27(4):251-8.

Baker BI. Melanin-concentrating hormone updated - functional considerations. Trends in Endocrinology Metabolism. 1994;5(3):120-6.

Ball GF, Riters LV, Balthazart J. Neuroendocrinology of song behavior and avian brain plasticity: multiple sites of action of sex steroid hormones. Front Neuroendocrinol. 2002;23(2):137-78.

Balonan LC, Sheng HP. Perinatal feedings adversely affect lipogenic activities but not glucose handling in adult rats. Pediatr Res. 2000;48(5):668-73.

Balthazart J, Charlier TD, Barker JM, Yamamura T, Ball GF. Sex steroid-induced neuroplasticity and behavioral activation in birds. Eur J Neurosci. 2010;32(12):2116-32.

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

Bittencourt JC, Presse F, Nahon JL, Peto CA, Vale W, Sawchenko PE. Distribution of prepromelanin-concentrating hormone-derived peptides and mRNA in the rat brain. Society for Neuroscience. 1990;16(1):361.

Bluet-Pajot MT, Presse F, Voko Z, Hoeger C, Mounier F, Epelbaum J, Nahon JL. Neuropeptide-E-I antagonizes the action of melanin-concentrating hormone on stress-induced release of adrenocorticotropin in the rat. Journal of Neuroendocrinology. 1995;7:297-303.

Brenowitz EA. Plasticity of the adult avian song control system. Ann N Y Acad Sci. 2004;1016:560-85.

Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. Science. 1980;207(4429):373-8.

Buhimschi CS. Endocrinology of lactation. Obstet Gynecol Clin North Am. 2004;31(4):963-79, xii.

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

¹De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requeriments for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org.

Castellano C, Oliverio A. Early malnutrition and postnatal changes in brain and behavior in the mouse. Brain Res. 1976;101(2):317-25.

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

Clarke IJ, Smith JT. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) in the seasonality of reproduction in sheep. Soc Reprod Fertil Suppl. 2010;67:159-69.

Cramer CP, Thiels E, Alberts JR. Weaning in rats: I. Maternal behavior. Dev Psychobiol. 1990;23(6):479-93.

Crowley WR, Armstrong WE. Neurochemical regulation of oxytocin secretion in lactation. Endocr Rev. 1992;13(1):33-65.

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

Dawson A, Follett BK, Goldsmith AR, Nicholls TJ. Hypothalamic gonadotrophin-releasing hormone and pituitary and plasma FSH and prolactin during photostimulation and photorefractoriness in intact and thyroidectomized starlings (Sturnus vulgaris). J Endocrinol. 1985;105(1):71-7.

Elias CF, Bittencourt JC. Diencephalic origins of MCH-immunoreactive projections to medial septum/diagonal band complex and spinal cord using two retrograde fluorescent tracers. Resumos da Sociedade Biologia Experimental. 1993;8:56.

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

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

Elmquist JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. Physiol Behav. 2001;74(4-5):703-8.

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

Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. Cell. 1998;92(4):437-40.

Fox SR, Smith MS. The suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion during lactation in the rat. Endocrinology. 1984;115(6):2045-51.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiol Rev. 2000;80(4):1523-631.

Fuxe K, Dahlstrom AB, Jonsson G, Marcellino D, Guescini M, Dam M, Manger P, Agnati L. The discovery of central monoamine neurons gave volume transmission to the wired brain. Prog Neurobiol. 2010;90(2):82-100.

Ganong WF. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2000;27(5-6):422-7.

Gao XB, van den Pol AN. Melanin-concentrating hormone depresses L-, N-, and P/Q-type voltage-dependent calcium channels in rat lateral hypothalamic neurons. J Physiol. 2002;542(Pt 1):273-86.

Giovenardi M, de Azevedo MS, da Silva SP, Hermel Edo E, Gomes CM, Lucion AB. Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. Physiol Behav. 2005;86(1-2):209-17.

Goldman SA, Nottebohm F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983;80(8):2390-4.

Goodman RL, Jansen HT, Billings HJ, Coolen LM, Lehman MN. Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. J Neuroendocrinol. 2010;22(7):674-81.

Gore AC, Roberts JL, Gibson MJ. Mechanisms for the regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the developing mouse. Endocrinology. 1999;140(5):2280-7.

Grattan DR. The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. Prog Brain Res. 2001;133:153-71.

Herbison AE, Heavens RP, Dye S, Dyer RG. Acute action of oestrogen on medial preoptic gamma-aminobutyric Acid neurons: correlation with oestrogen negative feedback on luteinizing hormone secretion. J Neuroendocrinol. 1991;3(1):101-6.

Huang EP. Synaptic plasticity: going through phases with LTP. Curr Biol. 1998;8(10):R350-2.

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

Kiss A, Mikkelsen JD. Oxytocin--anatomy and functional assignments: a minireview. Endocr Regul. 2005;39(3):97-105.

Knollema S, Brown ER, Vale W, Sawchenko PE. Novel Hypothalamic and Preoptic Sites of Prepro-Melanin-Concentrating Hormone Messenger Ribonucleic Acid and Peptide Expression in Lactating Rats. J Neuroendocrinol. 1992;4(6):709-17.

Kobayashi H, Matsui T, Ishii S. Functional electron microscopy of the hypothalamic median eminence. Int Rev Cytol. 1970;29:281-381.

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

Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH, Young WS, 3rd. Oxytocin: the great facilitator of life. Prog Neurobiol. 2009;88(2):127-51.

Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. J Natl Cancer Inst. 1996;88(23):1731-7.

Lehman MN, Ladha Z, Coolen LM, Hileman SM, Connors JM, Goodman RL. Neuronal plasticity and seasonal reproduction in sheep. Eur J Neurosci. 2010;32(12):2152-64.

Leng G, Meddle SL, Douglas AJ. Oxytocin and the maternal brain. Curr Opin Pharmacol. 2008;8(6):731-4.

Lincoln DW, Paisley AC. Neuroendocrine control of milk ejection. J Reprod Fertil. 1982;65(2):571-86.

Macdougall-Shackleton SA, Stevenson TJ, Watts HE, Pereyra ME, Hahn TP. The evolution of photoperiod response systems and seasonal GnRH plasticity in birds. Integr Comp Biol. 2009;49(5):580-9.

Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. Neuron. 2004;44(1):5-21.

Mann PE, Bridges RS. Lactogenic hormone regulation of maternal behavior. Prog Brain Res. 2001;133:251-62.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Braz J Biol. 2002;62(4A):609-14.

Meitzen J, Perkel DJ, Brenowitz EA. Seasonal changes in intrinsic electrophysiological activity of song control neurons in wild song sparrows. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. 2007;193(6):677-83.

Mendonca PO, Lotfi CF. The proliferative effect of synthetic N-POMC(1-28) peptides in rat adrenal cortex: a possible role for cyclin E. Mol Cell Endocrinol. 2011;336(1-2):156-61.

Miller CL, Hruby VJ, Matsunaga TO, Bickford PC. Alpha-MSH and MCH are fuctional antagonists in a CNS auditory gating paradigm. Peptides. 1993;14:431-40.

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

Monzon ME, Varas MM, De Barioglio SR. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. Peptides. 2001;22(7):1043-7.

Nahon JL. The melanin-concentrating hormone: from the peptide to the gene. Crit Rev Neurobiol. 1994;8(4):221-62.

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

Neil MA, Juskaitis R, Wilson T. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. Opt Lett. 1997;22(24):1905-7.

Neumann ID. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. J Neuroendocrinol. 2008;20(6):858-65.

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

Nottebohm F, Arnold AP. Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. Science. 1976;194(4261):211-3.

Numan M. Maternal behavior. In: Neill JD, editor. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Amsterdan: Elsevier Science and Technology; 2006. p. 1921-93.

Numan M, Stolzenberg DS. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. Front Neuroendocrinol. 2009;30(1):46-64.

Oliverio A. Genetic and biochemical analysis of behavior in mice. Prog Neurobiol. 1975;3:193-215.

Page RB. Anatomy of the hypothalamus-hypophysial complex. In: Neill JD, editor. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Amsterdan: Elsevier science and Technology; 2006. p. 1309 -413.

Parkes DG, Vale W. Contrasting actions of melanin-concentratin hormone and neuropeptide-E-I on posterior pituitary function. New York Academy of Sciences. 1993;680:588-90.

Pinato L, Allemandi W, Abe LK, Frazao R, Cruz-Rizzolo RJ, Cavalcante JS, Costa MS, Nogueira MI. A comparative study of cytoarchitecture and serotonergic afferents in the suprachiasmatic nucleus of primates (Cebus apella and Callithrix jacchus) and rats (Wistar and Long Evans strains). Brain Res. 2007;1149:101-10.

Popa SM, Clifton DK, Steiner RA. The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. Annu Rev Physiol. 2008;70:213-38.

Presse F, Nahon JL. Differential regulation of melanin-concentrating hormone gene expression in distinct hypothalamic areas under osmotic stimulation in rat. Neuroscience. 1993;55(3):709-20.

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

Prusky GT, Harker KT, Douglas RM, Whishaw IQ. Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. Behav Brain Res. 2002;136(2):339-48.

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

Rhodes CH, Morrell JI, Pfaff DW. Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin, and vasopressin. J Comp Neurol. 1981;198(1):45-64.

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

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

Sandig H, McDonald J, Gilmour J, Arno M, Lee TH, Cousins DJ. Human Th2 cells selectively express the orexigenic peptide, pro-melanin-concentrating hormone. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(30):12440-4.

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

Sawchenko PE, Arias C, Bittencourt JC. Inhibin beta, somatostatin, and enkephalin immunoreactivities coexist in caudal medullary neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. J Comp Neurol. 1990;291(2):269-80.

Schwartz MW. Brain pathways controlling food intake and body weight. Exp Biol Med (Maywood). 2001;226(11):978-81.

Simonneaux V, Ansel L, Revel FG, Klosen P, Pevet P, Mikkelsen JD. Kisspeptin and the seasonal control of reproduction in hamsters. Peptides. 2009;30(1):146-53.

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

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

Stevenson TJ, Hahn TP, MacDougall-Shackleton SA, Ball GF. Gonadotropin-releasing hormone plasticity: a comparative perspective. Front Neuroendocrinol. 2012;33(3):287-300.

Summy-Long JY, Kadekaro M. Role of circumventricular organs (CVO) in neuroendocrine responses: interactions of CVO and the magnocellular neuroendocrine system in different reproductive states. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2001;28(7):590-601.

Swanson LW. The hypothalamus. In: Björklund A, Hökfelt T, Swanson LW, editors. Handbook of chemical neuroanatomy. Vol.5 Integrated systems of the CNS.Elsevier Science Publisher; 1987. p. 1-124.

Towbin H. Origins of protein blotting. Methods Mol Biol. 2009;536:1-3.

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

Tsukamura H, Maeda K. Non-metabolic and metabolic factors causing lactational anestrus: rat models uncovering the neuroendocrine mechanism underlying the suckling-induced changes in the mother. Prog Brain Res. 2001;133:187-205.

Tucker HA. Endocrinology of lactation. Semin Perinatol. 1979;3(3):199-223.

Uenoyama Y, Inoue N, Pheng V, Homma T, Takase K, Yamada S, Ajiki K, Ichikawa M, Okamura H, Maeda KI, Tsukamura H. Ultrastructural evidence of kisspeptin-gonadotrophinreleasing hormone (GnRH) interaction in the median eminence of female rats: implication of axo-axonal regulation of GnRH release. J Neuroendocrinol. 2011;23(10):863-70.

van Leeuwen FW, de Raay C, Swaab DF, Fisser B. The localization of oxytocin, vasopressin, somatostatin and luteinizing hormone releasing hormone in the rat neurohypophysis. Cell Tissue Res. 1979;202(2):189-201.

Van Tol HH, Bolwerk EL, Liu B, Burbach JP. Oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat during the estrous cycle, pregnancy, and lactation. Endocrinology. 1988;122(3):945-51.

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

Voogt JL. Control of hormone release during lactation. Clin Obstet Gynaecol. 1978;5(2):435-55.

Wade GN, Schneider JE, Li HY. Control of fertility by metabolic cues. Am J Physiol. 1996;270(1 Pt 1):E1-19.

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

Woods SC, D'Alessio DA. Central control of body weight and appetite. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(11 Suppl 1):S37-50.

APÊNDICE – Artigo de periódico