UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO I. B.

i.

JOÃO CLEBER THEODORO DE ANDRADE

"SISTEMA NEUROPEPTIDÉRGICO DO HORMÔNIO CONCENTRADOR

DE MELANINA E DA OREXINA A NO NÚCLEO MOTOR DORSAL DO

NERVO VAGO EM RATO"

_s(c éx€	mplar corres	sponde à	redaçã: ma
da lese		pelo(a)	candidato (a)
good	Concertainte	(Criteren
e sprova	da pala Con	issão Ju	ulgadora
C oprovo	ale pare Jon	13500 31	algauore.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti Co-Orientador: Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

An24s	Andrade, João Cleber Theodoro de Sistema neuropeptidérgico do hormônio concentrador de melanina e da orexinia A no núcleo motor dorsal do nervo vago em rato / João Cleber Theodoro de Andrade. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.
	Orientadores: Cláudio Aparecido Casatti, Roelf Justino Cruz Rizzolo. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biología.
	 Sistema digestivo. Hipotálamo. Neuropeptídeos. Rato. Nervo vago. Casatti, Cláudio Aparecido. Rizzolo, Roelf Justino Cruz. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
	(scs/ib)

Título em inglês: Melanin-concentrating hormone and orexin A neuropeptidergic systems in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in rat.

Palavras-chave em inglês: Digestive system; Hypothalamus; Neuropeptides; Rat; Vagus nerve. Área de concentração: Biologia Celular e Estrutural.

Titulação: Doutor em Anatomia.

Banca examinadora: Cláudio Aparecido Casatti, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Antonio de Castro Rodrigues, Jesus Carlos Andreo, Jair de Campos Soares. Data da defesa: 27/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia.

Campinas, 27 de fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti (Orientador)

Prof. Dr. Jair de Campos Soares

Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Prof. Dr. José Meciano Filho

Profa. Dra. Elaine Minatel

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Junior



Assinatura

Assinatura

Assinatura

iii

À minha esposa Edilene, meus filhos Beatriz e João Kleber

DEDICO

Vocês são a razão de tudo.

Aos meus pais João Theodoro de Andrade e Dirce Branco de Andrade Aos meus irmãos

DEDICO

Um de seus sonhos se realiza.

Ao Sr. Egídio e Sra. Odete

DEDICO

Vocês que nas minhas ausências familiares,

cuidaram de minha família.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, Nosso Senhor Jesus Cristo, que com suas ações silenciosas sempre se faz presente em minha vida e de minha família. Infeliz daquele que não te percebe senhor.

Existe um provérbio chinês que diz:

"Não andes na minha frente, eu poderei não te seguir, não andes atrás de mim, eu não saberei te conduzir. Anda ao meu lado, e seremos sempre amigos"

Fazendo uso destas palavras, prezado amigo, professor e orientador **Dr. Cláudio Aparecido Casatti,** a você que, por sua infinita sabedoria, poderia caminhar a minha frente, sempre fez questão de caminhar ao meu lado neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários André Luis Mattos Piedade, Sandra Aparecida dos Santos Pinheiro e Ilda de Araújo Teixeira do Departamento de Ciências Básicas – Disciplina de Histologia e Embriologia Humana (FOA-UNESP-Araçatuba) pela atenção dispensada nos momentos do meu trabalho de tese.

Às estagiárias Daniella Sabino Batagello e Kelly Regina Torres, ao estagiário Francisco Becker Junior, futuros cirurgiões dentistas da FOA-UNESP, por colaborar em algumas rotinas de laboratório. Enquanto aprenderam, também me ajudaram, por isso lhes sou imensamente grato.

Aos amigos Miguel A. Xavier de Lima, Rodrigo A. Fernandes, ao casal Sílvio Eduardo Doretto e Letícia M. Doretto, ao casal Cláudio A. Casatti, Karina V. Casatti e seus filhos pela hospitalidade em suas residências. Saibam que minha casa sempre estará à disposição.

A todos os professores do Departamento de Ciências Básicas – Anatomia, Histologia e Embriologia Humana da FOA-UNESP, pela simplicidade com que me acolheram e pelos auxílios prestados durante o desenvolvimento de meu trabalho de tese.

Ao professor Dr. Roelf J. Cruz Rizzolo do Departamento de Ciências Básicas – Disciplina de Anatomia Humana da FOA-UNESP, pela co-orientação de meu trabalho de tese, durante a ausência do Professor Dr. Cláudio A. Casatti. À Sra. Liliam Alves Senne Penagio, secretária do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural - Área de Concentração Anatomia, do Instituto de Biologia da UNICAMP, que sempre dedicada e atenciosamente, atendeu as nossas solicitações.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural - Área de Concentração Anatomia, do Instituto de Biologia da UNICAMP, Dra. Laurecir Gomes e ex-coordenadora Dra. Maria Julia Marques.

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural - Área de Concentração Anatomia, do Instituto de Biologia da UNICAMP, por proporcionar condições de alcançar mais um nível em minha formação.

Ao amigo Professor Dr. Alexandre R. P. Ambrozin pelas extensas conversas e pelos estímulos prestados.

Aos amigos do laboratório de Anatomia, Biologia e informática da Faculdade Anhanguera Educacional de Bauru.

A FAPESP pelos subsídios provenientes do auxílio à pesquisa 99/12629-1 e 99/10236-2.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIAÇÕES	03
RESUMO	05
ABSTRACT	06
1. INTRODUÇÃO	07
1.1. O sistema neuropeptidérgico do hormônio concentrador de melanina (MCH)	07
1.1.1. Funções do hormônio concentrador de melanina	11
1.2. O sistema neuropeptidérgico da Orexina A (OXA)	13
1.2.1. Funções da orexina A (OXA)	16
1.3. O núcleo motor dorsal do nervo vago (DMV)	17
2. JUSTIFICATIVAS	24
3. OBJETIVOS	25
3.1. OBJETIVO GERAL	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
A MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Animais a procedimentos cirúrgicos	20
4. 1. Animais e procedimentos ciruígicos	20
4.2. Penusao transcardiaca e processamento histologico	20
4.3. Identificação das libras e terminais nervosos OAA-ir ou MCH-ir no Diviv pelo	
método da imunoperoxidase indireta com intensificação pela Ag/Au	29
4.4. Identificação das fibras e terminais nervosos OXA-ir ou MCH-ir nos neurônios	
do DMV que inervam as paredes ventrais do esôfago abdominal, do estômago	
e do segmento inicial do duodeno pelo método da dupla imunoperoxidase indireta	32
4.5. Localização das projeções diencefálicas OXA-ir ou MCH-ir para o DMV	37
	40
	······································

5.1. Identificação das fibras e terminais nervosos OXA-ir ou MCH-ir no DMV	42
5.1.1. Coloração de Nissl	42
5.1.2. Imunoistoquímica para identificação de fibras e terminais nervosos OXA-ir	
ou MCH-ir no DMV seguido de intensificação com Ag/Au	44
5.2. Identificação das fibras e terminais nervosos OXA ou MCH nos neurônios do	
DMV que inervam as paredes ventrais do esôfago abdominal, estômago e	
segmento inicial do duodeno pelo método da dupla imunoperoxidase indireta	49
5.3. Localização das projeções diencefálicas OXA ou MCH para o DMV	56
5.3.1. Locais de deposição do traçador neuronal retrógrado no DMV	56
5.3.2. Aferências diencefálicas para o DMV	58
6. DISCUSSÃO	61
6.1. Considerações iniciais	61
6.2. O núcleo motor dorsal do nervo vago	62
6.3. Padrão de inervação OXA e MCH no núcleo motor dorsal do nervo vago	64
6.4. Interação entre terminais nervosos OXA-ir ou MCH-ir com neurônios do DMV	
que inervam as paredes ventrais do esôfago abdominal, estômago e segmento	
inicial do duodeno	74
6.5. Aferências diencefálicas OXA-ir ou MCH-ir para o DMV	81
7. CONCLUSÕES	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
9. Declaração referente à Bioética e Biossegurança	126
9.1. Parecer da comissão de Ética na Experimentação Animal	127

LISTA DE ABREVIAÇÕES

- 3V terceiro ventrículo
- 4V quarto ventrículo
- cc canal central da medula
- CTb toxina colérica
- DMV núcleo motor dorsal do nervo vago
- duo duodeno
- eso esôfago
- est estômago
- f fórnix
- hMCH hormônio concentrador de melanina humano
- IC cápsula interna
- icv intracerebroventricular
- KPBS tampão fosfato de potássio em salina
- LHA área hipotalâmica lateral
- LHAd parte dorsal da área hipotalâmica lateral
- MCH hormônio concentrador de melanina
- MCH-ir imunorreativo ou imunorreatividade ao MCH
- MCH-R1 receptor 1 para o hormônio concentrador de melanina
- MCH-R2 receptor 2 para o hormônio concentrador de melanina
- NANC não adrenérgico não colinérgico
- NAS sulfato de amônio e níquel
- NOS óxido nítrico sintase
- NTS núcleo do trato solitário
- OXA orexina A
- OXA-ir imunorreativo ou imunorreatividade a orexina A
- OXA-R1 receptor 1 para orexina A
- OXB-R2 receptor 2 para orexina B
- PaMP subnúcleo parvocelular medial do núcleo paraventricular do hipotálamo

PaPo - parte posterior do núcleo paraventricular do hipotálamo

- PB tampão fosfato de sódio
- PST núcleo pré-parasubtalâmico
- SoIIM subnúcleo intermédio do núcleo do trato solitário
- SoIM subnúcleo medial do núcleo do trato solitário
- VIP- peptídeo intestinal vasoativo
- XII núcleo motor do nervo hipoglosso
- ZI zona incerta
- α-MSH α-hormônio estimulador de melanócitos

RESUMO

O hormônio concentrador de melanina (MCH) e a orexina A (OXA) são neuromediadores expressos em neurônios distribuídos no diencéfalo, principalmente na área hipotalâmica lateral, que emitem projeções para inúmeras regiões do neuroeixo. Esses neuropeptídeos exercem potente ação orexigênica, estimulando a ingestão alimentar e o controle do balanço energético.

Em vista disso, propusemos analisar esses sistemas neuropeptidérgicos no núcleo motor dorsal do nervo vago, um importante grupamento neuronal pré-motor parassimpático responsável pelas modulações da motilidade e secreção do tubo gastrointestinal, que indiretamente colaboram na ingestão alimentar. Para esses propósitos, foram empregados os métodos de transporte neuronal retrógrado e imunoistoquímica.

Os principais dados advindos desse estudo neuroanatômico permite concluir que o núcleo motor dorsal do nervo vago apresenta uma distribuição heterogênea da inervação imunorreativa a OXA (OXA-ir) e ao MCH (MCH-ir), com preponderância da inervação OXA-ir. Os neurônios desse núcleo parassimpático que enviam fibras nervosas para a parte abdominal do esôfago, estômago e segmento proximal do duodeno, recebem inúmeros contatos morfológicos dos terminais nervosos OXA-ir ou ao MCH-ir, sugestivos de contatos sinápticos. Finalmente, as aferências diencefálicas OXA-ir ou ao MCH-ir para o DMV, foram elucidadas, revelando que as partes dorsais e laterais da área hipotalâmica lateral são os principais locais de origem dessa inervação neuropeptidérgica.

ABSTRACT

Melanin-concentrating hormone (MCH) and orexin-A (OXA) are neuromediators expressed in neurons distributed in the diencephalum, mainly in the lateral hypothalamic area, projecting nerve fibers to several parts of the central nervous system. These neuropeptides exert potent orexigenic activity, increasing feeding and controlling the energetic balance.

Consequently, these neuropeptidergic systems were evaluated in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve, a fundamental premotor parasympathetic nucleus that modulates the motility and secretion of the gastrointestinal tract, indirectly collaborating in the feeding behaviour. For these purposes retrograde neuronal tracing and immunohistochemistry methods were used.

The main results from this neuroanatomical study showed that the dorsal motor nucleus of the vagus nerve exhibits a heterogeneous rostro-caudal MCH- or OXA-innervation patterns, being the latter more significant. Parasympathetic neurons that send nerve fibers to subdiafragmatic esophagus, stomach and proximal duodenum receive MCH- or OXA-immunoreactive nerve endings like synapses. Finally, the MCH or OXA-immunoreactive diencephalic afferents to dorsal motor nucleus of the vagus nerve were elucidated. These afferents are mainly from dorsal and lateral parts of the lateral hypothalamic area.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O sistema neuropeptidérgico do hormônio concentrador de melanina (MCH)

A primeira citação na literatura sobre a possível existência de um hormônio concentrador de melanina (MCH), antagônico ao hormônio estimulador de melanócitos (α -MSH), ocorreu devido a uma interpretação indireta. Nesse estudo experimental no qual foi realizada uma lesão hipofisária em anfíbios, o que resultou na inibição da estimulação dos melanóforos em induzir a concentração de seus grãos de melanina levando a perda de sua tonalidade pálida (Hogben e Slome, 1936).

Na década de 50, novamente surgiram estudos indicando a possível existência do MCH em peixes (Enami, 1955; Imai, 1958), cuja bioatividade foi comprovada, posteriormente, na hipófise de salmão (Rance e Baker, 1979; Baker e Rance, 1983). Em 1983, o MCH foi isolado e sequenciado a partir da hipófise de salmão (Kawauchi et al., 1983). Nesse estudo, foi verificado que o MCH do salmão é constituído de 17 aminoácidos (Heptadecapeptídeo) de conformação cíclica pela presença da ponte dissulfídica entre os aminoácidos Cis (5) - Cis (14), composto pela seguinte sequência: Asp-Tre-Met-Arg-Cis-Met-Val-Gli-Arg-Val-Tir-Arg-Pro-Cis-Trp-Glu-Val (Kawauchi, et al., 1983).

Em prosseguimento, vários estudos levantaram a hipótese da presença do MCH em mamíferos, particularmente em ratos (Skofitsch et al., 1985; Naito et al., 1988). Estudos realizados por Nahon et al. (1989) e Bittencourt et al. (1992) mostraram que o MCH é um nonadecapeptídeo. Esses estudos também verificaram que o RNAm do pré-pro-MCH codifica outros neuropeptídeos, denominados de ácido glutâmico isoleucina (NEI) e ácido glutâmico glicina (NGE). Os neuropeptídeos MCH e NEI são amplamente co-expressados nos pericários localizados na área hipotalâmica lateral, zona incerta medial, núcleo tuberomamilar dorsomedial e, discretamente no tubérculo olfatório e formação reticular pontina paramediana (Bittencourt et al., 1992). Enquanto também é expresso no núcleo tegmental látero-dorsal caudal em ratas e, em algumas áreas da região pré-óptica em fêmeas lactantes (Knollema et al., 1992; Rondini et al., 2007).

O sequenciamento do MCH demonstrou que se tratava de um nonadecapeptídeo (19 aminoácidos), de conformação cíclica pela presença da ponte dissulfídica entre os aminoácidos Cis (7) – Cis (16) e composto pela seguinte sequência: Asp-Phe-Asp-Met-Leu-Arg-Cis-Met-Leu-Gli-Arg-Val-Tir-Arg-Pro-Cis-Trp-Gln-Val, cuja localização estava limitada ao diencéfalo (Naito et al., 1988; Nahon et al. 1989; Vaughan et al., 1989).

Presse et al. (1990) analisaram a estrutura do pré-pro-MCH de humano e verificaram que este também resulta na tradução do neuropeptídeo cíclico, o hormônio

concentrador de melanina (hMCH), além de dois outros neuropeptídeos, denominados de NEI e NGE, com elevada homologia entre o rMCH e hMCH (81%).

Os neurônios imunorreativos ao MCH (MCH-ir) enviam projeções distribuídas em boa parte do neuroeixo, com áreas que se destacam em função da maior densidade de inervação, tais como, claustrum, córtex piriforme, hipocampo, núcleo septal medial, núcleo da banda diagonal de broca, núcleo intersticial do leito da estria terminal, área tegmental ventral, núcleo rombóide do tálamo, zona incerta, núcleos periventricular do hipotálamo, núcleo mamilar medial e tuberomamilar, área pré-óptica lateral, substância inonimada, núcleo do trato solitário e substância cinzenta periaquedutal (Bittencourt et al., 1992).

Em humanos, a distribuição anatômica de neurônios MCH-ir é marcada por descrições demasiadamente simplificadas, sendo mencionado neurônios MCH-ir na região periventricular e perifornicial com pequeno contingente de fibras na eminência mediana e pedúnculo hipofisário (Viale et al., 1997). Elias et al. (1998) encontraram pericários distribuídos na região perifornicial dorsalmente ao núcleo ventromedial do hipotálamo posterior, área hipotalâmica lateral, zona incerta (porção rostral) e pequeno grupamento entre a coluna do fórnix e o terceiro ventrículo. As fibras MCH-ir estavam emitindo projeções, principalmente, para o giro do cíngulo, ínsula, amígdala e hipocampo. Na área hipotalâmica lateral foram identificados dois grupos de células que co-expressam o MCH, CART e neurocinina (NK3) ou apenas MCH. Os neurônios que expressam o MCH enviam projeções descendentes para a medula espinal, enquanto os que co-expressam MCH, CART e NK3 enviam projeções ascendentes para todas as áreas do telencéfalo (Cvetkovic et al., 2004; Nahon, 2006).

O receptor do MCH é um membro da família dos receptores acoplados a proteína G (G protein-coupled receptor – GPCR), composto por uma sequência de 353 aminoácidos que atravessam a membrana plasmática sete vezes, sendo denominado de MCH-R1 (Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999). Os trabalhos de Brown et al., (1990) e Baker et al., (1990), mostraram que a sequência do anel peptídico entre os aminoácidos 5 e 14 é a mais importante para a interação com o receptor. Esses receptores apresentam distribuição pelo sistema nervoso central e, frequentemente, coincide com as áreas de densa inervação por fibras e terminais MCH-ir (Hervieu et al., 2000).

No hipotálamo, elevada expressão de MCH-R1-ir é encontrado no núcleo ventromedial e dorsomedial, regiões relacionados com a ingestão alimentar (Hervieu et al., 2000; Kokkotou et al., 2001).

Outro receptor (MCH-R2), inicialmente identificado em seres humanos (Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999; An et al., 2001; Hill et al., 2001; Morri et al., 2001; Rodriguez et al., 2001; Sailer et al., 2001) e posteriormente em peixes (Logan et

al., 2003), possui apenas 38% de homologia em relação ao MCH-R1 e sua expressão está restrita ao córtex, hipocampo, amígdala e hipotálamo (Hill et al., 2001; Rodriguez et al., 2001; Wang et al., 2001). Este receptor esta relacionado exclusivamente com a proteína que permite o transporte de cálcio para o meio intracelular (Hervieu et al., 2000) e não é expresso em ratos (Tan et al., 2002).

De acordo com Borowsky et al. (2002) e Shearman et al. (2003), o MCH-R1 é um dos mais promissores alvos para o tratamento da obesidade, uma vez que a administração crônica de antagonistas ao MCH-R1 resultaram em significante redução da ingestão alimentar e consequente diminuição do peso corporal.

1.1.1. Funções do hormônio concentrador de melanina

Com relação às observações fisiológicas, este peptídeo está envolvido em várias funções tais como, pigmentação de peixes, anfíbios e répteis atuando como antagonista do hormônio estimulador de melanócitos (α -MSH) (Kawauchi et al., 1983), regulação da reprodução e funções maternas (Knollema et al., 1992; Gonzalez et al., 1997; Murray et al., 2000, Tsukamura et al., 2000; Chiochio et al., 2001; Griffond e Baker, 2002) regulação do hormônio adrenocorticotrópico - ACTH (Bluet-Pajot et al., 1995), regulação osmótica (Presse e Nahon, 1993; Griffond e Baker, 2002), regulação de água (Presse et al., 1996; Griffond e Baker, 2002; Clegg et al., 2003;

Morens et al., 2005), regulação do sono paradoxal (Verret et al., 2003), modulação da memória (Monzon et al., 1999), integração do circuito sensório-motor (Miller et al., 1993; Knigge et al., 1997), integração dos processos associados com resposta emocional e cognição (Baker, 1994; Nahon, 1994). Recentemente tem sido sugerido que o MCH atua sinergicamente com a orexina A (OXA) na regulação do estado de atividade cerebral relacionada aos comportamentos orientados para a recompensa (Adamantidis e de Lecea, 2008).

Em mamíferos, vários estudos têm demonstrado que o MCH participa no controle energético (Presse et al., 1996; Qu et al., 1996; Flier e Maratos-Flier, 1998), sendo um potente neuropeptídeo orexigênico (Rossi et al., 1997; Tritos e Maratos-Flier, 1999), participando da regulação do peso corpóreo (Tritos e Maratos-Flier, 1999; Kokkotou et al., 2001). Por outro lado, a deficiência do MCH está associada à diminuição do peso corpóreo e perda de tecido adiposo em camundongo (Shimada et al., 1998).

A importante função do MCH e seu receptor (MCH-R1) na regulação do comportamento alimentar e balanço energético, pode ser verificada com injeções intracerebroventricular (icv) do MCH, que induziu a ingestão de alimentos em ratos ou camundongos (Qu et al., 1996; Rossi et al.,1997; Della-Zuana et al., 2002; Xu et al., 2004; Adamantidis e de Lecea, 2008). Essa hiperfagia com ganho de peso corporal

12

ocorreu mesmo diante de uma dieta com teor de gordura moderado (Della-Zuana et al., 2002; Ito et al., 2003; Shearman et al., 2003). Também verificaram que o MCH estimula a ingestão de água indepedente da ingestão alimentar (Davidowa et al., 2002; Abbott et al., 2003).

Através de estudos eletrofisiológicos foi evidente os núcleos periventricular, ventromedial e arqueado do hipotálamo como os principais alvos da ação do MCH (Davidowa et al., 2002; Abbott et al., 2003).

1.2. O sistema neuropeptidérgico da Orexina A (OXA)

O neuromediador orexina (OX) deriva do termo grego *orexis* que significa apetite. A orexina também tem sido denominada de hipocretina (Sakurai et al 1998., de Lecea et al., 1998). Esses neuropeptídeos são sintetizados por neurônios hipotalâmicos, encontrados no hipotálamo lateral e posterior, apresentando difusas projeções pelo sistema nervoso central e reconhecido papel na participação do comportamento alimentar de mamíferos (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Peyron et al., 1998; Date et al., 1999; Bingham et al., 2001; Willie et al., 2001; Sutcliffe e de Lecea, 2002). Possivelmente as orexinas constituem um dos mecanismos contra a depleção de energia. Outros estudos demonstraram que as orexinas estão associadas ao controle do ciclo de vigília/sono e suas disfunções tais como na narcolepsia (Piper et

al., 2000; Peyron et al., 2000; Baumann e Bassetti, 2005), além da modulação da atividade cerebral (Adamantidis e de Lecea, 2008).

A orexina, apresenta duas isoformas, denominadas de orexina A (OXA) e a orexina B (OXB) conhecidas também como hipocretinas 1 (Hcrt-1) e 2 (Hcrt-2), respectivamente. As orexinas A e B são polipeptídios com 33 e 28 aminoácidos, respectivamente, apresentando homologia em 46% de suas sequências peptídicas. Ambos neuropeptídeos advêm de um mesmo precursor protéico denominado de prépro-orexina (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998).

Através de observações imunoistoquímicas, tem sido mostrado que os neurônios imunorreativos a orexina A e B estão restritos as áreas hipotalâmicas lateral e posterior, apresentando densa projeção de fibras nervosas para o núcleo talâmico paraventricular, substância cinzenta periaquedutal, núcleos da rafe e *locus coeruleus* (de Lecea et al., 1998; Peyron et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Date et al., 1999). Consideradas projeções, também foram encontradas para bulbo olfatório, córtex límbico, amígdala, núcleo supraquiasmático, núcleo paraventricular, núcleo arqueado, núcleo supra-mamilar, núcleo do trato solitário e núcleo motor dorsal do vago. Discretas projeções foram observadas para o córtex perirrinal, motor e sensorial, hipocampo e núcleo supra óptico (Date et al., 1999; Marcus et al., 2001).

Morfologicamente os neurônios hipotalâmicos que expressam orexina ou MCH são semelhantes, apresentando pericário multipolar ou fusiforme, com dois a cinco dendritos primários e dendritos secundários (Peyron et al., 1998). Os neurônios que contém a orexina/hipocretina estão distribuídos entre os neurônios MCH na área hipotalâmica lateral, entretanto não existe co-localização em um mesmo neurônio (Swanson et al., 2005). Esta similar localização entre o MCH e as orexinas, não obstante, também resulta em uma similar projeção desses dois sistemas neuropeptidérgicos para diferentes partes do neuroeixo (Bittencourt et al., 1992; Peyron et al., 1998; Adamantidis e de Lecea, 2008).

Os receptores das orexinas foram descritos como Hcrt-1/OXA receptor 1 (OX-R1) e Hcrt2/OXB receptor 2 (OX-R2) pertencentes à família dos receptores acoplados a proteína (G protein-coupled receptor – GPCR), (Sakurai et al. 1998) e tem sido mencionado que suas distribuições coincidem com a do receptor para o MCH (Trivedi et al., 1998; Lu et al., 2000; Saito et al., 2001; Marcus et al., 2001). A ativação desses receptores, ao menos no *locus coeruleus* e no hipotálamo mostraram que as orexinas têm uma ação excitatória (Heidel et al., 1999; Ivanov e Aston-Jones, 2000). O receptor OXA-R1 possui maior afinidade para a Orexina A em relação à orexina B, enquanto o OXB-R2 possui a mesma afinidade para ambas orexinas A e B (Sakurai et al., 1998). Em virtude da alta afinidade da OXA com o receptor OXA-R1, além de sua afinidade ao receptor OXB-R2, este receptor esta mais envolvido com a regulação do consumo alimentar e gasto energético (Haynes et al., 2000 e 2002).

15

1.2.1. Funções da orexina A (OXA)

A administração de OXA no núcleo hipotalâmico paraventricular, núcleo hipotalâmico dorsomedial, no hipotálamo lateral ou na área perifornicial, resultou no estimulo ingestão alimentar (Sakurai et al., 1998, Dube et al., 1999 e Sweet et al. 1999). Yamanaka et al., (1999) e Thorpe et al., (2003) também administraram OXA durante o período de sono (diurno) dos ratos e observaram ingestão alimentar neste período. Interessantemente, injeções de OXA no núcleo arqueado ou no núcleo hipotalâmico ventromedial não aumentaram a ingestão alimentar (Dube et al., 1999).

A administração crônica icv de OXA durante um período de 24 horas não alterou significativamente a ingestão alimentar (Haynes et al., 1999 e Yamanaka et al., 1999). A administração icv de OXB ou microinjeções de OXB em áreas hipotalâmicas associadas com a ingestão alimentar, também não demonstrou qualquer efeito significante sobre a ingestão de alimentos (Sakurai et al., 1998; Dube et al., 1999).

Inúmeros estudos mostraram que a administração icv de orexinas, principalmente OXA, resultou em alterações no ciclo sono/vigília, com reflexos nos comportamentos adaptativos relacionados à ingestão alimentar e ao balanço energético (Hagan et al., 1999; Bourgin et al., 2000; Espana et al., 2001; Yamanaka et al., 2003; Sakurai, 2003). A influência da orexina no ciclo sono/vigília pode ser verificada em situações dramáticas, em particular nos casos de narcolepsia, onde os números de neurônios OXA estão significantemente reduzidos (Piper et al., 2000; Peyron et al., 2000; Baumann e Bassetti, 2005).

Embora as orexinas tenham suas funções descritas principalmente no sistema nervoso central, Heinonen et al. (2008) em sua extensa revisão, descreve suas ações periféricas. As orexina e seus receptores foram detectados em várias espécies em uma ampla variedade de tecidos incluindo o trato gastrointestinal, urogenital, além do tecido adiposo e glândulas endócrinas.

1.3. O núcleo motor dorsal do nervo vago (D M V)

O nervo vago, X par de nervos craniano, é misto e essencialmente visceral. Os componentes funcionais são: aferente visceral especial (gustação na epiglote), aferente visceral geral (sensibilidade de parte da faringe, laringe, traquéia, esôfago e vísceras torácicas e abdominais), aferente somático geral (sensibilidade de parte do pavilhão auditivo e do meato acústico externo), eferente visceral especial (motricidade dos músculos da faringe e da laringe) e eferente visceral geral (motricidade do músculo cardíaco, vísceras torácicas e abdominais) (Brodal, 1998).

As fibras aferentes do nervo vago possuem seus pericários localizados no gânglio inferior, também denominado gânglio nodoso. Estes neurônios são pseudounipolares e conectam diretamente o trato gastrointestinal com os neurônios do núcleo do trato solitário (NTS) (Rogers et al., 1995; Zhuo et al., 1997; Fox et al., 2000; Browning, 2003; Browning e Mendelowitz, 2003). Deste núcleo, os neurônios fazem sinapses com os neurônios pré-ganglionares do DMV, que por sua vez contribuem para o controle das funções gastrointestinais. Este circuito caracteriza o reflexo vago-vagal (Miolan et al., 1984; Rogers et al., 1995, Powley, 2000a; Jean, 2001; Travagli e Rogers, 2001; Goyal, 2001; Chang et al., 2003; Travagli et al., 2003). As fibras aferentes do nervo vago utilizam o glutamato como principal neurotransmissor para o NTS (Andresen et al., 1990; Lu e Bieger, 1998; Jean et al., 2001; Glatzer et al., 2003; Lachamp et al., 2003; Baptista et al., 2005.)

Em roedores, o DMV está localizado no bulbo, próximo ao assoalho do IV ventrículo, no trígono do nervo vago, dorso-lateralmente em relação ao canal central da medula. Os pericários formam uma coluna, bilateral, com distribuição rostro-caudal latero-medialmente (Fox e Powley, 1985; Shapiro e Miselis, 1985; Norgren e Smith, 1988). Este núcleo controla principalmente as atividades motoras dos músculos de origem branquiomérica da faringe e laringe através de fibras eferentes viscerais especiais, bem como do coração, do esôfago, estômago, intestino delgado, grosso e pâncreas através de fibras eferentes viscerais gerais. Sua atividade funcional induz

uma diminuição na frequência cardíaca, constrição dos brônquios, aumento da secreção bronquiolar, aumento dos movimentos peristálticos e aumentos das secreções gastrointestinais e pancreáticas (Brodal, 1998; Travagli et al., 2006).

A grande maioria dos neurônios pré-ganglionares do DMV enviam seus longos axônios para os pericários dos neurônios pós-ganglionares excitatórios colinérgicos ou inibitórios não adrenérgicos/não colinérgicos (non-adrenergic, noncholinergic – NANC) (Krowicki et al., 1997; Rogers et al., 1999) situados no plexo mioentérico ou submucoso (células intersticiais de Cajal) do trato gastrointestinal (Berthoud, 1995; Zheng e Berthoud, 2000; Berthoud et al., 2001; Beckett et al., 2003), sendo o estômago o principal órgão-alvo dessa inervação vagal (Berthoud, 1991). De acordo com Rogers et al. (1999) e Krowicki et al. (1997) as eferências parassimpáticas do DMV induzem a contração e ausência de contração do estômago, através da estimulação dos neurônios ganglionares colinérgicos e NANC, respectivamente (figura 1).

Os neurônios da porção medial do DMV esquerdo e direito, formam os ramos ventral e dorsal que inervam estômago, respectivamente. Por outro lado, os neurônios da porção lateral do DMV enviam axônios para formar o ramo celíaco, celíaco acessório e o ramo hepático (Fox e Powley, 1985; Berthoud et al., 1991; Berthoud, 2004). Os neurônios da região médio-lateral das colunas não mantêm distribuições específicas para os órgãos inervados. Os nervos vagos esquerdo e direito



Figura 1. Esquema de um segmento do tronco encefálico e partes do segmento do trato gastrointestinal do rato, destacando a posição do núcleo motor dorsal do nervo vago e a distribuição dos axônios préganglionares do nervo vago esquerdo (azul) nas regiões ventrais e do nervo vago direito (verde) nas regiões dorsais do esôfago abdominal, estômago e segmentos iniciais do duodeno. Observar a presença de neurônios pós-ganglionares colinérgicos (laranja) e não adrenérgico e não colinérgico (vermelho). Abreviaturas: AP, área póstrema, Amb, núcleo ambíguo, NTS, núcleo do trato solitário, X, núcleo motor dorsal do nervo vago, XII, núcleo motor do nervo hipoglosso, cc, canal central da medula.

emitem ramos na cavidade abdominal que inervam as regiões ventral e dorsal respectivamente. Os ramos gástricos inervam o estômago, a porção proximal do duodeno e algumas estruturas viscerais tais como o pâncreas; os ramos celíacos e celíaco acessório inervam o trato gastrointestinal entre o duodeno e o colo transverso; e o ramo hepático inerva parte do estômago, fígado e duodeno proximal (Berthoud et al., 1991; Berthoud, 2004) (figura 1).

Embora os neurônios do DMV não possuam uma nítida organização morfo-funcional, existem indícios sugerindo que a inervação vagal do estômago esteja associada com a função deste órgão. Algumas fibras motoras causam sua contração, enquanto outras provocam o seu relaxamento (Li e Owyang, 2003; Travagli et al., 2006). Os neurônios das regiões caudo-medial e rostro-lateral do DMV estão relacionados com o relaxamento e inibição gástrica, enquanto os neurônios localizados nas regiões mais rostral e medial do DMV estão relacionados com a contração e secreção gástrica (Krowicki et al., 1997; Rogers et al., 1999; Travagli et al., 2006).

Em um recente estudo com microinjeção de L-glutamato nas partes rostral e caudal do DMV do rato, verificou-se que a parte rostral do DMV induz aumento da pressão intragástrica, enquanto a parte caudal induz diminuição no relaxamento intragástrico (Zhou et al., 2008).

A grande maioria dos neurônios do DMV são colinérgicos (95%), entretanto alguns exibem imunorreatividade para a enzima óxido nítrico sintase (NOS) ou para catecolaminas (tirosina hidroxilase - TH) (Kalia et al., 1984; Armstrong et al., 1990; Zheng et al., 1999; Guo et al., 2001).

O DMV é constituído de uma população de neurônios heterogêneos quanto às características morfológicas, dimensão e formato dos pericários, quantidade de ramificações dendríticas e extensão da arborização dendrítica (Fox e Powley, 1992; Fogel et al., 1996; Jarvinen e Powley, 1999; Browning et al., 1999; 2005; Martinez-Pena et al., 2004).

O DMV recebe projeções da área hipotalâmica lateral (Swanson, 1976; Saper et al., 1979; Hosoya e Matsushita, 1981; 1983; Dietrichs, 1984; Mongenson, 1985; Berk et al., 1987; Jiang et al., 2003); núcleo central da amígdala (Danielsen et al., 1989; Liubashina et al., 2002), núcleos vestibulares (Ruggiero et al., 1996), núcleo do trato solitário (Otake et al., 1992; Rogers et al., 1999), subnúcleo rombóide do núcleo do leito da estria terminal (Dong e Swanson, 2003).

O DMV recebe fibras nervosas imunorreativas a orexina A e B (Peyron et al., 1998; Date et al., 1999; Harrison et al., 1999). Injeções de orexina A, no quarto ventrículo, tem resultado em um significante aumento da secreção gástrica em ratos, cujo efeito foi bloqueado por vagotomia ou tratamento com atropina (Takahashi et al., 1999). Por outro lado, estudo eletrofisiológico demonstrou que tanto injeção local de orexina A ou B são potencialmente capazes de induzir despolarização nos neurônios do DMV de ratos (Hwang et al., 2001).

Krowicki et al. (2002), demonstraram que as orexinas A e B, injetadas no DMV, aumentaram a motilidade na região pilórica e o tônus gástrico. Grabauskas e Moises, (2003) demonstraram que as orexinas induzem lenta despolarização dos neurônios pré-ganglionares do DMV que inervam os neurônios pós-ganglionares do fundo, corpo e região pilórica do estômago, sugerindo que as orexinas liberadas no DMV podem aumentar a secreção de suco gástrico e a atividade motora em ratos, mediada pelo sistema nervoso central durante a alimentação (Grabauskas e Moises, 2003).

Miyasaka et al., (2002) demonstraram que injeções icv de orexina, estimularam a secreção pancreática exócrina, independente da estimulação gástrica, via estimulação do nervo vago em ratos.

Com relação ao sistema neuropeptidérgico do MCH, em um recente estudo fisiológico realizado por Zheng et al. (2005b), esse neuropeptídeo foi injetado no quarto ventrículo de ratos, verificando uma diminuição da temperatura corporal e da atividade locomotora, sem alterações significativas na ingestão alimentar ou hídrica.

A regulação do tubo gastrointestinal mediada pelo DMV, em particular, nas diferentes fases da motilidade gástrica pode estimular ou inibir a ingestão alimentar. Assim como a regulação das secreções gástricas podem facilitar a absorção de nutrientes.

2. JUSTIFICATIVAS

Em vista dos dados morfo-funcionais mostrando que:

- a) Os neuropeptideos OXA e MCH apresentam potente atividade orexigênica, principalmente, através de ação no sistema nervoso central;
- b) Os neuropeptideos OXA e MCH exercem atividade moduladora no complexo sensório-motor dorso-vagal, resultando em modificações na motilidade e secreção nos principais segmentos do trato gastrointestinal, resultando em aumento ou diminuição do esvaziamento gástrico e absorção de nutrientes; e consequentemente, colaborando na regulação do peso corporal;
- c) O componente motor do complexo dorso-vagal, o núcleo motor dorsal do nervo vago de ratos não tem sido analisado especificamente, quanto ao padrão de inervação imunorreativa a OXA e ao MCH. Além disso, a correlação morfológica dessa inervação com os neurônios que enviam fibras nervosas para os principais segmentos do trato gastrointestinal também não tem sido exploradas;
- d) A origem das aferências diencefálicas imunorreativas a OXA e ao MCH não tem sido avaliadas, especificamente, para o núcleo motor dorsal do nervo vago;

Propusemos investigar os sistemas neuropeptidérgicos da OXA e MCH no núcleo motor dorsal do nervo vago em ratos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os sistemas neuropeptidérgicos da OXA e MCH no núcleo motor dorsal do nervo vago em ratos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar a localização das fibras e terminais nervosos imunorreativos a

OXA e ao MCH no núcleo motor dorsal do nervo vago de ratos Wistar;

Comparar a densidade de inervação orexigênica imunorreativos a OXA e ao MCH no núcleo motor dorsal do nervo vago;

Averiguar uma possível interação morfológica dessas terminações nervosas com os neurônios envolvidos com a inervação dos segmentos do trato gastrointestinal (esôfago abdominal, estômago e duodeno proximal);

Identificar os territórios diencefálicos de origem da inervação OXA e MCH para o núcleo motor dorsal do nervo vago.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e procedimentos cirúrgicos

Foram utilizados ratos, machos, Wistar adulto-jovens (aproximadamente 3 meses) (Rattus novergicus) provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP . Os animais foram transferidos para o Biotério de manutenção do Setor de Morfologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP), acondicionados em gaiolas, cada uma com cinco animais, alimentados com ração granulada e água ad libitum e mantidos sob ciclo de claro/escuro de 12/12 horas a $22 \pm 2^{\circ}$ C e $50\pm10\%$ de umidade relativa. Esses animais foram mantidos durante 40 dias sem serem manipulados, período necessário para a adaptação dos mesmos às novas condições de ambientação. Os animais que sofreram intervenções cirúrgicas foram mantidos individualmente em gaiolas nas condições citadas anteriormente. Para os procedimentos experimentais de deposição de traçador neuronal fluorescente "Fluorogold" no trato gastrointestinal ou no DMV, os animais foram previamente anestesiados por via intramuscular (i.m.) com solução de cloridrato de ketamina (25 mg/kg, Vetanarcol, Laboratórios König, Argentina) e xilazina (10 mg/kg, Coopazine, Coopers Brasil, Brasil) enquanto que para o sacrifício por perfusão transcardíaca foi empregada a solução anestésica de pentobarbital de sódio por via intraperitoneal (i.p.100mg/kg, Cristália, Brasil).

Os procedimentos de manipulação dos ratos seguiram as normas estabelecidas pelo "Canadian Council on Animal Care – Guide to the Care and Use of Experimental Animals", e os protocolos experimentais (protocolo número 53/03) foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia e Medicina Veterinária de Araçatuba (UNESP).

Os animais foram divididos em três grupos experimentais:

- a) Animais empregados (n=3) para análise do padrão de inervação da OXA e do MCH em toda extensão do DMV, empregando o método da imunoperoxidase indireta e intensificação pelo método da prata e ouro;
- b) Animais empregados (n=9) para análise, pelo método da dupla imunoperoxidase indireta, da interação entre as fibras e terminais nervosos OXA-ir e ao MCH-ir com os neurônios do DMV que inervam as paredes ventrais do esôfago abdominal (n=3), do estômago (n=3) e do segmento inicial do duodeno (n=3);
- c) Animais empregados (n=70) para análise, através do método da dupla imunofluorescência indireta sequencial (método de eluição, Tramu et al.,
1978), dos territórios diencefálicos de origem da inervação OXA e do MCH no DMV.

4.2. Perfusão transcardíaca e processamento histológico

Os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca no período das 9:00 às 11:00 horas. Para a perfusão transcardíaca, os animais receberam previamente injeção intraventricular de heparina (0,1 ml / 5.000 U.I/ml), após 10 segundos, foram perfundidos, via aorta ascendente, com solução salina a 0,9% (100ml), seguido de solução fixadora (900 ml) de paraformaldeído (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 2% em tampão fosfato de sódio (PB) (Sigma) a 0,1 M, pH 7,4 a 4°C. Os encéfalos foram imediatamente dissecados e pós-fixados na mesma solução fixadora durante 30 a 40 minutos a 4°C. Em prosseguimento, os encéfalos foram transferidos para uma solução crioprotetora constituída de tampão fosfato de potássio em salina (KPBS) (Sigma) 0,02 M, pH 7,4, acrescida de 30% de sacarose, durante 12 horas a 4°C, sob agitação.

Cortes histológicos frontais com 20 µm de espessura foram obtidos em micrótomo de congelação (Jung SMR2000, Leica, Alemanha), coletados em placas de

cultura de tecidos em 4 séries de 6 poços, de modo que os cortes adjacentes de uma determinada série estavam equidistantes em intervalos de 80 μm. Os cortes coletados foram mantidos na placa de cultura com solução anti-congelante constituída de 30% de etileno glicol (Sigma), 20% de glicerol (Sigma) em PBS, 0,05 M, pH 7,3 e estocados a – 20°C até serem processados para a técnica imunoistoquímica. Algumas séries de cortes histológicos foram submetidas para a coloração pelo método de Nissl para orientação citoarquitetônica.

4.3. Identificação das fibras e terminais nervosos OXA-ir ou MCH-ir no DMV pelo método da imunoperoxidase indireta com intensificação pela Ag/Au

Os cortes histológicos foram submetidos às seguintes etapas de lavagens e incubações sob agitação a 20 rpm: a) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; b) inibição da peroxidase endógena com 0,3% de H₂O₂ por 30 minutos em KPBS acrescido de 0,3% de Triton X-100 (Sigma); c) lavagens em KPBS à temperatura ambiente, até a completa remoção das bolhas; d) bloqueio de reações inespecíficas, durante 2 horas, utilizando soro normal de burro (1:33, S-100, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA), diluído em KPBS 0,02M, pH 7,4 contendo 0,3% de triton X-100 (Sigma) a temperatura ambiente; e) incubação por 24 horas a temperatura ambiente, com o anticorpo primário policional anti-rMCH (anti-rMCH, 1:10000, fornecido pelo Dr Wylie Vale e Dr Joan Vaughan, Laboratório de Biologia e Peptídeos, Salk Institute, La Jolla, CA, USA) ou OXA (1:5000, Península Laboratories, CA, USA) obtidos em coelho e diluídos em solução contendo 0,3% de triton X-100 (Sigma), soro normal de cabra (1:33, Vector laboratories) e KPBS; f) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; g) incubação por 1 hora, em uma solução contendo anticorpo secundário biotinilado anti-coelho obtido em burro (1:500, Vector Laboratories), 0.3% de triton X-100, soro normal de cabra e KPBS; h) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; i) incubação por 1 hora, com o complexo avidina-biotina peroxidase (1:500, KiT ABC Elite, Vector Laboratories) em KPBS e temperatura ambiente; j) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; k) revelação com uma solução de incubação com KPBS, contendo diaminobenzidina (0,025%, DAB, Sigma), sulfato de amônio e níquel (0,05% de NAS, Sigma) e peróxido de hidrogênio (0,03% de H₂O₂, Sigma); I) bloqueio da reação com lavagens em água destilada seguido de lavagens em KPBS.

Em prosseguimento, os cortes histológicos foram coletados em lâminas gelatinizadas, mantidas pelo menos 24 horas em estufa a 37ºC, desidratadas, deslipidificadas em soluções crescentes de alcoóis e mantidas em xilol por no mínimo

três dias. Para a intensificação da reação de imunoperoxidase, as seguintes etapas foram obedecidas: a) incubação por 30 minutos em solução de nitrato de prata a 1% e 56°C; b) lavagem de 10 minutos em água corrente; c) incubação por 10 minutos em solução de cloreto de ouro a 0,1% a temperatura ambiente, protegida da luz; d) lavagem de 10 minutos em água corrente; e) incubação em tiossulfato de sódio a 5%, durante 5 minutos; f) lavagem de 10 minutos em água corrente; g) desidratação, deslipidificação e montagem com meio de montagem DPX e lamínulas de vidro.

Os cortes histológicos foram analisados em campo claro com o auxílio de um microscópio Aristoplan (Leica - Aristoplan, Alemanha) acoplado com uma câmera digital Axiocam MRc (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha). Os campos visuais do DMV de aproximadamente 40 cortes histológicos de cada animal foram coletados com objetivas de 20x e 40x através do programa de software Axionvision Rel 4.0 (carl Zeiss, GmbH, Alemanha) alterando as variáveis de brilho e contraste de modo a realçar as fibras e terminais nervosos imunorreativos. As imagens foram processadas no programa de análise de imagens ImageJ de domínio público (National Institutes of Health – NIH, USA) para mensuração da área do DMV e a porcentagem desta ocupada pelos perfis de fibras e terminais nervosos imunorreativos a OXA ou MCH. Para essa análise, os arquivos eletrônicos das imagens (TIFF) foram convertidos para

uma régua micrometrada foi acrescentado à imagem a ser mensurada para obtenção dos parâmetros de calibração. Os parâmetros de intensidade, brilho e contraste foram ajustados para melhor discernimento dos elementos neurais. As mensurações da área total e porcentagem da área de imunomarcação foram selecionadas para quantificação. Os elementos neurais que exibiam imunorreatividade foram selecionados manualmente através da opção "Threshold". Os resultados em pixel da porcentagem da área que exibiam os elementos neurais imunorreativos foram transformados em valores absolutos de µm², a partir dos valores da área total. Os dados absolutos foram apresentados no formato da média e erro padrão médio.

Para o controle da reação imunoistoquímica, o anticorpo primário foi omitido, mantendo os demais procedimentos similares. A especificidade da reação antígeno-anticorpo foi averiguada através de testes de adsorção com diferentes concentrações do peptídeo sintético no Laboratório de Neuroanatomia Química, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Jackson C. Bittencourt (ICB-USP).

4.4. Identificação das fibras e terminais nervosos OXA-ir ou MCH-ir nos neurônios do DMV que inervam as paredes ventrais do esôfago abdominal, do estômago e do segmento inicial do duodeno pelo método da dupla imunoperoxidase indireta

Inicialmente, um dos seguintes segmentos do trato gastrointestinal foram dissecados com auxílio de microscópio cirúrgico estereoscópico (D.F. Vasconcelos, SP, Brasil) para a deposição do traçador neuronal retrogrado "fluorogold" sob a camada serosa da parede ventral, com o auxílio de uma seringa Hamilton (capacidade de 50µl): a) no esôfago abdominal (25 µl); b) no estômago (50 µl); c) no segmento inicial do duodeno (50 µl) (figura 2).

Após um período de 20 a 30 dias, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca para fixação histológica e para os procedimentos de microtomia. Os cortes histológicos (uma série de seis poços) foram submetidos às seguintes etapas de lavagens e incubações sob agitação a 20 rpm: a) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; b) inibição da peroxidase endógena com 0.3% de H₂O₂ por 30 minutos em KPBS acrescido de 0,3% de Triton X-100 (Sigma); c) lavagens em KPBS à temperatura ambiente, até a completa remoção das bolhas; d) bloqueio de reações inespecíficas, durante 2 horas, utilizando soro normal de cabra (1:33, Vector laboratories), diluído em KPBS 0,02M, pH 7,4 contendo 0,3% de triton X-100 (Sigma) a temperatura ambiente; e) incubação por 24 horas a temperatura ambiente, com o anticorpo primário policional anti-rMCH (anti-rMCH, 1:5000, PBL#234, fornecido pelo Dr Wylie Vale e Dr Joan Vaughan, Laboratório de Biologia e Peptídeos, Salk Institute, La OXA (1:10000, Península Jolla. CA. USA) laboratories. CA. USA) ou



Figura 2. Foto de segmentos do trato gastrointestinal do rato, mostrando os locais de injeção do traçador neuronal retrógrado fluorogold na parede ventral dos seguintes segmentos: Em A, do esôfago abdominal, B, no fundo, corpo e região pilórica do estômago e C, segmento inicial do duodeno.

obtidos em coelho e diluídos em solução contendo 0,3% de triton X-100 (Sigma), soro normal de cabra (1:33, Vector laboratories) e KPBS; f) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; g) incubação por 1 hora, em uma solução contendo anticorpo secundário biotinilado anti-coelho obtido em burro (1:500, Vector Laboratories), 0.3% de triton X-100, soro normal de cabra e KPBS; h) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; i) incubação por 1 hora, com o complexo avidina-biotina peroxidase (1:500, KiT ABC Elite, Vector laboratories) em KPBS e temperatura ambiente; j) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; k) revelação com uma solução de incubação com KPBS, contendo diaminobenzidina (0,025%, DAB, Sigma), sulfato de amônio e níquel (0,05% de NAS, Sigma) e peróxido de hidrogênio (0,03% de H₂O₂, Sigma); l) bloqueio da reação de imunoperoxidase através de lavagens em água destilada; m) duas lavagens em KPBS.

Em prosseguimento, os cortes foram submetidos às seguintes etapas: a) incubação por 24 horas a 4°C, com o anticorpo primário policional anti-fluorogold gerado em coelho (anti-FG, 1:5000, AB 153, Chemicom International, CA, USA), diluído em solução contendo 0,3% de triton X-100 (Sigma), soro normal de burro (1:33, Sigma) e KPBS; b) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; c) incubação por 1 hora a temperatura ambiente, em uma solução contendo anticorpo

secundário biotinilado anti-coelho gerado em burro (1:500, Vector Laboratories), 0.3% de triton X-100, soro normal de cabra e KPBS; d) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; e) incubação com o complexo avidina-biotina peroxidase (1:500, KiT ABC Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) em KPBS e temperatura ambiente; f) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; g) revelação com VIP (SK 4600 Vector laboratories); h) bloqueio da reação em água destilada; i) duas lavagens em KPBS durante 10 minutos. Em seguida os cortes foram coletados em lâminas previamente gelatinizadas, mantidas por 24 horas em estufa a 37°C, desidratadas, deslipidificadas em soluções crescentes de alcoóis e xilol e montadas com meio de montagem DPX e lamínulas de vidro.

Os cortes histológicos foram analisados em campo claro com o auxílio de um microscópio Aristoplan (Leica - Aristoplan, GmbH, Alemanha), a fim de identificar a interação morfológica entre os perfis de fibras e terminais nervosos imunorreativos a OXA ou ao MCH com os neurônios que inervam o trato gastrointestinal. Os campos visuais do DMV foram coletados com objetivas de 20x e 40x com uma câmara digital Axiocam MRc (Carl Zeiss) através do programa de software Axionvision Rel 4.0 (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha).

A área superficial dos pericários dos neurônios marcados retrogradamente com fluorogold no DMV foi obtida através do programa de análise de

imagens ImageJ de domínio público (National Institutes of Health – NIH, USA). Para essa análise, os arquivos eletrônicos das imagens (TIFF) foram convertidos para escala de tons de cinza (8 bits) no programa ImageJ. Em seguida, um segmento de uma régua micrometrada foi acrescentado à imagem a ser mensurada para obtenção dos parâmetros de calibração. Os parâmetros de intensidade, brilho e contraste foram ajustados para melhor discernimento dos perfis dos pericários que exibiam núcleo. A área dos pericários em µm² foi mensurada automaticamente após a seleção desses. Os dados absolutos foram apresentados no formato da média e erro padrão médio.

4.5. Localização das projeções diencefálicas OXA-ir ou MCH-ir para o DMV

Os animais receberam deposição do traçador neuronal " fluorogold" (FG) por iontoforese no DMV. Para isso, foram utilizados 70 ratos. Após o posicionamento da cabeça do animal na mesa esterotáxica, foi exposta a região do 4º ventrículo, com o auxílio do microscópio cirúrgico estereoscópico (D.F. Vasconcelos, SP, Brasil) para visualização direta da área de injeção. Para a deposição do traçador neuronal obedecemos preferencialmente às seguintes coordenadas a partir do óbex: médio-lateral = 0,6 a 0,7 mm e dorso-ventral = 0,5 a 0,6 mm. O traçador foi depositado no DMV por iontoforese, através de uma micropipeta de vidro com ponta ativa de 10 μm de diâmetro interno, utilizando-se corrente alternada de +5 μAmp (Midgard TM Precision Current Source, USA) por um minuto. Após o implante do traçador neuronal, a micropipeta foi retirada, a musculatura cervical dorsal foi reposicionada e a pele suturada. Decorrido os períodos de 20 a 30 dias da deposição do traçador neuronal no DMV, os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca e aos procedimentos de microtomia.

Os cortes histológicos foram submetidos às seguintes etapas de lavagens e incubações sob agitação a 20 rpm: a) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; b) bloqueio de reações inespecíficas, durante 2 horas, utilizando soro normal de burro (1:33, Vector laboratories), diluído em KPBS 0,02M, pH 7,4 contendo 0,3% de triton X-100 (Sigma); c) incubação por 24 horas a temperatura ambiente, com o anticorpo primário policional anti-FG (1:10000, AB 153, Chemicom International, CA, USA) obtidos em coelho e diluído em solução contendo 0,3% de triton X-100 (Sigma), soro normal de burro (1:33, Vector laboratories) e KPBS; d) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; e) incubação por 1 hora, em uma solução contendo anticorpo secundário anti-coelho obtido em burro marcado com DTAF ou Cy³ (1:500, Vector laboratories), 0.3% de triton X-100, soro normal de burro e KPBS; f) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram coletados em lâminas gelatinizadas, desidratadas a temperatura ambiente e montadas com meio de montagem glicerinado e lamínulas de vidro.

As lâminas histológicas foram analisadas em microscopia de epifluorescência (Aristoplan, Leica) e os campos visuais das regiões diencefálicas que exibiam neurônios imunorreativos ao fluorogold foram coletados através de uma câmera digital Axiocam MRc (Carl Zeiss) com o programa de software Axiovision Rel 4.0 (Carl Zeiss).

Em prosseguimento, as lâminas histológicas foram submergidas em KPBS e mantidas sob suave agitação para remoção das lamínulas de vidro e do meio de montagem. Após várias lavagens em KPBS, os cortes histológicos aderidos às lâminas histológicas foram submetidos ao método da eluição para eliminação da marcação imunofluorescente (método de Tramu et al., 1978). Para isso, inicialmente foi realizado o tratamento ácido com solução de permanganato de potássio a 0,05 M (Synth, São Paulo, Brasil) e ácido sulfúrico 0,01% (Synth, São Paulo, Brasil) durante 20-30 segundos e inibição com bissulfito de sódio a 5% (Synth, São Paulo, Brasil). Uma vez realizado essa etapa, as lâminas histológicas foram incubadas com o anticorpo secundário marcado com DTAF ou Cy³ e analisadas em microscopia de epifluorescência.

Uma vez confirmada à ausência de imunomarcação, as lâminas histológicas foram submetidas à segunda imunofluorescência indireta, empregando o anticorpo primário policional anti-rMCH (anti-rMCH, 1:10000) ou (OXA, 1:10000) obtidos em coelho e diluídos em solução contendo 0,3% de triton X-100 (Sigma), soro normal de burro (1:33, Vector laboratories) e KPBS durante 24 horas a 4°C. Em prosseguimento foram realizadas: a) duas lavagens de 10 minutos; b) incubação por 1 hora, em uma solução contendo anticorpo secundário biotinilado anti-coelho obtido em burro (1:500, Vector laboratories) com 0.3% de triton X-100, soro normal de cabra e KPBS, c) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente, d) incubação por 1 hora, com o complexo streptavidina-DTAF ou streptavidina-Cy³ (Jackson ImmunoResearch). Finalmente, as lâminas histológicas foram lavadas em KPBS, montadas com meio de montagem glicerinado e lamínulas de vidro.

As lâminas histológicas foram novamente analisadas em microscopia de epifluorescência (Aristoplan – Leica Alemanha) e os campos visuais das regiões diencefálicas que tinham sido coletados previamente, foram novamente examinados a fim de identificar possíveis neurônios OXA-ir ou MCH-ir. Esses campos visuais foram novamente coletados empregando o sistema de captura de imagens citado anteriormente. Os campos visuais foram quantificados quanto ao número total de perfis neuronais marcados com fluorogold em cada território diencefálico e a porcentagem

destes que exibiam OXA-ir e ao MCH-ir. Os valores em porcentagens foram expressos em média e erro padrão médio.

5. RESULTADOS

5.1. Identificação das fibras e terminais nervosos OXA-ir ou MCH-ir no DMV

5.1.1. Coloração de Nissl

Inicialmente devemos salientar que não há uma divisão citoarquitetônica do DMV discernível pelo método de Nissl em ratos (Figura 3). Entretanto, alguns estudos relatam uma divisão em colunas longitudinais em toda extensão rostro-caudal, baseada na localização de grupos neuronais que enviam fibras nervosas para os diferentes ramos de distribuição do nervo vago (Fox e Powley, 1985). Em todas essas colunas se alojam os quatro possíveis tipos de neurônios, classificados segundo suas características morfológicas pelo método de Golgi (Jarvinen e Powley, 1999), não sendo discerníveis pelo método de Nissl. Desse modo, torna-se impossível adotarmos um parcelamento em subdivisões do DMV para direcionarmos nossas descrições morfológicas.



Figura 3. Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando cortes histológicos frontais semiseriados caudo-rostrais (medula cervical-tronco encefálico) corado pelo Método de Nissl, destacando as características citoarquitetônicas do DMV (delineada). Em A-B, C-D e E-F são mostradas as partes caudal, médio e rostral do DMV, respectivamente. Abreviaturas: B, bregma; cc, canal central da medula; D, dorsal; L, lateral; M, medial; SolM, subnúcleo medial do núcleo do trato solitário; SolIM, subnúcleo intermédio do núcleo do trato solitário; XII, núcleo motor do nervo hipoglosso; 4V, quarto ventrículo.

5.1.2. Imunoistoquímica para identificação de fibras e terminais nervosos OXA-ir ou MCH-ir no DMV seguido de intensificação com Ag/Au

As observações quanto à distribuição heterogênea das fibras e terminais nervosos OXA-ir e ao MCH-ir no DMV, possibilitou dividirmos este núcleo em partes caudal, média (altura da área póstrema) e rostral. Entretanto, essa divisão não está baseada em uma divisão dimensional relativa uma vez que a parte caudal compreende quase que metade da extensão rostro-caudal do DMV.

As fibras e terminais nervosos OXA-ir e ao MCH-ir foram claramente evidenciadas pelo método da imunoperoxidase seguido da intensificação pelo método da Ag/Au. Em ambos os padrões de inervação foram possíveis as observações de terminais nervosos varicosos (*boutouns en passant*) ou em formato de botões terminais (boutouns terminalis) (Figura 4). Interessantemente, esses terminais nervosos parecem alcançar principalmente o DMV a partir de sua parte lateral (Figura 5) por fibras que trafegam em direção latero-medial do núcleo reticular medular rostral e do núcleo reticular lateral. Além disso, o núcleo do trato solitário e o núcleo motor do nervo hipoglosso, situados respectivamente nos limites dorsal e ventral do DMV, também apresentam inervações OXA-ir e ao MCH-ir, que arborizam em direção ao DMV (Figura 5). Finalmente, inúmeras fibras nervosas imunorreativas também foram observadas em



Figura 4. Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando cortes histológicos frontais do tronco encefálico destacando a inervação imunorreativa a OXA (A-A', B-B', C-C') e MCH (D-D') no DMV. Observar em A, a presença de terminais nervosos varicosos tipicos (boutons en passant) (seta) e mostrados em maior resolução em A'. Observar em B, a presença de um terminal nervoso varicoso com botões terminais colaterais (seta), mostrado em maior resolução em B'. Observar em C-D a presença de terminais nervosos ramificados com botões terminais típicos (boutons terminal) (setas), mostrados em maior resolução em C'-D'. Abreviaturas: DMV, núcleo motor dorsal do nervo vago, OXA-ir, imunorreativo a Orexina A, MCH-ir, imunorreativo ao Hormônio Concentrador de Melanina.

perfis transversais no DMV, principalmente em sua parte caudal e próximo ao canal central da medula, supondo a existência de fibras que trafegam longitudinalmente através desse núcleo.

A inervação MCH do DMV é extremamente heterogênea tanto no sentido caudo-rostral como látero-medial. Assim sendo, nós observamos que a partes caudolateral e rostral apresentam uma maior densidade de inervação. Por outro lado, a parte média do DMV apresenta esparsa inervação MCH (Figuras 5 e 6).

A inervação OXA do DMV é mais acentuada quando comparada com a inervação MCH (Figuras 5 e 6). Além disso, a distribuição das fibras e terminais nervosos OXA-ir é quase homogênea tanto na extensão rostro-caudal quanto láteromedial, com uma menor densidade de inervação na parte média, similarmente a inervação MCH (Figuras 5 e 6).

Comparando ambas as densidades de inervação nos cortes histológicos caudo-rostral pode ser observado que a inervação OXA do DMV mostra-se mais densa, principalmente, nos cortes histológicos das partes médio-caudal e médio-rostral (Figura 6). Em termos de densidade, a inervação OXA apresenta 65±8% maior em relação à inervação MCH no DMV. A densidade média de



Figura 5. Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando cortes histológicos frontais da medula espinal cervical e tronco encefálico, destacando a inervação OXA-ir (A-D) e MCH-ir (A'-D') no DMV. Em A-B/A'-B', C/C' e D/D' são mostradas as partes caudal, médio e rostral do DMV, respectivamente. Abreviaturas: B, bregma; cc, canal central da medula; D, dorsal; DMV, núcleo motor dorsal do nervo vago; M, medial; SoIM, subnúcleo medial do núcleo do trato solitário; SoIIM, subnúcleo intermédio do núcleo do trato solitário; XII, núcleo motor do nervo hipoglosso; 3V, terceiro ventrículo.



Figura 6. Gráfico mostrando a área em µm² (média e erro padrão) dos perfis de fibras e terminais nervosos imunorreativos a OXA e ao MCH em cortes histológicos caudo-rostral do DMV. Observar que a inervação OXA é significativamente mais densa nas partes caudal, médio-rostral, e rostral. Enquanto a inervação MCH é mais substancial na parte rostral e escassa na parte média.

fibras e terminais nervosos OXA-ir e ao MCH-ir foi de $3033\pm222 \ \mu\text{m}^2$ e $1844\pm117 \ \mu\text{m}^2$, respectivamente.

O controle da reação imunoistoquímica pela omissão do anticorpo primário anti-MCH ou anti-OXA mostrou ausência de imunorreatividade nos cortes histológicos. Os testes de adsorção empregando a solução de antígeno-anticorpo também não revelaram marcações inespecíficas (informações obtidas do Laboratório de Neuroanatomia Química, ICB-USP).

5.2. Identificação das fibras e terminais nervosos OXA ou MCH nos neurônios do DMV que inervam as paredes ventrais do esôfago abdominal, estômago e segmento inicial do duodeno pelo método da dupla imunoperoxidase indireta

Os neurônios que inervam a parte abdominal das paredes ventrais do esôfago, do estômago e do segmento inicial do duodeno foram marcados retrogradamente com o traçador retrógrado fluorogold (Figura 7). Esses neurônios foram visualizados pelo método da imunoperoxidase indireta e empregando os cromógenos DAB ou VIP que resultaram em uma coloração castanho ou violeta desses neurônios, respectivamente. Por outro lado, as fibras e terminais nervosos



Figura 7. Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando cortes histológicos frontais do tronco encefálico destacando os neurônios do DMV. Esses neurônios foram marcados retrogradamente com fluorogold, depositado na parede ventral do esôfago, identificados pelo método da imunoperoxidase indireta com o cromógeno VIP. Em A-B, C e D são mostradas as partes caudal, média e rostral do DMV, respectivamente. Observação: as fibras e terminais nervosos mostrados são imunorreativos a OXA. Abreviaturas: B, bregma; cc, canal central da medula; D, dorsal; M, medial; SoIM, subnúcleo medial do núcleo do trato solitário; SoIIM, subnúcleo intermédio do núcleo do trato solitário; XII, núcleo motor do nervo hipoglosso; 4V, quarto ventrículo.

foram identificados também pelo método da imunoperoxidase indireta, entretanto, empregando o cromógeno DAB intensificado pelo sulfato de níquel que resultou em uma coloração castanho-escuro. Desse modo, foi possível evidenciar claramente os elementos neuronais marcados pelo traçador neuronal retrógrado fluorescente fluorogold daqueles marcados pela imunorreação de identificação da OXA e do MCH (Figuras 8 e 9).

Os neurônios retrogradamente marcados apresentavam distribuição unilateral em toda sua extensão caudo-rostral do DMV, lado esquerdo, (Figura 7). Entretanto, ocasionalmente, a distribuição foi bilateral e nesses casos o DMV esquerdo apresentou os neurônios mais densamente marcados com o traçador neuronal fluorogold, enquanto os neurônios do DMV direito foram marcados fracamente e em menor número.

A população de neurônios marcados com fluorogold foi significativamente mais elevada nos casos de injeções no estômago, seguido pelo esôfago; enquanto a população neuronal que representam o duodeno foi escassa.

Alguns subtipos morfológicos de neurônios que inervam o trato gastrointestinal foram discerníveis, sendo predominante os neurônios multipolares com maior área superficial, enquanto em menor número foram discerníveis neurônios



Figura 8. Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando cortes histológicos do DMV submetidos a dupla imunoperoxidase indireta para detecção dos neurônios retrogradamente marcados com fluorogold (cromógeno VIP - roseado, setas pretas longas), depositado na parede ventral do estômago, e as fibras e terminais nervosos OXA-ir (cromógeno DAB/Ni – castanho escuro, setas pretas pequenas). Em A-C e A'-C' são mostrados a interação entre esses elementos neurais em menor e maior resolução. Observar em A'-C' os contatos entre os terminais nervosos VXA-ir com os pericários dos neurônios (setas vermelhas) e com os dendritos proximais (seta azul).

fusiformes com dendritos principais orientados paralelamente ao maior eixo do DMV no corte histológico (de disposição látero-lateral) e alguns neurônios ovais, ambos com menor área superficial (figuras 8 e 9). A área superficial média dos neurônios que inervam o estômago, esôfago e duodeno foi de 244±93 μ m² (variação entre 105-578 μ m²), 231±69 μ m² (variação entre 141-401 μ m²) e 215±88 μ m² (variação entre 113-321 μ m²), respectivamente.

Com relação à interação morfológica entre perfis das terminações nervosas OXA-ir e ao MCH-ir, foi observado que esta se estabelecia principalmente nas partes mais caudais e rostrais, e no terço lateral da parte média do DMV, justamente nas áreas de maior densidade de fibras e terminais nervosos imunorreativos. Os neurônios que inervam o estômago e o esôfago mostraram um maior número de perfis neurais de interação, enquanto, raramente foi observado nos neurônios que inervam o duodeno.

A interação entre os perfis neurais ocorreram principalmente entre terminais nervosos varicosos de passagem (boutons en passant) e os pericários dos neurônios, enquanto ocasionalmente foi visível entre terminais nervosos do tipo botões terminais (Boutons terminal) e os pericários dos neurônios (Figuras 8 e 9). Por outro lado, menos frequentemente, foi visível a interação entre terminais nervosos varicosos OXA ou MCH com os perfis dendríticos (figuras 8 e 9), uma vez que os neurônios



Figura 9. Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando cortes histológicos do DMV submetidos à dupla imunoperoxidase indireta para detecção dos neurônios retrogradamente marcados com fluorogold (cromógeno VIP - roseado, setas pretas longas), depositado na parede ventral do esôfago ou duodeno, e as fibras e terminais nervosos MCH-ir (cromógeno DAB/Ni – castanho escuro, setas pretas pequenas). Em A-C e A'-C' são mostradas as interações entre esses elementos neurais em menor e maior resolução. Observar em A'-C' os contatos entre os terminais nervosos varicosos MCH-ir com os pericários dos neurônios (setas vermelhas) e com os dendritos proximais (seta azul).



Figura 10. Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando cortes histológicos frontais do tronco encefálico, destacando os locais centrais de deposição iontoforética do traçador neuronal retrógrado fluorogold, revelado pelo método da imunoperoxidase indireta. Em A, B e C são mostrados em menor resolução os locais de deposição (setas). Em A', B' e C' são mostrados em maior resolução esses locais. Observar que as deposições do fluorogold ficaram restritas ao DMV com discreta contaminação do subnúcleo medial do núcleo do trato solitário nos casos #2a e #5a. Abreviaturas: B, bregma; D, dorsal; DMV, núcleo motor dorsal do nervo vago; M, medial; SolM, subnúcleo medial do núcleo do trato solitário; XII, núcleo motor do nervo hipoglosso.

marcados retrogradamente com fluorogold apresentavam marcação imunorreativa restrita ao pericário e aos segmentos dendríticos proximais, não revelando os segmentos dendríticos médio-distais, tornou impossível averiguar de fato a frequência dessa interação.

5.3. Localização das projeções diencefálicas OXA ou MCH para o DMV

A elucidação das aferências diencefálicas OXA-ir e ao MCH-ir para o DMV foi possível pelo método da imunofluorescência indireta sequencial (método da eluição), identificado inicialmente no corte histológico do diencéfalo o traçador neuronal retrógrado fluorogold, depositado no DMV, seguido pela identificação dos neuromediadores (OXA ou MCH).

5.3.1. Locais de deposição do traçador neuronal retrógrado no DMV

Inicialmente foram selecionados os casos onde os locais de deposição do traçador neuronal retrógrado estavam adequados (figura 10). Para isso, dos setenta



Figura 11. Fotomicrografia em microscopia de epifluorescência mostrando cortes histológicos frontais do diencéfalo destacando os neurônios que enviam aferências para o do DMV. Esses neurônios foram marcados retrogradamente com fluorogold, depositado no DMV, identificados pelo método da imunofluorescência indireta empregando anticorpo secundário marcado com DTAF. Em A é mostrado os neurônios mais rostralmente marcados no núcleo paraventricular. Em B é mostrado os neurônios marcados na porção caudal do núcleo paraventricular se extendendo lateralmente para a zona incerta. Em B'-B'' são mostrados em maior resolução os neurônios distribuídos nas partes dorsal e préparasubtalâmica da área hipotalâmica lateral, respectivamente. Abreviaturas: B, bregma; D, dorsal; f, fórnix; L, lateral; LHAd, área hipotalâmica lateral, parte lateral; LH, área hipotalâmica lateral; PaMP, subnúcleo paraventricular do hipotálamo; PST, núcleo pré-parasubtalâmico; ZI, zona incerta; 3V, terceiro ventrículo.

animais submetidos à deposição iontoforética do fluorogold no DMV, apenas três animais exibiram sítios centrais de deposições no DMV, sendo que as deposições alcançaram a parte caudal ou média (Figura 10). Em dois casos deve ter ocorrido discreta contaminação do subnúcleo medial do núcleo do trato solitário (Figura 10). Por outro lado, os casos de insucesso na deposição do traçador neuronal foram em decorrência de moderada ou severas contaminações do núcleo do trato solitário ou do núcleo motor do nervo hipoglosso, impossibilitando o uso desses animais para o estudo proposto.

5.3.2. Aferências diencefálicas para o DMV

Os territórios diencefálicos que enviam fibras nervosas para o DMV são escassos, sendo os principais o núcleo paraventricular do hipotálamo (subnúcleos medial e posterior) (Figura 11), área hipotâlamica lateral (parte lateral e dorsal das regiões anterior e tuberal) (Figura 11). Além disso, outras áreas hipotalâmicas apresentaram raros neurônios marcados com o traçador neuronal, tais como a parte medial do hipotálamo, em particular no núcleo periventricular relacionado ao PVN e Arqueado, núcleo arqueado do hipotálamo e núcleo hipotalâmico posterior. Aferências diencefálicas extra-hipotalâmicas que também apresentaram alguns neurônios marcados foram o núcleo central da amígdala e o núcleo do leito da estria terminal.

Entre as áreas hipotalâmicas mencionadas anteriormente, alguns poucos neurônios que foram marcados retrogradamente com o traçador neuronal fluorogold exibiram OXA-ir ou MCH-ir, 30%±8 e 30%±3, respectivamente (Figura 12). Esses neurônios duplamente marcados estavam alojados principalmente nas partes lateral (núcleo pré-parasubtalâmico) e dorsal da área hipotâlamica lateral situada nas regiões tuberal e mamilar do hipotálamo (Figura 12).



Figura 12. Fotomicrografia em microscopia de epifluorescência mostrando cortes histológicos frontais do diencéfalo destacando os neurônios que enviam aferentes para o DMV e que são MCH-ir e OXA-ir. Esses neurônios foram identificados pelo método da dupla imunofluorescência indireta (método da eluição) empregando anticorpo secundário marcado com DTAF ou strepatavidina-Cy³. Em A-D são mostrados neurônios identificados com o anticorpo anti-fluorogold, enquanto em A'-B' são mostrados neurônios MCH-ir e C'-D' são mostrados neurônios OXA-ir. A/C e B/D representam campos visuais das partes dorsal e lateral da área hipotalâmica lateral, respectivamente. As setas mostram alguns dos neurônios duplamente marcados (FG+MCH e FG+OXA). Abreviaturas: B, bregam; D, dorsal; f, fórnix; IC, cápsula interna; L, lateral; LH, área hipotalâmica lateral; LHAd, área hipotalâmica lateral; PST, núcleo pré-parasubtalâmico.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho de neuroanatomia química adicionou dados quanto ao padrão da inervação imunorreativa aos peptídeos orexigênicos OXA e MCH no núcleo motor dorsal do nervo vago (DMV) de ratos Wistar, dando ênfase à interação morfológica entre esses componentes neurais com os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos, envolvidos com a inervação dos principais segmentos do trato gastrointestinal. Além disso, os territórios diencefálicos que enviam projeções OXA-ir ou MCH-ir, para o DMV, também foram melhor elucidados.

6.1. Considerações iniciais

Vale ser ressaltado que durante o desenvolvimento da parte experimental do presente trabalho de pesquisa, um grupo de pesquisadores liderados pelo Dr. Hans-Rudolf Berthoud (Louisiana State University, USA) publicaram estudos enfocando os sistemas neuropeptidérgicos da OXA (Zheng et al., 2005a) e do MCH (Zheng et al., 2005b) no complexo dorso-vagal. Esses estudos adicionaram dados morfo-funcionais realçando a importância desses sistemas neuropeptidérgicos no controle sensoro-motor do trato gastrointestinal. Contudo, uma abordagem enfocando especificamente o DMV, como tínhamos proposto em nosso projeto de pesquisa (Theodoro-Andrade e

Casatti, 2004), não foi contemplada (Zheng et al., 2005a, 2005b), consequentemente, não permitindo concluir a exata correlação do DMV com os sistemas neuropeptidérgicos da OXA e do MCH. Além disso, a comprovação morfológica da interação entre a inervação OXA-ir e MCH-ir com os neurônios que inervam o trato gastrointestinal ainda estava em aberto. Desse modo, prosseguimos no nosso trabalho experimental, com o intuito de elucidarmos essas questões.

Finalmente, para complementarmos nosso estudo morfológico, também tínhamos proposto uma análise ultra-estrutural da interação morfológica dos terminais nervosos OXA-ir e MCH-ir com os neurônios do DMV, envolvidos com a inervação do trato gastrointestinal. Para isso, pretendíamos empregar o método da dupla imunoperoxidase "preembedding" e "postembedding", seguido da análise em microscopia eletrônica de transmissão. Entretanto, esse importante estudo ultra-estrutural não foi completamente concluído, em virtudes de aspectos temporais.

6.2. O núcleo motor dorsal do nervo vago

A importância do DMV está diretamente relacionada com sua função de atuar como um dos núcleos pré-ganglionares parassimpáticos rostrais do SNC, juntamente com os núcleos salivatórios superior e inferior, núcleo de Edinger-Westphal e núcleo ambíguo (Travagli et al., 2006; Berthoud, 2008b). Porém, os órgãos periféricos

que estão sob controle modulatório do DMV são indispensáveis para a sobrevivência, tais como o músculo cardíaco, trato gastrointestinal infra-diafragmático e glândulas anexas, entre outros (Powley, 2000a; Travagli et al., 2006; Berthoud, 2008a). Com relação ao tubo gastrointestinal, o DMV envia fibras nervosas pré-ganglionares para os gânglios intramurais viscerais, regulando a motilidade gástrica e a secreção (Travagli et al., 2006). Interessantemente, o DMV imprime uma atividade tônica nos neurônios ganglionares intramurais, que podem ser fracamente influenciados pela atividade dos neurônios pré-ganglionares simpáticos (Powley, 2000b; Travagli et al., 2006; Berthoud, 2008b). A modulação dessas atividades no trato gastrointestinal colabora no processo de ingestão alimentar, absorção de nutrientes e saciabilidade, contribuindo com a regulação do peso corporal (Berthoud, 2008a). O DMV recebe aferências de inúmeras estruturas do SNC de integração sensoro-motora relacionadas com o comportamento alimentar, sendo as mais importantes em termos de densidade de aferências, o núcleo paraventricular do hipotálamo, a área hipotalâmica lateral, além de receber aferências do núcleo do trato solitário, um dos principais relés sensoriais de convergência das informações sensoriais do trato gastrointestinal (Saper et al., 1976a; Swanson e Sawchenko, 1983; Loewy, 1991; Broberger e Hökfelt, 2001; Thompson e Swanson, 2003). Desse modo, o DMV está em uma posição central uma vez que atua como uma estação motora dos centros de integração e modulação do comportamento alimentar,
exercendo de fato uma regulação das atividades do trato gastrointestinal e de suas glândulas anexas (Powley et al., 2000b).

Atualmente, o DMV também tem recebido destaque pelo seu possível envolvimento na doença de Parkinson idiopática (Lerner e Bagic, 2008). Nessa doença degenerativa, as primeiras áreas comprometidas são o DMV e o núcleo olfatório anterior, seguida da progressão que finalmente acomete a parte compacta da substância negra (Lerner e Bagic, 2008). Além disso, existem indícios de alterações no DMV em indivíduos acometidos pela doença de Parkinson típica, além das modificações nos neurônios parassimpáticos intramurais, haja vista que os distúrbios gastrointestinais são frequentes nessa disfunção neurológica (Natale et al., 2008).

6.3. Padrão de inervação OXA e MCH no núcleo motor dorsal do nervo vago

O método da imunoperoxidase indireta, seguido da impregnação pela Ag/Au das fibras e terminais nervosos OXA-ir ou MCH-ir permitiram uma clara evidenciação desses elementos neurais em microscopia de campo claro ou campo escuro. Inclusive fibras e terminais nervosos delgados também foram realçados, os quais não são adequadamente discerníveis com a revelação tradicional, sem a impregnação pela Ag/Au (de Lacalle et al., 1993). Um dos inconvenientes da impregnação pela Ag/Au é a possibilidade da intensificação da marcação de fundo, quando previamente presente.

Nossos dados morfológicos da inervação OXA-ir e MCH-ir evidenciaram alguns padrões de terminações nervosas que têm sido mostrados nos trabalhos clássicos da distribuição sistemática desses neuropeptídeos no SNC (Bittencourt et al., 1992; Peyron et al., 1998). Esses padrões de terminações nervosas MCH-ir foram mais detalhados em regiões específicas do SNC, como exemplo, no núcleo septal medial (Elias e Bittencourt, 1997), medula espinal (Elias e Bittencourt, 1997), substância cinzenta periaquedutal (Elias et al., 1998), núcleo mamilar medial (Casatti et al., 2002), medula dorsal (Zheng et al., 2005b), córtex motor (Elias et al., 2008), núcleo tegmental pedunculopontino (Elias et al., 2008), entre outros. O mesmo pode ser afirmado guanto à presença e detalhamento desses padrões de terminações nervosos OXA-ir em áreas específicas do SNC, como exemplo, no núcleo tuberomamilar (Torrealba et al., 2003), núcleo intermédio-lateral (Llewellyn-Smith et al., 2003), área póstrema (Guan et al., 2005), núcleo mesencefálico do nervo trigêmeo (Stoyanova e Lazarov, 2005), medula dorsal (Zheng et al., 2005a), núcleo dorsal da rafe (Wang et al., 2005) e núcleo paraventricular do tálamo (Parson et al., 2006), entre outros. Assim sendo, a terminação nervosa do tipo varicosa ou exibindo botões terminais colaterais foram as mais comumente observadas, enquanto as terminações nervosas ramificadas com botões terminais dilatados foram menos frequentes.

A presença desses terminais nervosos comprova que a OXA e o MCH são liberados no DMV e, possivelmente, atuam em seus receptores posicionados nos neurônios locais, uma vez que tem sido comprovada a presença de receptores OXA-R1, OXB-R2 e MCH-R1 nesse núcleo (Marcus et al., 2001; Sunter et al., 2001; Krowicki et al., 2002). Os receptores Ox-R1 foram visualizados exatamente nos neurônios do núcleo motor dorsal do nervo vago que enviam fibras nervosas para o estômago (Krowicki et al., 2002; Okumura e Takakusaki, 2008).

A ausência de dados ultra-estruturais não permitem concluir se as dilatações axônicas visualizadas estão associadas às sinapses típicas com os elementos póssinápticos e, se esses neuropeptídeos estão restritos às vesículas sinápticas largas e densas (LDCV, "Large dense core vesicles"), que carreiam os neuromediadores neuropeptidérgicos. Em um clássico trabalho da distribuição dos neurônios e fibras nervosas MCH-ir no SNC de ratos, foi demonstrado que a imunorreatividade ao MCH estava presente principalmente nas LDCV, não obstante também foram visíveis nas vesículas sinápticas pequenos elétron-lucentes (Bittencourt et al., 1992). Essas últimas vesículas sinápticas segregam preferencialmente os neuromediadores clássicos não peptidérgicos, tais como glutamato e GABA (Torrealba e Carrasco, 2004; Salio et al., 2006).

Por outro lado, também existe a possibilidade de que a OXA e o MCH possam se difundir desses terminais nervosos e atuarem localmente, porém, sem a necessidade da existência de sinapse morfológica, semelhante a uma secreção parácrina (Torrealba e Carrasco, 2004; Salio et al., 2006). Finalmente, não pode ser eliminada a possibilidade da OXA e do MCH apresentarem uma acentuada difusão pela matriz extracelular e atuarem nas áreas adjacentes ao DMV, como exemplo para o núcleo do trato solitário e vice-versa, através do mecanismo de transmissão por volume, como tem sido sugerido e comprovado para inúmeros neuropeptídeos no SNC (Torrealba e Carrasco, 2004; Agnati et al., 2006; Salio et al., 2006).

As terminações nervosas OXA-ir e MCH-ir alcançam o DMV, através de fibras nervosas que trafegam ao redor do canal central da medula e, principalmente, por intermédio de fibras nervosas que trafegam nos núcleos reticulares, situados lateralmente ao DMV. A partir dos núcleos reticulares, essas fibras nervosas cursam medialmente em direção ao DMV. Esses achados comprovam estudos neuroanatômicos que demonstram que a área hipotalâmica lateral, o principal grupo neuronal que apresenta neurônios OXA-ir e MCH-ir, envia fibras nervosas descendentes para a medula por três sistemas de projeções axonais: periventricular, trato mamilo tegmental e feixe cerebral medial (Hosoya e Matsushita, 1981; Berk e Finkelstein, 1982). As fibras do sistema periventricular trafegam pela substância cinzenta periaquedutal podendo se estender até a medula, distribuindo fibras nervosas para os territórios que circunscrevem o aqueduto cerebral, terceiro ventrículo e o canal medular (Hosoya e Matsushita, 1981; Berk e Finkelstein, 1982). Enquanto o sistema do trato feixe cerebral medial alcança a formação reticular, pontina e medular, e emite fibras nervosas que cursam dorso-medialmente para o núcleo do trato solitário e o DMV (Hosoya e Matsushita, 1981; Berk e Finkelstein, 1982). Nos clássicos trabalhos da distribuição de fibras nervosas OXA-ir e MCH-ir são citados os sistemas descendentes dorsal e ventral de fibras nervosas que podem alcançar a medula dorsal, corroborando nossos achados morfológicos (Bittencourt et al., 1992; Peyron et al., 1998).

A densidade de inervação OXA-ir e MCH-ir no DMV tem sido pobremente discutida em trabalhos preliminares (Bittencourt et al., 1992; Peyron et al., 1998; Cutler et al., 1999; Zheng et al., 2005a, 2005b). Esses trabalhos não apresentaram uma análise quantitativa, impossibilitando de fato uma avaliação comparativa entre os dois padrões de densidade de inervação desses neuropeptídeos orexigênicos (Bittencourt et al., 1992; Peyron et al., 1998; Cutler et al., 1999; Zheng et al., 2005a).

Em um estudo tem sido mencionado que a inervação OXA-ir está distribuída por toda a extensão da parte caudal do DMV, esparsamente na parte média, enquanto na parte rostral há uma preponderância de inervação nas proximidades do terceiro ventrículo (Zheng et al., 2005a). Por outro lado, a inervação MCH-ir apresentou maior densidade na parte rostral (Zheng et al., 2005b).

Em nosso estudo, realizamos uma quantificação detalhada em três animais, incorporando para análise, ambos os núcleos (esquerdo e direito) em toda sua extensão rostro-caudal. Uma considerável diferença metodológica, instituída em nosso trabalho, foi a delimitação do perímetro citoarquitetônico do DMV, baseada nas análises citoarquitetônicas dos cortes histológicos corados pelo método de Nissl e quanto ao padrão de distribuição dos neurônios retrogradamente marcados com fluorogold. Essas referências morfológicas permitiram uma identificação fidedigna da total extensão dos pericários e da árvore dendrítica proximal desses neurônios. Esses parâmetros morfológicos mostraram que os limites citoarquitetônicos do DMV, em nosso estudo, são mais amplos e não coincidem com aqueles supostamente seguidos nos trabalhos prévios (Zheng et al., 2005a, 2005b). Estes autores se limitaram à uma análise baseada apenas em dados citoarquitetônicos do Atlas de Paxinos e Watson (1998), cuja delimitação nuclear não abrange toda a extensão látero-medial do DMV. Interessantemente, até 30% dos neurônios no DMV apresentam prolongamentos dendríticos dorsais que invadem o território citoarquitetônico do núcleo do trato solitário, inclusive alguns desses recebem aferências primárias dos neurônios sensoriais que inervam o trato gastrointestinal (Shapiro e Miselis, 1985; Rinaman et al., 1989; Fox e Powley, 1992; Jarvinen e Powley, 1999). Isso permite que o DMV possa ser modulado por aferências sensoriais viscerais que estão preferencialmente estabelecendo conexões sinápticas com os neurônios do núcleo do trato solitário. Além disso, através da transmissão retrógrada dendrítica (Salio et al., 2006), pode ser sugerido que os dendritos dos neurônios no DMV podem secretar inúmeros neuromediadores neuropeptidérgicos que modulam a atividade dos neurônios do núcleo do trato solitário.

Nossos dados, demonstraram que a densidade de inervação OXA-ir é aproximadamente 50% maior em relação ao MCH. Por outro lado, a inervação OXA-ir é consistente em toda extensão rostro-caudal do DMV, com uma ligeira diminuição somente na parte média. Com relação à inervação MCH-ir, apesar de apresentar menor densidade de fibras e terminais nervosos por área, também mostrou um padrão similar de distribuição. No entanto, a inervação MCH-ir torna-se esparsa na parte média, com alguns poucos perfis de fibras e terminais nervosos visíveis na parte lateral do DMV. Outro aspecto é que a inervação MCH-ir está distribuída principalmente na lateral de toda extensão rostro-caudal do DMV, com exceção de sua parte mais caudal, onde a distribuição é mais homogênea.

Interessantemente, tem sido mencionado que 95% dos neurônios do DMV são imunorreativos à enzima colina acetil-transferase, enquanto os demais apresentam imunorreatividade à oxido nítrico sintase (nitric oxide synthase – NOS) ou tirosina hidroxilase (tyrosine hidroxylase – TH) (Krowicki et al., 1997; Guo et al., 2001; Tsukamoto et al., 2005). Nessa última classe neuroquímica, os neurônios que estão situados nas partes caudal e rostro-lateral do DMV são responsáveis pela inervação do estômago e do esfíncter diafragmático do esôfago e, coincidem com as áreas de maior densidade de inervação MCH-ir. (Krowicki et al., 1997; Hyland et al., 2001; Travagli et al., 2006). Estudos funcionais revelaram que a ativação desses neurônios induz relaxamento gástrico levando a um estado de saciedade que inibe o processo de

ingestão alimentar (Krowicki et al., 1997; Berthoud, 2008a). Isto posto, é de se supor que as terminações nervosas MCH-ir nessas áreas assumam um papel de inibir esses neurônios NOS-ir ou TH-ir com o intuito de induzir contração gástrica, e consequentemente estimular a ingestão alimentar, haja visto que o MCH é um potente peptídeo orexigênico de ação aguda (Nahon et al., 2006). Por outro lado, estudo recente demonstrou que os neurônios colinérgicos rostrais e caudais, que representam 95% da população total de neurônios do DMV, são potencialmente capazes de induzir contração e relaxamento gástrico, respectivamente (Zhou et al., 2008).

A capacidade desses neurônios colinérgicos do DMV em induzir diferentes respostas na atividade contrátil do estômago se deve ao padrão de interação de suas terminações nervosas nos neurônios ganglionares intramurais (Berthoud, 2008b; Zhou et al., 2008). Assim sendo, têm sido mostrado que os neurônios colinérgicos rostrais atuam nos neurônios colinérgicos ganglionares, enquanto os neurônios colinérgicos caudais atuam nos neuronios ganglionares não adrenérgicos e não colinérgicos (non-adrenergic, noncholinergic – NANC) que são imunorreativos a NOS e ao peptídeo intestinal vasoativo (vasoactive intestinal polypeptide - VIP) (Takahashi e Owyang, 1995; Travagli et al., 2006; Berthoud, 2008b; Zhou et al., 2008). Essa especificidade de interação é que permite esse efeito dual dos neurônios colinérgicos no DMV. Nesse caso, é de se supor que as terminações nervosas MCH-ir tenham uma ação peculiar, sendo estimulante e inibitório nas partes rostrais e caudais do DMV, respectivamente.

Essa inferência se baseia apenas se considerarmos unicamente a atividade MCH sem a interação dos outros neuromediadores locais. Essa possível atividade dúbia do MCH pode ocorrer em virtude da atividade diferencial dos neurônios hipotalâmicos de origem para o DMV, resultando em uma liberação tônica desigual desse neuropeptídeo na parte caudal e rostral do DMV.

Um mecanismo de ação comprovado do MCH no complexo dorso-vagal seria através da redução da atividade glutaminérgica dos aferentes sensoriais nos neurônios do núcleo do trato solitário (Zheng et al., 2005b), sem contudo especificar o que representaria tal inibição no DMV, em termos do controle gástrico. Esses mesmos autores sugeriram que o MCH não teria uma comprovada ação de estimular a ingestão alimentar no complexo dorso-vagal e, somente as projeções MCH-ir para as áreas prémotoras simpáticas que inervam o tecido adiposo abdominal, poderiam exercer uma real função no balanço energético (Zheng et al., 2005b). Portanto, uma possível função modulatória da inervação MCH-ir no DMV ainda necessita de dados concretos para possíveis inferências, haja vista da presença das terminações nervosas MCH-ir e a ausência de dados funcionais. Não obstante, devemos considerar que o sistema neuropeptidérgico do MCH no complexo dorso-vagal pode estar também atuando na modulação do sistema cardio-circulatório, levando a uma resposta bradicardiaca e depressora da pressão arterial (Brown et al., 2007).

Aparentemente, considerando os dados da densidade de inervação OXA-ir, esse neuropeptídeo deve exercer uma atividade mais efetiva no DMV em comparação ao sistema MCH. Estudos funcionais que analisaram a deposição de OXA no quarto ventrículo ou no complexo dorso-vagal mostraram um significante aumento na ingestão alimentar e na secreção gástrica dependente da via vagal intacta (Yamanaka et al., 1999; Takahashi et al., 1999; Zheng et al., 2005a). Existem dados mostrando que a deposição de OXA no DMV rostral resulta em contração gástrica persistente e, consequentemente, estimula a ingestão alimentar (Krowicki et al., 2002). Por outro lado, a deposição de OXA na parte caudal não resultou em alterações significantes (Krowicki et al., 2002).

A deposição icv de orexina resulta no aumento da imunorreatividade da proteína Fos, marcador da atividade neuronal, no núcleo do trato solitário e no DMV (Date et al., 1999). Dados eletrofisiológicos apontaram que a OXA tem capacidade de despolarizar os neurônios do DMV que suprem, principalmente, o estômago e raramente os demais segmentos caudais do trato gastrointestinal (Grabauskas et al., 2003). Outros dados eletrofisiológicos mostram que o OXA tem capacidade de inibir ou excitar os neurônios do DMV e que essa atividade parece depender da necessidade ingestiva do animal em um determinado momento (Davis et al., 2003).

A combinação desses dados da literatura aponta para uma efetiva ação da OXA no DMV, mostrando que a inervação OXA exerce uma atividade local na

modulação da ingestão alimentar. A ausência de resultados apontando uma substancial ação da OXA na parte caudal do DMV pode ser decorrente de que nesses locais a OXA está relacionada a outras atividades como controle do esfíncter esofágico, motilidade e secreção nos demais segmentos do trato gastrointestinal que ainda não foram completamente avaliados (Grabauskas et al., 2003).

6.4. Interação entre terminais nervosos OXA-ir ou MCH-ir com neurônios do DMV que inervam as paredes ventrais do esôfago abdominal, estômago e segmento inicial do duodeno

Em nosso estudo, conseguimos marcar retrogradamente com fluorogold os neurônios do DMV que enviam fibras nervosas para a parede ventral da parte do esôfago abdominal, estômago (fundo, corpo e região do antro-pilórica) e do segmento inicial do duodeno. O propósito das deposições na parede ventral desses territórios foi para evitar possível difusão do traçador neuronal para as vísceras adjacentes. Além disso, nosso intuito foi marcar um número de neurônios que permitisse uma análise adequada quanto à interação com as terminações nervosas OXA-ir ou MCH-ir no DMV, sendo que em nenhum momento tínhamos metas de compararmos quantitativamente, através de análises estereológicas, a densidade dessa interação entre os determinados segmentos do trato gastrointestinal. Assim sendo, acreditamos que conseguimos obter

uma parcela de neurônios que correspondem satisfatoriamente à representação de inervação de cada segmento do trato gastrointestinal no DMV.

A quantidade de neurônios marcados com fluorogold foi extremamente variável entre os segmentos analisados, contudo a população de neurônios do DMV que enviam fibras nervosas para o estômago foi elevada. Isto está de acordo com dados da literatura que apontam que 80% dos neurônios do DMV enviam fibras nervosas para o estômago (Berthoud et al., 1991; Krowicki et al., 2002). Por outro lado, a marcação dos neurônios que inervam o esôfago foi significativa, possivelmente em decorrência da difusão do traçador neuronal na região do esfíncter diafragmático que aparentemente deve ser a área mais densamente inervada do terço inferior do esôfago pelo DMV. Finalmente, a inervação do segmento inicial do duodeno mostrou uma discreta marcação. Em um estudo similar no qual outro traçador neuronal, subunidade b da toxina colérica (CTb), foi depositado nesses segmentos mostrou uma distribuição relativa similar, com inúmeros neurônios do DMV inervando o estômago e alguns poucos inervando o duodeno (Tsukamoto et al., 2005). Em nosso estudo, os neurônios estavam distribuídos em toda a extensão rostro-caudal, diferentemente do trabalho empregando CTb que revelou neurônios restritos à metade caudal do DMV (Tsukamoto et al., 2005). Essas discrepâncias devem ser decorrentes da quantidade e capacidade de difusão dos traçadores neuronais empregados, permitindo uma variação significante

na abrangência da área de deposição e, consequentemente, na incorporação desses traçadores.

Por outro lado, existem inúmeros estudos que avaliaram a distribuição dos neurônios que inervam o esôfago, estômago e duodeno, entretanto utilizando-se da incubação dos ramos do nervo vago responsáveis pela inervação desses segmentos viscerais com traçadores neuronais retrógrado. Desse modo, os traçadores neuronais retrógrados fluorescentes true blue, fast blue ou a peroxidase do rabano silvestre (HRP) foram utilizados com ampla eficiência (Fox e Powley, 1985; Norgren e Smith, 1988; Fox e Powley, 1992). Os dados desses estudos, seguramente, resultaram em um maior número de neurônios marcados no DMV, mas em termos proporcionais é possível averiguar que os ramos nervosos responsáveis pela inervação do esôfago (ramo gástrico) e estômago (ramo gástrico e hepático) apresentaram uma maior densidade de neurônios em comparação com aquele responsável pela inervação do duodeno (ramo celíaco) (Fox e Powley, 1985; Norgren e Smith, 1988; Fox e Powley, 1992). Além disso, a distribuição neuronal foi presente em toda a extensão rostrocaudal do DMV, similarmente aos achados de nosso estudo.

Em termo de morfologia neuronal, pudemos observar que a deposição de traçador neuronal retrógrado nos segmentos do trato gastrointestinal resultou em marcações de diferentes tipos neuronais. A presença desses tipos neuronais, ou seja, multipolar com maior área superficial, fusiforme e oval com menor área superficial, estão de acordo com estudos intensivos quanto à morfologia dos neurônios no DMV (Fox e Powley, 1992; Jarvinen e Powley, 1999). Entretanto, naqueles estudos existem dados quanto às características da árvore dendrítica, além de mencionarem a presença de um tipo de interneurônio com discreto diâmetro, indistinguíveis em nosso estudo (Fox e Powley, 1992; Jarvinen e Powley, 1999).

Com relação às dimensões dos neurônios marcados com fluorogold, observamos que estes estão de acordo com a literatura, ou seja, a maior parte apresenta área superficial de 200 a 600 µm² (Fox e Powley, 1992; Fogel et al., 1996).

O principal dado de neuronatomia química que acrescentamos quanto à marcação dos neurônios no DMV foi suas correlações com as terminações nervosas OXA-ir e MCH-ir. Nossa metodologia de dupla imunoperoxidase indireta mostrou-se adequada para esses fins, apesar de empregarmos os anticorpos primários obtidos na mesma espécie animal, ou seja, tanto o anticorpo policlonal anti-fluorogold, assim como os anticorpos policlonais anti-OXA e MCH foram obtidos em coelho. Isto, em parte, poderia comprometer nossos resultados, uma vez que os anticorpos secundários anti-coelho, obtidos em cabra, não distinguiriam diferentemente os anticorpos primários. Esse aspecto seria um fator negativo, caso os anticorpos primários identificassem os antígenos nos mesmos compartimentos celulares, ou seja, ambos distribuídos no pericário ou no segmento axonal. Em nosso caso, a imunorreatividade ao fluorogold está restrita ao pericário de neurônios e dendritos proximais, enquanto a

imunorreatividade à OXA e MCH estava restrita ao compartimento axonal. Além dessa diferença, empregamos dois cromógenos diferentes, VIP para revelação dos pericários em coloração roseada e DAB intensificado ou não com níquel que resultou em terminais nervosos castanhos ou castanho-escuros. Outro aspecto diferencial foi que a imunoperoxidase indireta foi sequencial, primeiro para identificar as terminações nervosas OXA-ir e MCH-ir e em prosseguimento, para identificar os neurônios com fluorogold. Essa última revelação foi realizada cuidadosamente a fim de evitar que o cromógeno se depositasse densamente e resultasse em dendritos proximais densamente corados. Métodos similares de dupla imunoperoxidase tem sido utilizados e conseguiram discernir com segurança os marcadores celulares, quando estes estavam posicionados em compartimentos celulares distintos (Nemes, 1987).

Nossos dados de dupla imunoperoxidase indireta no DMV demonstraram que as terminações nervosas OXA-ir ou MCH-ir estabelecem íntimos contatos com os neurônios que inervam principalmente o esôfago e estômago e, raramente o duodeno. Na maior parte das interações foi possível identificar os botões dilatados associados aos pericários ou dendritos proximais.

Esses perfis de interação neural foram mais frequentes com a inervação OXA-ir, uma vez que a densidade dessa inervação é 50% mais elevada em relação à inervação MCH-ir. Aliado a isso, essa interação também é comumente visualizada com os neurônios que inervam o esôfago e estômago em virtude de representarem uma população quantitativamente maior. A parte intermédia do segmento médio do DMV apresentou a menor frequência de interação em razão da menor densidade de inervação OXA-ir e quase ausência da inervação MCH-ir.

Sabidamente, essa interação neural foi a primeira verificação direta entre a inervação OXA-ir ou MCH-ir com neurônios do DMV que inervam o trato gastrointestinal. Estudos preliminares sugeriram essa interação, inicialmente em virtude da presença de ambas as inervações neuropeptidérgicas no complexo dorso-vagal (Bittencourt et al., 1992; Peyron et al., 1998). Em seguida, a expressão dos receptores Ox-R1, Ox-R2 e MCH-R1 no DMV, indiretamente sugerem a existência de sinapses entre terminais nervosos OXA-ir ou MCH-ir com os neurônios que inervam o tubo gastrointestinal (Marcus et al., 2001; Sunter et al., 2001; Krowicki et al., 2002). Dados mais concretos foram mostrados através da presença de receptores OXA-R1 em neurônios do núcleo motor dorsal do nervo vago que enviam fibras nervosas para o estômago (Krowicki et al., 2002; Okumura e Takakusaki, 2008).

Entretanto, inúmeras áreas do SNC mostram algumas discrepâncias entre inervação neuropeptidérgica e presença de receptor, ou seja, apresentam a expressão de receptores para OXA-R1 e MCH-R1, contudo é nítida a ausência de terminações nervosas OXA-ir e MCH-R1. Nesses casos é provável que esses neuropeptídeos se difundam a partir de áreas adjacentes com densa inervação OXA-ir ou MCH-ir para as áreas ricas na expressão dos receptores OXA-R1 ou MCH-R1. A transmissão sináptica nessas situações independe da sinapse morfológica clássica e está sedimentada na "transmissão em volume" típica quando o neuromediador pertence à classe dos neuropeptídeos. A transmissão em volume resulta em uma ação modulatória de longa duração. Portanto, a detecção de receptores OXA-R1 nos neurônios do DMV que enviam fibras nervosas para o estômago poderiam também indicar uma área na qual se estabelece a transmissão em volume, em virtude da densa inervação OXA-ir e MCH-ir no núcleo do trato solitário, situado dorsalmente ao DMV, hipótese que poderíamos descartar pelos nossos resultados morfológicos.

Alguns dados morfológicos prévios também sugeriram a interação entre terminações nervosas OXA-ir ou MCH-ir com neurônios relacionados com o processamento da informação sensoro-motoro do tubo gastrointestinal (Zheng et al., 2005a, 2005b). Em um desses estudos foi induzida a expressão da proteína Fos no complexo dorso-vagal, através da deposição de OXA no quarto ventrículo, que sabidamente atua como um neuromediador excitatório no complexo dorso-vagal. Em seguida, foi demonstrada a presença das terminações nervosas OXA-ir trafegando entre alguns poucos neurônios que exibiam a proteína c-Fos nuclear no DMV (Zheng et al., 2005a). Em outro estudo, a expressão da proteína c-Fos no complexo dorso-vagal foi induzida através da infusão de nutrientes no trato gastrointestinal. Entretanto, a expressão da proteína *fos* foi discreta e limitada na parte caudal do DMV, onde foi possível observar algumas terminações nervosas MCH-ir em proximidade com esses

neurônios expressando *fos*. Entretanto, esses dados morfológicos entre terminais nervosos OXA-ir ou MCH-ir com neurônios fos-ir não são suficientes para afirmar que os últimos estão relacionados com a inervação do trato gastrointestinal. Isto em virtude que estes neuropeptideos podem estar estabelecendo contatos sinápticos com neurônios envolvidos com o controle cardíaco (de Oliveira et al., 2003; Brown et al., 2007).

6.5. Aferências diencefálicas OXA-ir ou MCH-ir para o DMV

Com o intuito de identificar precisamente as aferências diencefálicas para o DMV, empregamos a metodologia de deposição iontonforética do traçador neuronal retrógrado fluorogold no DMV, seguido pela visualização desses neurônios pela técnica da imunofluorescência indireta, usando anticorpo primário anti-fluorogold. Em prosseguimento, os cortes histológicos foram submetidos ao tratamento ácido (método da eluição – Tramu et al., 1978) para remoção do complexo anticorpo primário antifluorogold/ anticorpo secundário; e processados para a segunda reação de imunofluorescência indireta com anticorpos primários anti-OXA ou anti-MCH. Isso permitiu a identificação precisa dos neurônios imunorreativos ao fluorogold que expressam a OXA-ir ou MCH-ir. Alguns aspectos metodológicos carecem de considerações. Inicialmente, devemos salientar que o DMV apresenta área de transecção frontal discreta em toda sua extensão rostro-caudal. Essa característica dimensional dificulta a obtenção de deposição estereotáxica iontonforética de traçador neuronal limitada ao território do DMV e, portanto, o índice de sucesso nesse procedimento é reduzido, em torno de 5%. Outra característica intrínseca que compromete as deposições de traçador neuronal no complexo dorso-vagal é a elevada difusibilidade do traçador pelo núcleo do trato solitário, mesmo quando este foi discretamente contaminado pelo sítio central de deposição. Desse modo, nós percebemos que em inúmeros casos de insucessos, o sítio central de deposição iontoforética estava com quase a sua totalidade abrangendo o DMV e discretamente contaminou o núcleo do trato solitário. Independente disso, o traçador neuronal difundiu-se intensamente pelo núcleo do trato solitário, enquanto que sua difusão pela área do DMV foi menos intensa.

Apesar desses inconvenientes, os casos selecionados para análise compreenderam três animais cujos sítios de deposição estavam totalmente centrados no DMV. Entretanto, em dois desses casos é possível observar uma discreta contaminação da parte ventral do núcleo do trato solitário, somente na altura do sítio de deposição e não nas extensões rostro-caudais desse núcleo. Estes casos de deposições no DMV foram excelentes, comparados com os trabalhos que estudaram as aferências para o complexo dorso-vagal, através de deposições de traçador

neuronal retrógrado (Rogers et al., 1980; Sawchenko e Swanson, 1982; Berthoud et al., 1990; Zheng et al., 2005a; 2005b). Nos trabalhos de aferências diencefálicas OXA-ir ou MCH-ir para o complexo dorso vagal, as áreas de abrangências das injeções de CTb foram extensas e nos três casos apresentados pelos autores, existiam contaminações no núcleo do trato solitário, parte dorsal do núcleo motor do hipoglosso, área póstrema em sua totalidade, além dos núcleos cuneiforme e grácil (Zheng et al., 2005a; 2005b). Possivelmente, isso possa ter ocorrido em virtude daqueles aspectos da difusibilidade da matriz extracelular do complexo dorso-vagal, associado ao fato das injeções de CTb terem sido realizadas por pressão e não pelo mecanismo de iontoforese (Zheng et al., 2005a; 2005b). Aliado a isso, esses autores realizaram múltiplas injeções rotro-caudal no mesmo animal a fim englobar todo o complexo dorso-vagal (Zheng et al., 2005a; 2005b). Assim sendo, a quantidade de neurônios aferentes diencefálicos marcados retrogradamente foi consideravelmente maior em relação ao nosso estudo (Zheng et al., 2005a; 2005b).

Um segundo aspecto metodológico a ser considerado se refere a metodologia da dupla imunofluorescência indireta, através do emprego de anticorpos primários obtidos na mesma espécie animal, como discutido na subsecção anterior. No caso dos neurônios diencefálicos, ambos os anticorpos poderiam identificar os antígenos situados no mesmo compartimento celular (pericário de neurônios), inviabilizando o emprego da metodologia de dupla imunoperoxidase indireta sequencial

83

com cromógenos distintos. Um método que contorna esse inconveniente é o procedimento da dupla imunofluorescência indireta sequencial, com uma etapa intermediária que remove o complexo anticorpo primário / anticorpo secundário conjugado, formado na reação inicial de imunofluorescência indireta (Tramu et al., 1978). Essa metodologia é mais dispendiosa em termos temporais e necessita de outra etapa intermediária de incubação no anticorpo secundário, para averiguar o sucesso no tratamento ácido da remoção do complexo de anticorpos e, portanto, evitando resultados falso-positivos. Desse modo, quando executada com critérios o método da eluição é extremamente valioso (Bittencourt et al., 1992; Elias et al., 1998; Casatti et al., 2002).

No trabalho inicial não tínhamos o propósito de empregarmos o método da eluição, haja vista que o traçador neuronal retrógrado fluorogold é extremamente eficiente e emite intensa fluorescência (Schmued e Fallon, 1986; Chang et al., 1990). Entretanto, em virtude do longo tempo de estoque dos cortes histológicos em solução anti-congelante à -20C, a fluorescência natural do traçador neuronal desvaneceu, não restando outra opção metodológica para sua evidenciação.

Os territórios diencefálicos que enviam projeções para o DMV foram principalmente o núcleo paraventricular e a área hipotalâmica lateral, enquanto discretas populações de neurônios foram visualizadas no subnúcleo central da amígdala, núcleo do leito da estria terminal e, raramente, no núcleo arqueado do hipotálamo, núcleo posterior do hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal. Essas áreas de aferências para o DMV estão de acordo com trabalhos prévios, comprovando que o traçamento neuronal mostrou as aferências principais e secundárias em termos de quantidade de neurônios retrogradamente marcados (Saper et al., 1976b; Hopkins e Holstege, 1978; Nilaver et al., 1980; Rogers et al., 1980; Hosoya e Matsushita, 1981; Berk e Finkelstein, 1982; Sawchenko e Swanson, 1982; Swanson e Sawchenko, 1983; Van der Kooy et al., 1984; Gray e Magnuson, 1987; Loewy, 1991; Sim e Joseph, 1991; Valentino et al., 1995; Broberger e Hökfelt, 2001; Thompson e Swanson, 2003).

Um dado interessante foi a observação de neurônios marcados na parte mais lateral da área hipotalâmica lateral, situada nas regiões tuberal e mamilar do hipotálamo próximo a cápsula interna e ao núcleo subtalâmico. Esse dado anatômico parece coincidir com uma recente área do hipotálamo lateral denominada de núcleo parasubtalâmico que apresenta uma maciça projeção para o DMV, principalmente em suas partes rostral e média (Goto e Swanson, 2004). Esses autores empregaram o traçador neuronal anterógrado da leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* (PHAL) depositado nesse núcleo parasubtalâmico e a densidade de terminais nervosos no DMV foram extremamente elevada e, raramente, observadas em estudos com traçadores neuronais anterógrados visando os eferentes terminais no DMV (Goto e Swanson, 2004). Em um recente estudo de parcelamento da área hipotalâmica lateral, o núcleo parasubtalâmico apresenta uma extensão rostral denominada de núcleo pré-

parasubtalamico que aloja inúmeros neurônios MCH-ir (Swanson et al., 2005). Essa área não foi caracterizada em termos de aferências e eferências e, supostamente, corresponde a uma das áreas que encontramos neurônios duplamente marcados (imunorreativos ao fluorogold e ao MCH-ir), denominada de núcleo préparasubtalâmico da área hipotalâmica lateral (Swanson et al., 2005).

Nossos dados de dupla marcação para identificar neurônios marcados com fluorogold e OXA-ir mostraram que esses estavam restritos às partes dorsal e lateral da área hipotalâmica lateral. Esses resultados estão de acordo com o clássico trabalho da literatura que mostrou os neurônios OXA-ir alojados na parte ou núcleo perifornicial, partes dorsal e lateral da área hipotalâmica lateral posicionada na região tuberal do hipotálamo (Peyron et al., 1998). Em outros estudos das aferências OXA-ir para a medula dorsal ou complexo dorso-vagal, esses neurônios estavam distribuídos principalmente na parte medial, perifornicial e lateral da área hipotalâmica lateral (Harrison et al., 1999; Zheng et al., 2005a). Comparando com estes trabalhos, podemos afirmar que existem algumas diferenças básicas em nossos resultados: a) o discreto número de neurônios marcados com o traçador neuronal; b) a ausência de neurônios duplamente marcados nas partes medial e perifornicial da área hipotalâmica lateral; c) a elevada porcentagem de neurônios duplamente marcados com OXA-ir (30%±7). Seguramente, essas diferenças são em virtude das aferências para os demais núcleos do complexo dorso-vagal, tais como núcleo do trato solitário e área

póstrema; além das áreas adjacentes contaminadas pela difusão do traçador neuronal (Harrison et al., 1999; Zheng et al., 2005a; 2005b).

A atividade orexigênica da OXA na área hipotalâmica lateral tem sido amplamente estudada através de estudos com microinjeções desse peptídeo nesse local (Dube et al., 1999; Edwards et al., 1999; Sweet et al., 1999; Kotz et al., 2002; Thorpe et al. 2003; 2006). Interessantemente, a área hipotalâmica lateral induz um significante aumento na secreção gástrica possivelmente através das conexões neurais OXA-ir entre o hipotálamo e o núcleo dorsal do nervo vago, mediado pelos receptores OXA-R1 (Taché e Yang, 1990; Takahashi et al., 1999; Okumura et al., 2001). Além disso, os neurônios OXA-ir na área hipotalâmica lateral apresentam inúmeras conexões com outras áreas hipotalâmicas, relacionadas com a regulação do comportamento alimentar, podendo potencializar os efeitos dos demais peptídeos orexigênicos, tais como NPY e o MCH (Arora et al. 2006; Valassi et al. 2008). Os neurônios OXA da área hipotalâmica estabelecem contatos sinápticos recíprocos com os neurônios MCH-ir que por sua vez também expressam o receptor OXA-R1 (Broberger et al., 1998; Bäckberg et al., 2002). Esses neurônios hipotalâmicos apresentam um peculiar controle na atividade de descargas espontânea dos neurônios do DMV que são responsivos à distensão do trato gastrointestinal (Jiang et al., 2003), sendo que a maior parte dos neurônios do DMV foram inibidos pela estimulação elétrica daguela área. Enguanto, os neurônios do trato solitário foram estimulados (Jiang et al., 2003).

Com relação às aferências diencefálicas MCH-ir para o DMV, nossos dados estão ligeiramente discrepantes com o estudo Zheng et al (2005b). Esses autores revelam que essas aferências são oriundas principalmente da área hipotalâmica lateral, enquanto inúmeros outros territórios também exibiram neurônios duplamente marcados, tais como, partes anterior, medial, dorsomedial e ventral da área hipotalâmica lateral, além do núcleo paraventricular (Zheng et al., 2005b). Uma porcentagem de 25% dos neurônios retrogradamente marcados com o traçador neuronal exibiram MCH-ir (Zheng et al., 2005b), distribuídos principalmente na parte medial pré-parasubtalâmica da área hipotalâmica lateral. Em nosso trabalho, apenas a parte dorsal e lateral da área hipotalâmica lateral mostram neurônios duplamente marcados, sendo que estes representam uma população de 30%±8 da população total de neurônios retrogradamente merconal nessa área.

Nossos resultados apontam que os neurônios da parte dorsal e lateral da área hipotalâmica lateral, representam à única aferência diencefálica MCH-ir para o DMV. Como discutido anteriormente, a área hipotalâmica lateral aparenta exercer uma substancial ação modulatória no DMV. Esses dados sugerem que apesar de ambos os sistemas peptidérgicos apresentarem extensas projeções para o neuroeixo, aparentemente existe uma preponderância de determinados grupamentos neuronais OXA-ir ou MCH-ir na área hipotalâmica lateral e, nas demais áreas de expressão do MCH, em estabelecerem conexões específicas que deve implicar em aspectos modulatórios distintos. Assim sendo, áreas de integração de informação sensorial e de resposta motora mostram distintos padrões de aferências MCH-ir (Elias et al., 2008). Diante disto, 75% e 25% dos neurônios de projeções da área hipotalâmica lateral para o córtex motor e para o núcleo tegmental pontino exibem MCH-ir, respectivamente (Elias et al., 2008). Por outro lado, projeções MCH-ir para áreas de processamento da memória espacial são originadas das três principais áreas que alojam os neurônios MCH-ir, área hipotalâmica lateral, zona incerta e subnúcleo E4 do núcleo tuberomamilar medial (Casatti et al., 2002).

Provavelmente esses neurônios MCH-ir da área hipotalâmica lateral de projeções para o DMV modulam as informações sensoro-motoras que convergem para essa região. Um dos mecanismos dessa modulação tem sido sugerido por Zheng et al. (2005b) que mostraram um efeito inibitório pré-sináptico do MCH no complexo dorso-vagal, em particular entre os aferentes primários viscerais e o núcleo do trato solitário. Entretanto, essa inibição pré-sináptica aparentemente, pode não estar sob controle hipotalâmico, isso por que os neurônios do gânglio nodoso expressam MCH e seu receptor MCH-R1 (Burdyga et al., 2006). Nesse caso, em particular, tem sido observado de fato uma ação inibitória, mas que impedem o influxo de sinais viscerais de transdução da saciedade (Burdyga et al., 2006). Portanto, apesar de inibitório, o efeito prático seria estimular a ingestão alimentar (Burdyga et al., 2006). Assim sendo,

o controle descendente dos aferentes diencefálicos MCH-ir para o DMV ainda necessitam de estudos morfo-funcionais para inferências conclusivas.

É interessante salientar que as revisões da literatura mostram a área hipotalâmica lateral como uma região de integração sensoro-motora, na qual vários neuromediadores orexigênicos e anoréticos atuam simultaneamente resultando e um complexo mecanismo de controle da ingestão alimentar (Arora et al., 2006; Valassi et al., 2008). Em contraste a esse contexto, nossa discussão foi simplificada e direcionada no propósito de confrontar nossos dados neuronatômicos das conexões dos sistemas MCH e OXA da área hipotalâmica lateral com o núcleo motor dorsal do nervo vago, sem o propósito de segregar esse circuito neural. Além disso, sabemos que ambos neuropeptideos não estão simplesmente estimulando a ingestão alimentar em todos os núcleos e regiões envolvidos com o processamento sensório-motor do tubo gastrointestinal, podendo inclusive modular outras atividades relacionadas a esses núcleos.

7. CONCLUSÕES

- O núcleo motor dorsal do nervo vago apresenta inervação orexigênica imunorreativa à OXA e ao MCH, principalmente, em suas partes caudal e rostral;
- A densidade de inervação orexigênica imunorreativa à OXA é aproximadamente 65%±8 maior em comparação com a inervação imunorreativa ao MCH no núcleo motor dorsal do nervo vago;
- A inervação orexigênica imunorreativa à OXA ou ao MCH estabelece contatos morfológicos, sugestivo de sinapses, com os neurônios alojados no núcleo motor dorsal do nervo vago que inervam principalmente as paredes ventrais do esôfago abdominal, estômago e, raramente, o segmento proximal do duodeno;
- 4) As aferências diencefálicas imunorreativas à OXA ou MCH para o núcleo motor dorsal do nervo vago estão alojadas nas partes dorsal e lateral da área hipotalâmica lateral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, C. R.; KENNEDY, A. R.; WREN, A. M.; ROSSI, M.; MURPHY, K. G.; SEAL, L. J.; TODD, J. F.; GHATEI, M. A.; SMALL, C. J.; BLOOM, S. R. Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. **Endocrin**. v. 144, p. 3943-3949, 2003.

ADAMANTIDIS, A.; de LECEA, L. Physiological arousal: a role for hypothalamic systems. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 65, p. 1475-1488, 2008.

AGNATI, L.F.; LEO, G.; ZANARDI, A.; GENEDANI, S.; RIVERA, A.; FUXE, K.; GUIDOLIN, D. Volume transmission and wiring transmission from cellular to molecular networks: history and perspectives. **Acta Physiol. (Oxf).** v. 187, p. 329-344, 2006.

AN, S.; CUTLER, G.; ZHAO, J. J.; HUANG, S. G.; TIAN, H.; LI, W.; LIANG, L.; RICK, M.; BAKLEH, A.; DU, J.; CHEN J. L.; DAI, K. Identification and characterization of a melanin-concentrating hormone receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 98, p. 7576-7581, 2001.

ANDRESEN, M. C.; YANG, M. Non NMDA receptor mediate sensory afferent synaptic transmission in medial nucleus tractus solitaries. **J. Physiol.** v. 259, p. 1307-1311, 1990.

ARMSTRONG, D. M.; MANLEY, L.; HAYCOCK, J. W.; HERSH, L. B. Co-localization of choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase within neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus. J. Chem. Neuroanat. v. 3, p. 133-140, 1990.

ARORA S, ANUBHUTI. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity—a review. **Neuropeptides**. v. 40, p.375-401, 2006.

BÄCKBERG, M.; HERVIEU, G.; WILSON, S.; MEISTER, B. Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. **J. Neurosci.** v. 15, p. 315-328, 2002.

BAKER, B. I. Melanin-concentrating hormone updated-functional considerations. **Trends Endocrinol. Metab.** v. 5, p. 120-126, 1994.

BAKER, B. I; RANCE, T. A. Further observation on the distribution and properties of teleost melanin-concentrating hormone. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 50, p. 423-431, 1983.

BAKER, B.I; KINSMAN, R. G.; MOSS, C. A.; WHITH, P. D.; PAUL, P. K. C.; BROW, D. W.; CAMPBELL, M. M.; OSGUTHORPE, J. Structure-activity studies with fragments and analogues of salmonid melanin-concentrating hormone. **Peptides**. v. 11, p. 1103-1108, 1990.

BAPTISTA, V.; ZHENG, Z. L.; COLEMAN, F. H.; ROGERS, R. C., TRAVAGLI, R. A. Characterization of neurons of the nucleus tractus solitarius pars centralis. **Brain Res.** v. 1052, p. 139-146, 2005.

BAUMANN, C. R.; BASSETTI, C. L. Hipocretins (orexins) and sleep-wake disorders. **Lancet Neurol.** v. 4, p. 673-682, 2005.

BECKETT, E. A. Mc GEOUGH, C. A.; SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Pacing of intestinal cells of Cajal in the murine gastric antrum: neutrally mediated and direct stimulation. J. Physiol. v. 553, p. 545-559. 2003.

BERK, M. L. Projections of the lateral hypothalamus and bed nucleus of the stria terminalis to the dorsal vagal complex in the pigeon. **J. Comp. Neurol.** v. 260, p. 140-156, 1987.

BERK, M. L.; FINKELSTEIN, J.A. Efferente connections of the lateral hypothalamic area of the rat: an autoradiographic investigation. **Brain Res. Bull.** v. 8, p. 511-523, 1982.

BERTHOUD, H. R. Anatomical demonstration of vagal input to nicotinamide acetamide dinucleotide phosphate diaphorase-positive (nitrergic) neurons in rat fundic stomach. J. Comp. Neurol. v. 358, p. 428-439, 1995.

BERTHOUD, H. R. PATTERSON, L. M.; ZHENG, H. Vagal-enteric interface: vagal activation-induced expression of c-Fos and p-CREB in neurons of the upper gastrointestinal tract and pancreas. **Anat. Rec.** v. 262, p. 29-40, 2001.

BERTHOUD, H. R. The caudal brainstem and the control of food intake and energy balance. **Handbook of Behavioral Neurobiology.** v. 14, p. 195-240, 2004.

BERTHOUD, H. R. Vagal and hormonal gut-brain communication: from satiation to satistaction. **Neurogastroenterol. Motil.** v.1 , p. 64-72, 2008a.

BERTHOUD, H. R.; CARLSON, N. R.; POWLEY, T. L. Topography of efferent vagal innervations of the rat gastrointestinal tract. **J. Physiol.** v. 260, p. 200-207, 1991.

BERTHOUD, H. R.The vagus nerve, food intake and obesity. **Regula. Pept.** v.149, p. 15-25, 2008b.

BERTHOUD, H.R.; JEDRZEJEWSKA, A.; POWLEY, T.L. Simultaneous labeling of vagal innervation of the gut and afferente projections from the visceral forebrain with dil injected into the dorsal vagal complex in the rat. **J. Comp Neurol.** v.301, p.65-79, 1990.

BINGHAM, S.; DAVEY, P. T.; BABBS, A. J.; IRVING, E. A.; SAMMONS, M.J.; WYLES, M.; JEFFREY, P.; CUTLER, L.; RIBA; I.; JOHNS, A.; PORTER, R. A.; UPTON, N.; HUNTER, A. J.; PARSONS, A. A. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. **Pain.** v. 92, p. 81-90, 2001.

BITTENCOURT, J. C.; PRESSE, F.; ARIAS, C.; PETO, C.; VAUGHAN, J.; NAHON, J. L.; VALE, W.; SAWCHENKO, P. E. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno-and hybridization histochemical characterization. **J. Comp. Neurol.** v. 319, p. 218-245, 1992.

BLUE-PAJOT, M. T.; PRESSE, F.; VOKO, Z.; HOEGER, C.; MOUNIER, F.; EPELBAUM, J.; NAHON, J. L. Neuropeptide-E-I antagonizes the action of melaninconcentrating hormone on stress-induced release of adrenocorticotropin in the rat. **J. Endocrinol.** v. 7, p. 297-303, 1995. BOROWSKY, B.; DURKIN, M. M.; OGOZALEK, K.; MARZABADI, M. R.; DELEON, J.; LAGU, B.; HEURICH, R.; LICHTBLAU, H.; SHAPOSHNIK, Z.; DANIEWSKA, I.; BLACKBURN, T. P.; BRANCHEK, T. A.; GERALD, C.; VAYSSE, P. J.; FORRAY, C. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. **Nat. Med.** v. 8, p. 825-830, 2002.

BOURGIN, P.; HUITRON-RESENDIZ, S.; SPIER, A. D.; FABRE, V.; MORTE, B.; CRIADO, J. R.; SUTCLIFFE, J. G.; HENRIKSEN, S. J. DE LECEA, L. Hipocretin-1 modulates rapid eye moviment sleep through activation of locus coeruleus neurons. J. Neurosci. v. 20, p. 7760-7765, 2000.

BROBERGER, C.; DE LECEA, L.; SUTCLIFFE, J. G.; HÖKFELT, T. Hypocretin/orexinand melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. J. Comp. Neurol. v. 402, p. 460-474, 1998.

BROBERGER, C.; HÖKFELT,T. Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. **Physiol. Behav.** v. 74, p. 669-682, 2001.

BRODAL, P. **The central nervous system. Strucuture and function.** 2. ed. New York: Oxford University Press, 1998. 675p.

BROWN, D. W.; COMPBELL, M. M.; KINSMAN, R. G.; MOSS, C. A.; OSGUTHORPE, D. J.; PAUL, P. K. D.; WHITH, P. D.; BAKER, B. I. Melanin-concentrating hormone: A structural and conformational study based on synthesis, biological activity high-filled NMR, and molecular modeling techniques. **Biopolymers.** v. 29, p. 609-622, 1990. BROWN, S. N.; CHITRAVANSHI, V. C.; KAWABE, K.; SAPRU, H. N. Microinjections of melanin concentrating hormone into the nucleus tractus solitarius of the rat elicit depressor and bradycardic responses. **Neuroscience**. v. 150, p. 796-806, 2007.

BROWNING, K. N. Excitability of nodose ganglion cells and their role in vago-vagal reflex control of gastrointestinal function. **Curr. Opin. Pharmacol.** v. 3, p. 613-617, 2003.

BROWNING, K. N.; COLEMAN, F. H.; TRAVAGLI, R.A. Charactrization of pancreasprojecting rat dorsal motor nucleus of the vagus neurons. **J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** v. 288, p. 950-955, 2005.

BROWNING, K. N.; MENDELOWITZ, D. Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes?: II. Integration of afferent signaling from the viscera by the nodose ganglia. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. v. 284, p 8-14, 2003.

BROWNING, K. N.; RENEHAN, W. N.; TRAVAGLI, R.A. Eletrophysiological and morphological heterogeneity of rat dorsal vagal neurons which project to specific areas of the gastrointestinal tract. **J. Physiol.** v. 517, p. 521-532. 1999.

BURDYGA, G.; VARRO, A.; DIMALINE, R.; THOMPSON, D. G.; DOCKRAY, G. J. Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia: putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. v. 296, p. 1289-1297, 2006.

CASATTI, C.A.; ELIAS, C.F.; SITA, L.V.; FRIGO, L.; FURLANI, L.C.; BAUER, J.A.; BITTENCOURT, J.C. Distribuition of melanin-concnetrating hormone neurons projecting to the medial mammillary nucleus. **Neuroscience.** v. 115, p. 899-915, 2002.

CHAMBERS, J.; AMES, R. S.; BERGSMA, D.; MUIR, A.; FITZGERALD, L. R.; HERVIEU, G.; DYTKO, G. M.; FOLEY, J. J.; MARTIN, J.; SCHYONG LIU, W.; PARK, J.; ELLIS, C.; GANGULY, S.; KONCHAR, S.; CLUDERAY, J.; LESLIE, R.; WILSON, S.; SARAU, H. M. Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan Gprotein-coupled receptor SLC-1. **Nature.** v. 400, p. 261-265, 1999.

CHANG, H. Y.; MASHIMO, H.; GOYAL, R. K. Musings on the wanderer: What's new in our understanding of vago-vagal reflex?: IV. Current concepts of vagal efferent projections to the gut. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. v. 284, p. 357-366, 2003.

CHANG, H.T., KUO, H., WHITTAKER, J.A., COOPER, N.G.F.Light and electron microscopic analysis of projection neurons retrogradely labeled with Fluoro-Gold notes on the application of antibodies of Fluoro-Gold. **J. Neurosci. Meth.** v.35 ,p. 31-37,1990.

CHIOCCHIO, S. R.; GALLARDO, M. G.; LOUZAN, P.; GUTNISKY, V.; TRAMEZZANI, J. H. Melanin-concentrating hormone stimulates the release of luteinizing hormonereleasing hormone and gonadotropins in the female rat acting at both median eminence and pituitary levels. **Biol. Reprod.** v. 64, p. 1466-1472, 2001.

CLEGG, D. J.; AIR, E. L.; BENOIT, S. C.; SAKAI, R. S.; SEELEY, R. J.; WOODS, S. C. Intraventricular melanin-concentrating hormone stimulates water intake independent of food intake. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 284, p. 494-499, 2003. CUTLER, D. J.; MORRIS, R.; SHERIDHAR, V.; WATTAM, T. A. K.; HOLMES, S.; PATEL, S.; ARCH, J. R. S.; WILSON, S.; BUCKNGHAM, R. E.; EVANS M. L.; LESLIE, R. A.; WILLIAMS, G. Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. **Peptides.** v. 20, p. 1455-1470, 1999.

CVETKOVIC, V.; BRISCHOUX, F.; JACQUEMARD, C.; FELLMANN, D.; GRIFFOND, B.; RISOLD, P. Y. Characterization of subpopulations of neurons producing melaninconcentranting hormone in the rat ventral diencephalon. **J. Neurochem.** v. 91, p. 911-919, 2004.

DANIELSEN, E. H.; MAGNUSON, D. J.; GRAY, T. S. The central amygdaloid nucleus innervation of the dorsal vagal complex in rat: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin lectin anterograde tracing study. **Brain Res. Bull.** v. 22, p. 705-715, 1989.

DATE, Y.; UETA, Y.; YAMASHITA, H.; YAMAGUCHI, H.; MATSUKURA, S.; KANGAWA, K.; SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; NAKAZATO, M. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. **Neurobiol.** v. 96, p. 748-753, 1999.

DAVIDOWA, H.; LI, Y.; PLAGEMANN, A. Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons of normal and postnatally overnourished rats differ in their reponses to melanin-concentrating hormone. **Regul. Peptides.** v. 108, p. 103-111, 2002.
DAVIS, S.F.; WILLIAMS, K.W.; XU, W.; GLATZER, N.R.; SMITH, B.N. Selective enhancement of synaptic inhibition by hypocretin (orexin) in rat vagal motor neurons: implications for autonomic regulation.**J. Neurosci.** v. 23, p. 3844-3854, 2003.

DE LACALLE, S.; HERSH, L.B.; SAPER, C.B. Cholinergic innervation of the human cerebellum. J. Comp. Neurol. v. 328, p. 364-376, 1993.

DE LECEA, L.; KILDUFF, T. S.; PEYRON, C.; GAO, X. B.; FOYE, P. E.; DANIELSON, P. E.; FUKUHARA, C.; BATTENBERG, E. L. F.; GAUTVIK, V. T.; BARTLETT, I. I. F. S.; FRANKEL, W. N.; VAN DEN POL AN; BLOOM, F. E.; GAUTVIK, K. M.; SUTCLIFFE, J. G. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 95, p. 322-327, 1998.

DE OLIVEIRA, C. V.; ROSAS-ARELLANO, M. P.; SOLANO-FLORES, L. P.; CIRIELLO, J. Cardiovascular effects of hypocretin-1 in nucleus of the solitary tract. J. Physiol. Heart Circ Physiol. v. 284, p. 1369-1377, 2003.

DELLA-ZUANA, O.; PRESSE, F.; ORTOLA, C.; DUHAULT, J.; NAHON, J. L.; LEVENS, N. Acute and chronic administration of melanin concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. **Int. J. Obesity.** v. 26, p. 1289-1295, 2002.

DIETRICHS, E. Cerebellar anatomic function: direct hypothalamocerebellar pathway. **Science**. v. 223, p. 591-593, 1984.

DONG, H. W.; SWANSON, L. W. Projections from the rhomboid nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis: Implications for cerebral hemisphere regulation of ingestive behaviors. J. Comp. Neurol. v. 463, p. 434-472, 2003.

DUBE, M. G.; KALRA, S. P.; KALRA, P. S. Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. **Brain Res.** v. 842, p. 473-477, 1999.

EDWARDS, C. M.; ABUSNANA, S.; SUNTER, D.; MURPHY, K. G.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S .R. The effect of the orexins on food intake: comparasion with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. **J. Endocrinol.** v. 160, p. 7-12, 1999.

ELIAS, C.F.; BITTENCOURT, J.C. Study of the origins of melanin-concentrating hormone and neuropeptide El immunoreactive projections to the periaqueductal gray matter. **Brain Res.** v.755, p. 255-271, 1997.

ELIAS, C. F.; SAPER, C. B.; MARATOS-FLIER, E.; ATRITOS, N.; LEE, C.; KELLY, J.; TATRO, J. B.; HOFFMAN, G. E.; OUMANNI, M. M.; BARSH, G. S.; SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; ELMQUIST, J. K. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. **J. Comp. Neurol.** v. 402, p. 442-459, 1998.

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

ENAMI, M. Melanophore-concentrating hormone (MCH) of possible hypothalamic origin in catfish. Parasilurus. **Science**. v. 121, p. 36-37, 1955.

ESPANA, R. A.; BALDO, B. A.; KELLEY, A. E.; BERRIDGE, C.W. Wake-promoting and sleep-suppressing actions of hpocretin (orexin): basal forebrain sites of action. **Neuroscience.** v. 106, p. 699-715, 2001.

FLIER, J.; MARATOS-FLIER, E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. **Cell.** v. 92, p. 437-440, 1998.

FOGEL, R.; ZHANG, X.; RENCHAN, W. E. Relationships between the morphology and function of gastric and intestinal distention-sensitive neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus. **J. Comp. Neurol.** v. 364, p. 78-91, 1996.

FOX, E. A.; POWLEY, T. L. Longitudinal colummar organization within the dorsal motor nucleus represents separate branches of the abdominal vagus. **Brain Res.** v. 341, p. 269-282, 1985.

FOX, E. A.; POWLEY, T. L. Morphology of identified preganglionar neurons in the dorsal motor nuclei of the vagus. **J. Comp. Neurol.** v. 322, p. 79-98, 1992.

FOX, E.A.; PHILLIPS, R.J.; MARTINSON, F.A.; BARONOWSKY, E.A.; POWLEY, T.L. Vagal afferent innervation of smooth muscle in the stomach and duodenum of the mouse: morphology and topography. **J. Comp. Neurol.** V. 428, p. 558-576, 2000.

GLATZER, N. R.; HASNEY, C. P.; BHASKARAN, M. D.; SMITH, B. N. Synaptic and morphologic properties in vitro of premotor rat nucleus tractus solitaries neurons labeled transneuronally from the stomach. J. Comp. Neurol. v. 464, p. 525-539, 2003.

GONZALEZ, M. I.; BAKER, B. I.; WILSON, C. A. Stimulatory effect of melaninconcentrating hormone on LH release. **Neuroendocrinol**. v. 66, p. 254-262, 1997.

GOTO, M.; SWANSON, L.W. Axonal projections from the parasubthalamic nucleus. **J. Comp. Neurol.** v. 469, p. 581-607, 2004.

GOYAL, R. K.; PADMANABHAN, R.; SANG, Q. Neural circuits in swallonwing and abdominal vagal afferent-mediated lower esophageal sphincter relaxation. **J. Med.** v. 111, p. 95-105, 2001.

GRABAUSKAS, G.; MOISES, H. C. Gastrointestinal-projecting neurones in dorsal motor nucleus of the vagus exhibit direct and viscerotopically organized sensitivity to orexin. **J. Phisiol.** v. 549, p. 37-56, 2003.

GRAY, T.S.; MAGNUSON, D.J. Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 262, p. 365-374, 1987.

GRIFFOND, B.; BAKER, B. I. Cell and Molecular cell biology of melanin-concentrating hormone, Int. Rev. Cytol. v. 213, p. 233-277, 2002.

GUAN, J.L.; WANG, Q.P.; KAGEYAMA, H.; KITA, T.; TAKENOYA, F.; HORI, T.; SHIODA, S. Characterization of orexin A immunoreactivity in the rat area postrema. **Regul. Pept.** v. 129, p. 17-23, 2005.

GUIDE TO THE CARE AND USE OF EXPERIMENTAL ANIMALS. Canadian council on animal care (CCAC) Canadian council on animal care, Ottawa, Ontario, vol. 1, 2nd ed., 1993, 298pp.

GUO, J.J.; BROWNING, K. N.; ROGERS, R. C.; TRAVAGLI, R. A. Catecholaminergic neurons in rat dorsal motor nucleus of vagus project selectively to gastric corpus. **J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** v. 280, p. 361-367, 2001.

HAGAN, J. J.; LESLIE, R. A.; PATEL, S.; EVANS, M. L.; WATTAM, T. A.; HOLMES, S.; BENHAM C. D.; TAYLOR, S. G.; ROUTLEDGE, C.; HEMMATI, P. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 96, p. 10911-10916, 1999.

HARRINSON, T. A.; CHEN, C. T.; DUN, N. J.; CHANG, J. K. Hypotalamic orexin Aimmunoreactive neurons project to the rat dorsal medulla. **Neurosci. Lett.** v. 273, p. 17-20, 1999.

HAYNES, A. C.; CHAPMAN, H.; TAYLOR, C.; MOORE, G. B.; CAWTHORNE, M. A.; TADAYYON, M.; CLAPHAN, J. C.; ARCH, J. R. Anoretic, thermogenic and anti-obesity activity of a selective orexin-1 receptor antagonist in ob/ob mice. **Regul. Pept.** v. 104, p. 153-159, 2002. HAYNES, A. C.; JACKSON, B.; OVEREND, P.; BUCKINGHAM, R. E.; WILSON, S.; TADAYYON, M.; ARCH, J. R. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. **Peptides.** v. 20, p. 1099-1105, 1999.

HAYNES, A. C.; JACKSON, B.;CHAPMAN, H.; TADAYYON, M.; JOHNS, A.; PORTER, R. A.;ARCH, J. R. A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. **Regul. Pept.** v. 96, p. 45-51, 2000.

HEIDEL, E.; PLAGEMANN, A.; DAVIDOWA, H. Incresed response to NPY of hypothalamic VMN neurons in posnatally overfed juvenile rats. **Neuroreport** v. 10, p. 1827-1831, 1999.

HEINONEM, M. V.; PURHONEN, A. K.; MÄKELA, K. A.; HERZIG, K. H. Functions of orexins in peripheral tissues. **Acta Physiol.** v. 192, p. 471-485, 2008.

HERVIEU, G. J.; CLUDERAY, J. E.; HARRISON, D.; MEAKIN, J.; MAYCOX, P.; NASIR, S.; LESLIE, R. A. The distribuition of the m RNA and protein products of the melanin concentrating hormone (MCH) receptor gene, slc-1, in the central nervous system of the rat. **J. Neurosci.** v. 12, p. 1194-1216, 2000.

HILL, J.; DUCKWORTH, M.; MURDOCK, P.; RENNIE, G.; SABIDO-DAVID, C.; AMES, R. S.; SZEKERES, P.; WILSON, S.; BERGSMA, D. J.; GLOGER, I. S.; LEVY, D. S.; CHAMBERS, J. K.; MUIR, A. I. Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 20125-20129, 2001.

HOGBEN, L.; SLOME, D. The pigmentary effector systen. VI, de dual character of endocrine coordination in anfibian colour charge. **Proc. R. Soc. London B. Biol. Sci.** v. 120, p. 158-173, 1936.

HOPKINS, D.A.; HOLSTEGE, G. Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. **Exp. Brain Res.** v.32, p. 529-547, 1978.

HOSOYA, Y.; MATSUSHITA, M. Brainstem projections from the lateral hypothalamic area in the rat, as studied with autoradiography. **Neurosci. Lett.** v. 24, p. 111-116, 1981.

HOSOYA, Y.; MATSUSHITA, M. Descending projections from the lateral hypothalamic area to the brainstem and spinal cord in the rat: a study by HRP and autoradiographic methods. In: struture and function of peptidergic and aminergic neurons. **J. Comp. Neurol.** v. 230, p. 13-32, 1983.

HWANG, L. L.; CHEN, C. T.; DUN, N. J. Mechanisms of orexin-induced depolarizations in rat dorsal motor nucleus of vagus neurones in vitro. **J. Phisiol.** v. 537, p. 511-520, 2001.

HYLAND, N.P.; ABRAHAMS, T.P.; FUCHS, K.; BURMEISTER, M.A.; HORNBY, P.J. Organization and neurochemistry of vagal preganglionic neurons innervating the lower esophageal sphincter in the ferrets. J. Comp. Neurol. v. 430, p. 222-234, 2001.

IMAI, K. Extraction of melanophore-concentrating hormone (MCH) from the pituitary of fish. **Endocrinol.** v. 5, p. 34-48, 1958.

ITO, M.; GOMORI, A.; ISHIHARA, A.; ODA, Z.; MASHIKO, S.; MATSUSHITA, H.; YUMOTO, M.; ITO, M.; SANO, H.; TOKITA, S.; MORIYA, M.; IWAASA, H.; KANATANI, A. Characterization of MCH-mediated obesity im mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 284, p. 940-945, 2003.

IVANOV, A.; ASTON-JONES, G. Hypocretin/orexin depolarizes and decreases potassium conductance in locus coeruleus neurons. **Neuroreport.** v. 11, p. 1755-1758, 2000.

JARVINEN, M. K.; POWLEY, T. L. Dorsal motor nucleus of the vagus neurons: a multivariate taxonomy. J. Comp. Neurol. v. 403, p. 359-377, 1999.

JEAN, A. Braistem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. **Physiol. Rev.** v. 81, 929-969, 2001.

JIANG, C.; FOGEL, R.; ZHANG, X. Lateral hypotalamus modulates gut-sensitive neurons in the dorsal vagal complex. **Brain Res.** v. 3, p. 31-47, 2003.

KALIA, M.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.; HARFSTRAND, A.; AGNATI, L. F.; COYLE, J. T. Evidence for the existence of putative dopamine-adrenaline- and noradrenalinecontatining vagal motor neurons in the brainstem of the rat. **Neurosci. Lett.** v. 50, p. 57-62, 1984.

KAWAUCHI, H.; KAWAZOE, I.; TSUBOKAWA, M.; KISHIDA, M.; BAKER, B. I. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. **Nature.** v. 305, p. 321-323, 1983. KNIGGE, K. M.; WAGNER, J. E. Melanin-concentrating hormone (MCH) involvement in pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizure in rat and guinea pig. **Peptides**. v. 18, p. 1095-1097, 1997.

KNOLLEMA, S.; BROWN, E. R.; VALE, W.; SAWCHENKO, P. E. Novel hypothalamic and preoptic sites of prepro-melanin-concentrating hormone mRNA and peptide expression in lactating rats. **J. Endocrinol.** v. 4, p. 709-717, 1992.

KOKKOTOU, E. G.; TRITOS, N. A.; MASTAITIS, J. W.; FLIER, E. M. Melaninconcentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain. **Endocrinol.** v. 142, p. 680-686, 2001.

KOTZ, C.M.; TESKE, J.A.; LEVINE, J.A.; WANG, C. Feeding and acitivity induced by orexin A in the lateral hypothalamus in rats. **Regul.Pept.** v. 104, p. 27-32, 2002.

KROWICKI, Z. K.; BURMEISTER, M. A.; BERTHOUD, H. R.; SCULLION, R. T.; FUCHS, K.; HORNBY, P. J. Orexins in rat dorsal motor nucleus of the vagus potently stimulate gastric motor function. **J. Physiol.** v. 283, p. 1-15, 2002.

KROWICKI, Z. K.; SHARKEY, K. A.; SERRON, S. C.; NATHAN, N. A.; HORNBY, P. J. Distribuition of nitric oxide synthase in rat dorsal vagal complex and effect of microinjection of NO compounds upon gastric motor function. J. Comp. Neurol. v. 377, p. 49-69, 1997.

LACHAMP, P.; BALLAND, B.; TELL, F.; CREST, M.; KESSLER, J. P. Synaptic localization of the glutamate receptor subunit GluR2 in the rat nucleus tractus solitary. J. Neurosci. v. 17, p. 892-896, 2003.

LERNER, A.; BAGIC, A. Olfactory pathogenesis of idiopathic Parkinson disease revisited. **Mov. Disord.** v. 23, p. 1076-1084, 2008.

LI, Y.; OWYANG, C. Musings on the wanderer: What's new in our undersdeling of vago-vagal reflexes? V. Remodeling of vagus and enteric neural circuitry after vagal injury. **J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** v. 285, p. 461-469., 2003.

LLEWELLYN-SMITH, I.J.; MARTIN, C.L.; MARCUS, J.N.; YANAGISAWA, M.; MINSON, J.B.; SCAMMELL, T.E. Orexin-immunoreactive inputs to rat sympathetic preganglionic neurons. **Neurosci. Lett.** v. 351, p. 115-119, 2003.

LOEWY, A.D. Forebrain nuclei involved in autonomic control. **Prog. Brain Res.** v. 87, p. 253-268, 1991.

LOGAN, D. W.; BRYSON-RICHARDSON, J.; PAGAN, K. E.; TAYLOR, M. S.; CURRIE, P. D.; JACKSON, I. J. The structure and evolution of the melanocortin and MCH receptors in fish and mammals. **Genomics.** v. 81, p. 184-191, 2003.

LU, X. Y.; BAGNOL, D.; BURKE, S.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. **Horm. Behav.** v. 37, p. 335-344, 2000. LU, X. Y.; BIEGER, D. Vagal afferent transmission in the NTS mediating reflex responses of the rat esophagus. J. Physiol. v. 464, p. 1436-1445. 1998.

LUIBASHINA, O.; BAGAEV, V.; KHOTIANTSEV, S. Amygdalofugal modulation of the vago-vagal gastric motor reflex in rat. **Neurosci. Lett.** v. 325, p. 183-186, 2002.

MARCUS, J. N.; ASCHKENASI, C. J.; LEE, C. E; CHEMELLI, R. M.; SAPER, C. B.; YANAGISAWA, M.; ELMQUIST, J. K.Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. **J. Comp. Neurol.** v. 435, p. 6-25, 2001.

MARTINEZ-PENA y VALENZUELA, I. M.; BROWNING, K. N.; TRAVAGLI, R. A. Morphological differences between planes of section do not influence the eletrophysiological properties of identified rat dorsal motor nucleus motor nucleus of the vagus neurons. **Brain Res.**v. 1003, p. 54-60, 2004.

MILLER, C. L.; HRUBY, V. J.; MATSUNAGA, T. O.; BICKFORT, P. C. Alpha-MSH and MCH are functional antagonists in a CNS auditory gating paradigm. **Peptides**. v. 14, p. 431-440, 1993.

MIOLAN, J. P.; ROMAN, C. The role of oesophageal and intestinal receptors in the control of gastric motility. **J. Auton. Nerv. Syst.** v.10, p. 235-241, 1984.

MIYASAKA, K.; MASUDA, M.; KANAI, S.; SANTOM, N.; KUROSAWA, M.; FUNAKOSHI, A. Central Orexin-A stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagus. **Pancreas.** v. 25, p.400-404, 2002.

MONZON, M. E.; SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, L. A.; IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; BARIOGLIA, S. R. Melanin-concentrating hormone (MCH) modifies memory retention in rats. **Peptides.** v. 20, p. 1517-1519, 1999.

MORENS, C.; NORREGAARD, P.; RECEVEUR, J. M.; VAN DIJIK, G.; SCHEURINK, A. J. W. Effects of MCH and a MCH1-receptor antagonist on (palatable) food and water intake. **Brain Res.** v. 1062, p. 32-38, 2005.

MORGENSON, G. J.; SWANSON, L. W.; WU, M. Evidence that projectins from the substantia innominata to the zona incerta and mesencephalic locomotor regions contribute to locomotor activity. **Brain Res.** v. 334, p. 65-76, 1985.

MORRI, M.; HARADA, M.; TERAO, Y.; SUGO, T.; WATANABE, T.; SHIMOMURA, Y.; ABE, M.; SHINTANI, Y.; ONDA, H.; NISHIMURA, O.; FUJINO, M. Cloning of a novel G protein-coupled receptor, SLT, a subtype of the melanin-concentrating hormone receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 283, p. 1013-1018, 2001.

MURRAY, J. F.; BAKER, B. I.; LEVY, A. WILSON, C. A. The influence of gonodal steroids on pre-pro melanin-concentrating hormone mRNA in female rats. J. Neuroendocrinol. v. 12, p. 53-59, 2000.

NAHON, J. L. The melanin-concentrating hormone: From the peptide to the gene. **Crit. Rev. Neurobiol.** v. 8, p. 221-262, 1994.

NAHON, J. L. The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. **C. R. Biologies.** v. 329, p. 623-638, 2006.

NAHON, J. L.; PRESSE, F.; BITTENCOURT, J. C.; SAWCHENKO, P.; VALE, W. The rat melanin-concentrating hormone mRNA encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus. **Endocrinol.** v. 125, p. 2056-2065, 1989.

NAITO, N.; KAWAZOE, I.; NAKAI, Y.; KAWAUCHI, H. Melanin-concentrating hormonelike immunoreactive material in the rat hypothalamus; characterization and subcellular localization. **Cell Tissue Res.** v. 253, p. 291-295, 1988.

NATALE, G.; PASQUALI, L.; RUGGIERI, S.; PAPARELLI, A.; FORNAI, F. Parkinson' s disease and the gut: a well known clinical association in need of an effective cure nad explanation. **Neurogastroenterol. Motil.** v. 20, p. 741-749, 2008.

NEMES, Z. Intensification of 3,3'-diaminobenzidine precipitation using the ferric ferricyanide reaction, and its application in the double-immunoperoxidase technique. **Histochem. Cell Biol.** v. 86, p. 415-419, 1987.

NILAVER, G.; ZIMMERMAN, E.A.; WILKINS, J.; MICHAELS, J.; HOFFMAN, D.; SILVERMAN, A.J. Magnocellular hypothalamic projections to the lower brain stem and spinal cord of the rat. Immunocytochemical evidence for predominance of the oxytocin-neurophysin system compared to the vasopressin-neurophysin system. **Neuroendocrinol.** v. 30, p. 150-158, 1980.

NORGREN, R.; SMITH, G. P. Central distribuition of subdiaphragmatic vagal branches in the rat. J. Comp. Neurol. v. 273, p. 207-223, 1988.

OKUMURA, T.; TAKAKUSAKI, K. Role of orexin in central regulation of gastrointestinal functions. **J. Gastroenterol.** v. 43, p. 652-660, 2008.

OKUMURA, T.; TAKEUCHI, S.; MOTOMURA, W.; YAMADA, H.; EGASHIRA, SI.S.; ASAHI, S.; KANATANI, A.; THARA, M.; KOHGO, Y. Requirement of intact disulfide bonds in orexin-A-induced stimulation of gastric acid secretion that is mediated by OX1 receptor activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 280, p. 976-981, 2001.

OTAKE, K.; EZURE, K.; LIPSKI, J.; WONG SHE, R. B. Projections from the commissural subnucleus of the nucleus of the solitary tract: an anterograde tracing study in the cat. J. Comp. Neurol. v. 15, n. 324, p. 365-378, 1992.

PARSONS, M.P.; LI, S.; KIROUAC, G.J. The paraventricular nucleus of the thalamus as an interface between the orexin and CART peptides and the shell of nucleus accumbens. **Synapse.** v. 59, p. 480-490, 2006.

PAXINOS, G.; WATSON, C. R. R. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 4 ed. Sydney: academic Press, 1998, 133p.

PEYRON, C.; FARACO, J.; ROGERS, W.; RIPLEY, B.; OVEREEM, S.; CHERNAY, Y.; NEVSIMALOVA, S.; ALDRICH, M.; REYNOLDS, D.; ALBIN, R.; LI, R.; HUNGS, M.; PEDRAZZOLI, M.; PADIGARU, M.; KUCHERLAPATI, M.; FAN, J.; MAKI, R.; LAMMERS, G. J.; BOURAS, C.; KUCHERLAPATI, R.; NISHINO, S.; MIGNOT, E. A mautation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. **Nat. Med.** v. 6, p. 991-997, 2000.

PEYRON, C.; TIGHE, D.K.; VAN DEN POL AN; DE LECEA, L.; HELLER, H. C.; SUTCLIFFE, J. G.; KILDUFF, T. S. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiplo neuronal systems. J. Neurosci. v. 18, p. 9996-10015, 1998.

PIPER, D. C.; UPTON, N.; SMITH, M. I.; HUNTER, A. J. The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep-wape cycle of rats. **J. Neurosci.** v. 12, p. 726-730, 2000.

POWLEY, T. L. Vagal circuitry mediating cephalic-phase response to food. **Apetite.** v. 34, p.184-188. 2000a.

POWLEY, T.L. Vagal Input to the enteric nervous system. Gut. v. 47, p. 30-32, 2000b.

PRESSE, F.; NAHON, J. L. Diferential regulation of melanin-concentrating hormone gene expression in distinct hypothalamic areas under osmotic stimulation in rat. **Neurosci.** v. 55, p. 709-720, 1993.

PRESSE, F.; NAHON, J. L.; FISCHER, W. H. VALE, W. Structure of the human melanin concentrating hormone mRNA. **Mol. Endocrinol.** v. 4, p. 632-637, 1990.

PRESSE, F.; SOROKOVSKY, Y.; MAX, J. P.; NICOLAIDIS, S.; NAHON, J. L. Melaninconcentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food-deprivation and glucopenia in the rat. **Neuroscience.** v. 71, p. 735-745, 1996. QU, D.; LUDWING, D. S.; GAMMELTOFT, S.; PIPER, M.; PELLEYMOUNTER, M. A.; CULLEN, M. J.; MATHEUS, W. F.; PRZYPEK, J.; KANAREK, R.; MARATOS-FLIER, E. A role for melanin-concentrating hormone in the central reglation of feeding behavior. **Nature.** v. 380, p. 243-247, 1996.

RANCE, T. A.; BAKER, B. I. Possible hypothalamic origin of the teleost melaninconcentrating hormone [proceedings]. **J. Endocrinol.** v. 81, p. 166, 1979.

RINAMAN, L.; CARD, J.P.; SCHWABER, J.S.; MISELIS, R.R. Ultrastructural demonstration of a gastric monosynaptic vagal circuit in the nucleus of the solitary tract in rat. **J. Neurosci.** v. 9, p. 1985-1996, 1989.

RODRIGUEZ, M.; BEAURVERGER, P.; NAIME, I.; RIQUE, H.; OUVRY, C.; SOUCHAUD, S.; DROMAINT, S.; NAGEL, N.; SUPLY, T.; AUDINOT, V.; BOUTIN, J. A.; GALIZZI, J. P. Cloning and molecular characterization of the novel human melanin-concentrating hormone receptor MCH2. **Mol. Pharmacol.** v. 60, p. 632-639, 2001.

ROGERS, R. C.; HERMANN, G. E.; TRAVAGLI, R. A. Brainstem pathways responsible for oesophageal control of gastric motility and tone in the rat. **J. Physiol.** v. 514, p. 369-383, 1999.

ROGERS, R. C.; KITA, H.; BUTCHER, L. L.; NOVIN, D. Afferent projections to the dorsal motor nucleus of the vagus. **Brain Res. Bull.** v. 5, p. 365-373, 1980.

ROGERS, R. C.; McTIGUE D. M.; HERMANN, G. E. Vagovagal reflex control of digestion: afferent modulation by neural and "endoneurocrine" factors. **J. Physiol.** v. 268, p. 1-10, 1995.

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

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

RUGGIERO, D. A.; MTUI, E. P.; OTAKE, K.; ANWAR, M. Vestibular afferents to the dorsal vagal complex: substrate for vestibular-autonomic interactions in the rat. **Brain Res.** v. 743, p. 294-302, 1996.

SAILER, A. W.; SANO, H.; ZENG, Z.; McDONALD, T. P.; PAN, J.; PONG, S. S.; FEIGHNER, S. D.; TAN, C. P.; FUKAMI, T.; IWAASA, H.; HRENIUK, D. L.; MORIN, N. R.; SADOWSKI, S. J.; ITO, M.; BANSAL, A.; KY, B.; FIGUEROA, D. J.; JIANG, Q.; AUSTIN, C. P.; MACNEIL, D. J.; ISHIHARA, A.; IHARA, M.; KANATANI, A.; VAN DER PLOEG, L. H.; HOWARD, A. D.; LUI, Q. Identification and characterization od a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-R2. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 98, p. 7564-7569, 2001.

SAITO, Y.; CHENG, M.; LESLIE, F. M.; CIVELLI, O. Expression of the melanin concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. J. Comp. Neurol. v. 435, p. 26-40, 2001.

SAITO, Y.; NOTHACKER, H. P.; WANG, Z.; LIN, S. H. S.; LESLIE, F.; CIVELLI. O. Molecular characterization of the melanin-concentrating hormone receptor. **Nature**. v. 400, p. 265-269, 1999.

SAKURAI, T. Orexin: a link between energy homeostasis and adaptative behaviour. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.** v. 6, p. 353-360, 2003.

SAKURAI, T.; AMEMIYA, A.; ISHII, M.; MATSUZAKI, I.; CHEMELLI, R. M.; TANAKA, H.; WILLIAMS, S. C.; RICHARDSON, J. A.; KOZLOWSKI, G. P.; WILSON, S.; ARCH, J. R.; BUCKINGHAM, R. E.; HAYNES, A. C.; CARR, S. A.; ANNAN, R. S.; MCNULTY, D. E.; LUI, W. S.; TERRETT, J. A.; ELSHOURBAGY, N. A.; BERGSMA, D. J.; YANAGISAWA, M. Orexins and orexin receptor: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. **Cell.** v. 92, p. 573-585, 1998.

SALIO, C.; LOSSI, L.; FERRINI, F.; MERIGHI, A. Neuropeptides as synaptic transmitters. **Cell Tissue Res.** v. 326, p. 583-598, 2006.

SAPER, C. B.; LOEWY, A. D.; SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. Direct hypothalamoautonomic connections. **Brain Res.** v. 117, p. 305-312, 1976a.

SAPER, C. B.; SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. An autoradiographic study of the efferent connectons of the lateral hypotalamic area. **J. Comp. Neurol.** v. 183, p. 689-706, 1979.

SAPER, C. B.; SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 169, p. 409-422, 1976b.

SAWCHENKO, P.E.; SWANSON, L. W. Immunohistochemical identification in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. J. Comp. Neurol. v. 205, p. 260-272, 1982.

SCHMUED, L.C.; FALLON, J.H. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. **Brain Res.** v. 377, p. 147-154, 1986.

SHAPIRO, R. E.; MISELIS, R. R. The central organization of the vagus nerve innervating the stomach of the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 238, p. 473-488, 1985.

SHEARMAN, L. P.; CAMACHO, R. E.; SLOAN STRIBLING, D.; ZHOU, D.; BEDNAREK, M. A.; HRENIUK, D. L.; FEIGHNER, S. D.; TAN, C. P.; HOWARD, A. D.; VAN DER PLOEG, L. H.; MACINTYRE, D. E.; HICKEY, G. J.; STRACK, A. M. Chronic MCH-1 receptor modulation alters appetite, body weight and adiposity in rats. **Eur. J. Pharmacol.** v. 475, p. 37-47, 2003.

SHIMADA, M.; TRITOS, N. A.; LOWELL, B. B.; FLIER, J. S.; MARRATOS-FLIER, E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and leam. **Nature.** v. 396, p. 670-674, 1998.

SIM, L.J.; JOSEPH, S.A. Arcuate nucleus projections to brainstem regions wich modulate nociception. **J. Chem. Neuroanat.** v. 4, p. 97-109, 1991.

SKOFITSCH, G.; JACOBOWITZ, D. M.; ESKAY, R. L.; ZAMIR, N. Distribution of atrial natriuretic factor-like immunoreactive neurons in the rat brain. **Neuroscience**. v. 16, p. 917-948, 1985.

STOYANOVA, I.I.; LAZAROV, N.E. Localization of orexin-A-immunoreactive fibers in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat. **Brain Res.** v. 1054, p. 82-87, 2005.

SUNTER, D.; MORGAN, I.; EDWARDS, C.M.; DAKIN, C.L.; MURPHY, K.G.; GARDINER, J.; TAHERI, S.; RAYES, E.; BLOOM, S.R. Orexins: effects on behavior and localization of orexin recepetor 2 messenger ribonucleic acid in the rat brainstem. **Brain Res.** v. 907, p. 27-34, 2001.

SUTCLIFFE, J. G.; DE LECEA, L. The hypocretins: setting the arousal threshold. **Nat. Neurosci.** v. 3, p. 339-349, 2002.

SWANSON, L. W. An autoradiographic study of the efferent connections of the preoptic region in the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 167, p. 227-256, 1976.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P.E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraotic nuclei. **Ann. Rev. Neurosci**. v6, p. 269-324, 1983.

SWANSON, L.W.; SANCHEZ-WATTS, G.; WATTS, A.G. Comparison of melaninconcentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. **Neurosci. Lett.** v.387, p. 80-84, 2005. SWEET, D. C.; LEVINE, A. S.; BILLINGTON, C. J.; KOTZ, C. M. Feeding response to central orexins. **Brain Res.** v. 821, p. 535-538, 1999.

TACHÉ, Y.; YANG, H. Brain regulation of gastric acid secretion by peptides. Sites and mechanisms of action. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 597, p. 128-145, 1990.

TAKAHASHI, N.; OKUMURA, T.; YAMADA, H.; KOHGO, Y. Stimulation of gastric acid secretion by centrally administred orexin-A in conscious rats. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 254, p. 623-627, 1999.

TAKAHASHI, T.; OWYANG, C. Vagal control of nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide release in the regulation of gastric relaxation in rat. **J. Physiol.** v. 484, p. 481-492, 1995.

TAN, C. P.; SANO, H.; IWAASA, H.; PAN, J.; SAILER, A. W.; HRENIUK, D. L.; FEIGHNER, S. D.; PALYHA, O. C.; PONG, S. S.; FIGUEROA, D. J., AUSTIN, C. P.; JIANG, M. M.; YU, H.; ITO, M.; GUAN, X. M.; MACNEIL, D. J.; KANATANI, A.; VAN DER PLOEG, L. H.; HOWARD, A. D. Melanin concentrating-hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. **Genomics.** v. 79, p. 785-792, 2002.

THOMPSON, R. H.; SWANSON, L.W. Strucutural characterization of a hypothalamic visceromotor pattern generator network. **Brain Res. Rev.**, v. 41, p. 153-202, 2003.

THORPE, A. J.; MULLETT, M. A.; WANG, C.; KOTZ, C. M. Peptides that regulate food intake: regional, metabolic, and circadian specificity of lateral hypothalamic orexin A feeding stimulation. J. Physiol. Regul. Int. Comp. Physiol. v. 284, p. 1409-1417, 2003.

THORPE, A. J.; DOANE, D. F.; SWEET, D. C.; BEVERLY, J. L.; KOTZ, C. M. Orexin A in the rostrolateral hypothalamic area induces feeding by modulating GABAergic transmission. **Brain Res.** v. 1125, p. 60-66, 2006.

TORREALBA, F.; CARRASCO, M. A. A review on electron microscopy and neurotransmitter system. **Brain Res. Rev.** v. 47, p. 5-17, 2004.

TORREALBA, F.; YANAGISAWA, M.; SAPER, C. B. Colocalization of orexin a and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. **Neuroscience.** v. 119, p. 1033-1044, 2003.

TRAMU, G.; PILLEZ, A.; LEONARDELLI, J. An efficient method of antibody eluitio for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. **J. Histochem. Cytochem.** v. 26, p. 322-324, 1978.

TRAVAGLI, R. A.; HERMANN, G. E.; BROWNING, K. N.; ROGERS, R. C. Brainstem circuits regulating gastric function. **Annu. Rev. Physiol.** v. 68, p. 279-305, 2006.

TRAVAGLI, R. A.; HERMANN, G. E.; BROWNING, K. N.; ROGERS, R. C. Musings on the wanderer: What's new in our under-standing of vago-vagal reflexes?: III. Activitydependent plasticity in vago-vagal reflexes controlling the stomach. **J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** v. 284, p. 80-87, 2003. TRAVAGLI, R. A.; ROGERS, R. C. Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. V. Fast and slow extrinsic modulation of dorsal vagal complex circuits. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. v. 281, p. 595-601, 2001.

TRITOS, N. A.; MARATOS-FLIER, E. Two important systems in energy homeostasis: melanocortins and melanin-concentrating hormone. **Neuropeptides.** v. 33, p. 339-349, 1999.

TRIVEDI, P.; YU, H.; MACNEIL, D. J.; VAN DER PLOEG, L. H.; GUAN, X. M. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. **FEBS Lett.** v. 438, p. 71-75, 1998.

TSUKAMOTO, K.; HAYAKAWA, T.; MAEDA, S.; TANAKA, K.; SEKI, M.; YAMAMURA, T. Projections to the alimentary canal from the dopaminergic neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus of the rat. **Auton. Neurosci.** v. 123, p. 12-18, 2005.

TSUKAMURA, H.; THOMPSON, R. C.; TSUKAMURA, S.; OHKURA, S.; MAEKAWA, F.; MORIYAMA, R.; NIWA, Y.; FOSTER, D. L.; MAEDA, K. I. Intracerebroventricular administration of melanin-concentrating hormone suppresses pulsatile luteinizing hormone release in the female rat. **J. Neuroendocrinol.** v. 12, p. 529-534, 2000.

VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. v. 18, p. 158-168, 2008. VALENTINO, R.J.; PAVCOVICH, L.A.; HIRATA, H. Evidence for corticotropin-releasing hormone projections from Barrington' s nucleus to the periaqueductal gray and dorsal motor nucleus of the vagus in the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 363, p. 402-422, 1995.

VAN DER KOOY, D.; KODA, L.Y.; MCCGINTY, J.F.; GERFEN, C.R.; BLOOM, F.E. The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. **J. Comp. Neurol.** v. 224, p. 1-24, 1984.

VAUGHAN, J. M.; FISCHER, W. H.; HOEGER, C.; RIVIER, J.; VALE, W. Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. **Endocrinol**. v. 125, p. 1660-1665, 1989.

VERRET, L.; GOUTAGNY, R.; FORT, P.; CAGNON, L.; SALVERT, D.; LÉGER, L.; BOISSARD, R.; SALIN, P.; PEYRON, C.; LUPPI, P. H. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. **BMC Neuroscience.** v. 4, p. 19, 2003.

VIALE, A.; ZHIXING, Y.; BRETON, C.; PEDEUTOUR, F.; COQUEREL, A.; JORDAN, D.; NAHON, J. L. The melanin-concentrating hormone gene in human: flanking region analisys, fine chromosome mapping, and tissue-especific expression. **Mol. Brain Res.** v. 46, p. 243-255, 1997.

WANG, Q. P.; KOYAMA, Y.; GUAN, J. L.; TAKAHASHI, K.; KAYAMA Y.; SHIODA, S. The orexinergic synaptic innervations of serotonin- and orexin 1-receptor-containing neurons in the dorsal raphe nucleus. **Regul. Pept.** v. 126, p. 35-42, 2005.

WANG, S.; BEHAN, J.; O' NEILL, K.;WEIG, B.; FRIED, S.; LAZ, T.; BAYNE, M.; GUSTAFSON, E. HAWES, B. E. Identification and pharmacological characterization of a novel human melanin-concentrating hormone receptor, mch-r2. J. Biol. Chem. v. 276, p. 34664-34670, 2001.

WILLIE, J. T.; CHEMELLI, R. M.; SINTON, C. M.; YANAGISAWA, M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. **Annu Rev. Neurosci.** v. 24, p. 429-458, 2001.

XU, I-L.; JACKSON, V. R.; CIVELLI, O. orphan G protein-coupled receptors and obesity. **Eur. J. Pharmacology.** v. 500, p. 243-253, 2004.

YAMANAKA, A.; BEUCKMANN, C. T.; WILLIE, J. T.; HARA, J.; TSUJINO, N. MIEDA, M. TOMINAGA, M. YAGAMI, K.; SUGIYAMA, F.; GOTO, K.; YANAGISAWA, M.; SAKURAI, T. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. **Neuron.** v. 38, p. 701-713, 2003.

YAMANAKA, A.; SAKURAI, T.; KATSUMOTO, T.; YANAGISAWA, M.; GOTO, K. Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but hás no effect on body weight. **Brain Res.** v. 849, p. 248-252, 1999.

ZHENG, H.; BERTHOUD, H. R. Functional vagal input to gastric myenteric plexus as assessed by vagal stimulation-induced Fos expression. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. v. 279, p. 73-81, 2000.

ZHENG, H.; PATTERSON, L. M.; BERTHOUD, H. R. Orexin-A projections to the caudal medullaand orexin-induced c-fos expression, food intake, and autonomic function. **J. Comp. Neurol.** V. 485, p. 127-142, 2005a.

ZHENG, H.; PATTERSON, L. M.; MORRISON, C.; BANFIELD, B. W.; RANDALL, J. A; BROWNING, K. N.; TRAVAGLI, R. A.; BERTHOUD, H. R. Melanin concentrating hormone innervation of caudal brainstem areas involved in grastrointestinal functions and energy balance. **Neuroscience.** v. 135, n. 2, p. 611-625, 2005b.

ZHENG, H.; ROGERS, R. C.; TRAVAGLI, R. A. Selective gastric projections of nitric oxide synthase-containing vagal brainstem neurons. **Neuroscience.** v. 90, p. 685-694, 1999.

ZHOU, S-Y.; LU, Y-X.; YAO, H.; OWYANG, C. Spatial organization of neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus synapsing with intragastric cholinergic and nitric oxide/VIP neurons in the rat. **J. Physiol. Gatrointest. Liver Physiol.** v. 294, p. 1201-1209, 2008.

ZHUO, H.; ICHIKAWA, H.; HELKE, C. L. Neurochemistry of the nodose ganglion. **Prog. Neurobiol.** v. 52, p. 79-107, 1997.

9. Declaração referente à Bioética e Biossegurança

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "SISTEMA NEUROPEPTIDÉRGICO DO HORMÔNIO CONCENTRADOR DE MELANINA E DA OREXINA A NO NÚCLEO MOTOR DORSAL DO NERVO VAGO EM RATO"

($\,$) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo n^g 53/03 Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia e Medicina Veterinária de Araçatuba- UNESP).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo n^{ϱ}).

Aluno: João Cleber Theodoro de Andrade Orientador: Dr. Claudio Aparecido Casatti

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana uardob X anud Nome: Função:

Prota. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO Presidente Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/IB - UNICAMP

9.1. Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA CURSOS DE ODONTOLOGIA E DE MEDICINA VETERINÁRIA

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Estudo do sistema neuropeptidérgico do hormônio concentrador de melanina (MCH) no núcleo motor dorsal do vago em ratos." sob responsabilidade do Prof. Dr. CLÁUDIO A. CASATTI, JOÃO CLEBER THEODORO DE ANDRADE e CAROL F. ELIAS está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião de 11/08/2003, de acordo com o protocolo n^c 53/03.

Araçatuba, 16 de setembro de 2003.

Colectinia (7.5. Profa. Ass. Dra. Adelina Maria da Silva

Presidente