



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRESSA BUSETTI MARTINS

**PAPEL DA OCITOCINA SOBRE OS EFEITOS DO PEPTÍDEO
INTESTINAL VASOATIVO NO CONTROLE DA
HOMEOSTASE ENERGÉTICA**



Sociedade Brasileira de Fisiologia
SBFis



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRESSA BUSETTI MARTINS

**PAPEL DA OCITOCINA SOBRE OS EFEITOS DO PEPTÍDEO
INTESTINAL VASOATIVO NO CONTROLE DA HOMEOSTASE
ENERGÉTICA**

Londrina
2017

ANDRESSA BUSETTI MARTINS

**PAPEL DA OCITOCINA SOBRE OS EFEITOS DO PEPTÍDEO
INTESTINAL VASOATIVO NO CONTROLE DA HOMEOSTASE
ENERGÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, na Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia

Coorientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Martins, Andressa Buseti.

Papel da ocitocina sobre os efeitos do peptídeo intestinal vasoativo no controle da homeostase energética / Andressa Buseti Martins. - Londrina, 2017.
35 f. : il.

Orientador: Cássia Thais Bussamra Vieira Zaia.

Coorientador: Ernane Torres Uchôa.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Ocitocina - Tese. 2. Neuropeptídeos - Tese. 3. Ácidos graxos - Tese. I. Zaia, Cássia Thais Bussamra Vieira. II. Uchôa, Ernane Torres. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

ANDRESSA BUSETTI MARTINS

**PAPEL DA OCITOCINA SOBRE OS EFEITOS DO PEPTÍDEO
INTESTINAL VASOATIVO NO CONTROLE DA HOMEOSTASE
ENERGÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, na Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Cássia Thaís
Bussamra Vieira Zaia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Rui Curi
Universidade de São Paulo – USP

Profa. Dra. Helenir Medri de Souza
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 10 de março de 2017.

Agradeço a Deus, por sempre estar presente, por me sustentar durante os períodos difíceis, por me consolar, por me manter firme em suas promessas, pelas oportunidades concedidas, pelas graças alcançadas, e pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho durante mais uma etapa dessa longa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dra^a Thaís Zaia, minha orientadora, pelo carinho e dedicação durante todos esses anos que estamos trabalhando juntas, demonstrados todos os dias, através de sua constante presença, acompanhando e orientando cada fase deste trabalho, exemplo de profissional e amiga, como uma segunda mãe. E ao Prof. Dr. Dimas Zaia, pela colaboração neste trabalho sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa, que atuou como co-orientador nessa jornada, ajudando, ensinando, animando e acrescentando demais, não só neste trabalho, mas em tudo que fizemos, obrigada pela confiança e pelo apoio.

Aos meus pais, Ivanir e Luiz, pelo apoio, compreensão, carinho e amor. Por proporcionar as melhores condições para meu crescimento, por acreditarem em meus objetivos, por sempre me aconselharem e estarem ao meu lado sempre, independente da situação, me mostrando que juntos “nós somos nós”. E a minha irmã, Larissa, por me aturar e manter-se sempre firme e confiante durante todos esses anos.

Aos meus amigos, aos novos e aos velhos. Obrigada por sempre estarem aqui, por conhecerem toda minha essência e ainda estarem aqui, tanto para as risadas quanto para os prantos. Principalmente a Natália que acompanhou vários dramas de perto e compartilhou de muitos sentimentos semelhantes. A Giovana que sempre me deu um ombro amigo, seguido de palavras de afago, quando o mundo parecia virar do contrário. A Marcela por ser muito mais que uma companheira de laboratório, por ser uma conselheira, uma irmã e uma amiga. Aos meus amigos próximos: Arthur, Jéssica e Andréia, pelas boas risadas e excelente companhia no que quer que fosse. Ana e Felipe, por sempre estarem ali, sendo muito mais que meus companheiros de casa. A Si, por sempre o amor em pessoa. E também a Marcela (Pan) por surgir de forma inusitada, ser essa pessoa maravilhosa e me apresentar outras amigas maravilhosas, que mesmo distante, são como família.

Aos meus companheiros de laboratório: Renato, Larissa, Geisielle, Letícia, Camila, João, Fabiano e Carol. Obrigada pela confiança, pela compreensão e pelas risadas, vocês são maravilhosos.

Aos docentes, discentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, no auxílio e compreensão durante todo tempo de convivência.

A tantas outras pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, em minha formação e na concretização deste trabalho.

E em especial aos auxílios financeiros: Fundação Araucária (convênio 323/2012, protocolo n. 23275) e PRONEX-CNPq-Fundação Araucária (convênio 250/2013, protocolo n. 24732) e à bolsa de mestrado da CAPES.

“Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que, quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho.”

Coleman Cox

MARTINS, A. B. **Papel da ocitocina sobre os efeitos do peptídeo intestinal vasoativo no controle da homeostase energética.** 2017. 35 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) é um neurotransmissor anorexígeno atuando nas vias hipotalâmicas que participam do controle neural de ingestão alimentar. A ocitocina (OT) participa do controle da homeostase energética e tem papel inibitório sobre a ingestão alimentar. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a participação da ocitocina nos efeitos do VIP sobre a ingestão alimentar, e no plasma glicemia, ácidos graxos livres (AGL) e corticosterona. Para isso, por estereotaxia para microinjeção intracerebroventricular, foi implantada cânula guia, em ratos machos adultos Wistar. No 7º dia pós-cirurgia, com jejum prévio de 16 horas, os ratos receberam microinjeção de antagonista de receptor de ocitocina (vasotocina, OVT) ou salina (0,9%) e após 15 min, receberam uma segunda microinjeção de VIP ou salina. Após 15 min da segunda microinjeção houve: 1) avaliação da ingestão alimentar por 120 min 2) eutanásia para coleta de sangue ou 3) os animais receberam uma única microinjeção de salina ou VIP e após 90 min foram anestesiados e tiveram o cérebro perfundido e retirado para análise imunistoquímica por FRA-OT (antígenos relacionados à FOS-ocitocina). Observou-se hiperglicemia após microinjeção de VIP ($p < 0,0001$) e o pré-tratamento com OVT bloqueou parcialmente o efeito do VIP, de modo que OVT reduziu a glicemia quando microinjetado antes de VIP. A concentração plasmática de corticosterona ($\mu\text{g/dL}$) aumentou significativamente ($p < 0,0001$) após microinjeção de VIP ou OVT comparado com salina, e o pré-tratamento com OVT reverteu parcialmente os efeitos do VIP. Houve diminuição dos valores plasmáticos de ácidos graxos livres ($\mu\text{moles.dL}^{-1}$) após a microinjeção de VIP ($p < 0,001$), mas aumento com microinjeção de OVT ou quando VIP foi microinjetado após o OVT ($p < 0,002$). Houve redução ($p < 0,0001$) da ingestão alimentar após a microinjeção de VIP em relação ao grupo controle ($p = 0,001$) e o pré-tratamento com OVT reverteu parcialmente o efeito do VIP. A imunistoquímica aponta aumento qualitativo na expressão de FRA no grupo que recebeu VIP e presença de neurônios duplamente marcados (FRA-OT) nas regiões parvocelular medial e posterior, sugerindo a participação de neurônios OT no controle de ingestão alimentar promovido pelo VIP. O tratamento prévio com OVT promoveu reversão parcial do efeito anorexígeno e das alterações metabólicas plasmáticas promovidas pelo VIP, sugerindo a participação da ocitocina nestes efeitos do VIP sobre a homeostase energética.

Palavras-chave: PVN. Vasotocina. AGL. Corticosterona.

MARTINS, A.B. **Role of oxytocin on the effects of vasoactive intestinal peptide on energy homeostasis control.** 2017. 35 p. Dissertation (Master's degree Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The vasoactive intestinal peptide (VIP) is an anorectic neurotransmitter acting on the hypothalamic pathways that participate in the neural control of food intake. Oxytocin (OT) participates in the control of energetic homeostasis and the inhibitory time on a food intake. The objective of this study was to evaluate the participation of the disease in the effects of VIP on a food intake, in plasma glucose, free fatty acids (FFA) and corticosterone. For this, by means of stereotaxia for intracerebroventricular microinjection, a guide cannula was implanted in adult male Wistar rats. On the 7th postoperative day, with a previous fast of 16 hours, microbes with microinjection of oxytocin receptor antagonist (vasotocin, OVT) or saline (0.9%) and after 15 minutes, received a second microinjection of VIP or saline. After 15 minutes of the second microinjection: 1) evaluation of food intake for 120 minutes 2) euthanasia for blood collection or 3) animals received a single microinjection of saline or VIP and after 90 minutes were anesthetized and had the brain perfused and withdrawn for analysis Immunohistochemistry by FRA-OT (FOS-oxytocin-related antigens) Hyperglycemia was observed after microinjection of VIP ($p < 0.0001$) and pre-treatment with OVT partially blocked the effect of VIP, so that OVT reduced glycemia when Microinjected Before VIP. Plasma corticosterone concentration ($\mu\text{g} / \text{dL}$) increased significantly ($P < 0.0001$) after microinjection of VIP or OVT compared to saline, and pre-treatment with OVT partially reversed the effects of VIP. Plasma levels of AGL ($\mu\text{moles.dL}^{-1}$) decreased after VIP microinjection ($p < 0.001$), and there was an increase in AGL with microinjection of OVT or when VIP was microinjected after OVT ($p < 0.002$). There was a reduction ($p < 0.0001$) in food intake after a microinjection of VIP in relation to the control group ($p = 0.001$). Immunohistochemistry points to a qualitative increase in the expression of FRA not in the VIP group, and double-labeled neurons (FRA-OT) were also observed in the medial and posterior parvocellular regions, suggesting a participation of neurons. Previous treatment with OVT tends to partially reverse the anorectic effect and plasma metabolic changes promoted by VIP, evidencing a role for an oxytocin in these VIP effects on an energy homeostasis.

Key words: PVN. Vasotocin. Glycemia. FFA. Corticosterone.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cortes coronais mostrando as coordenadas -1,8 e -2,12 mm em relação ao Bregma. Destacando as porções PaMP (vermelho) e PaPo (azul) do PVN.....20
- Figura 2.** Valores médios (\pm e.p.m.) da concentração plasmática de glicose (mg.dL^{-1}) de ratos microinjetados ICV com veículo (V), salina (SAL), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) ou vasotocina (OVT)22
- Figura 3.** Valores médios (\pm e.p.m.) da concentração plasmática de corticosterona ($\mu\text{g. dL}^{-1}$) de ratos microinjetados ICV com veículo (V), salina (SAL), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) ou vasotocina (OVT).....20
- Figura 4.** Valores médios (\pm e.p.m.) da concentração plasmática de ácidos graxos livres ($\mu\text{moles. dL}^{-1}$) de ratos microinjetados ICV com veículo (V), salina (SAL), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) ou vasotocina (OVT).....23
- Figura 5.** Valores médios (\pm e.p.m.) da quantidade de alimento ingerido ($\text{g}/100\text{g}$ peso corpóreo) por duas horas, após microinjeção (ICV) de veículo (V), salina (SAL), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) ou vasotocina (OVT) em ratos..... 23
- Figura 6.** Fotomicrografias representativas das secções coronais, que mostram a imunoreactividade FRA-OT na subdivisão PaMP do PVN de animais microinjetados com salina ou VIP 24
- Figura 7.** Fotomicrografias representativas das secções coronais, que mostram a imunoreactividade FRA-OT na subdivisão PaPo do PVN de animais microinjetados com salina ou VIP 25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CCK	Colecistoquinina
DMH	Núcleo dorsomedial do hipotálamo
FRA	<i>Fos-related antigens</i>
FRA-OT	Antígenos relacionados à FOS-Ocitocina
ICV	Intracerebroventricular
LH	Hipotálamo lateral
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário
OT	Ocitocina
OVT	Vasotocina
PaMP	Região parvocelular medial do PVN
PaPo	Região parvocelular posterior do PVN
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SAL	Salina
SCN	Núcleo supraquiasmático do hipotálamo
SNC	Sistema nervoso central
SO	Núcleo supraóptico do hipotálamo
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
VMH	Núcleo ventromedial do hipotálamo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	Drogas	14
3.2	Animal	15
3.3	Protocolos experimentais	15
3.4	Procedimentos cirúrgicos	16
3.5	Eutanásia	17
3.6	Procedimentos analíticos	17
3.7	Análise histológica	18
3.8	Perfusão de cérebro	18
3.9	Imunoistoquímica FRA-OT	19
3.10	Análise estatística	21
4	RESULTADOS	21
4.1	Efeito do pré-tratamento central com o antagonista do receptor de OT na microinjeção de VIP sobre alguns parâmetros plasmáticos	21
4.2	Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor de OT na microinjeção central de VIP na quantidade de alimento ingerido	23
4.3	Análise imuno-histoquímica FRA-OT	24
5	DISCUSSÃO	26
6	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

Balanço energético, apetite e ganho de peso são temas de grande interesse atualmente e os mecanismos que controlam estes parâmetros e os transtornos alimentares têm sido alvo de vários estudos. No Brasil, o número de casos de obesidade está aumentando a cada ano e dados recentes do IBGE mostram que 51% da população brasileira está acima do peso sendo que os homens são a maioria (54%) e nas mulheres o índice chega a 48%. Dentro desse percentual, 18% das mulheres e 16% dos homens são obesos (IBGE, 2013; ABESO, 2015). A bulimia, anorexia nervosa e principalmente a obesidade se tornaram problemas de saúde pública mundial devido às complicações associadas, como o desenvolvimento de *diabetes mellitus*, dislipidemias, hipertensão arterial e outros problemas cardiovasculares.

Diversos pesquisadores mostram como ocorre o controle fisiológico da ingestão alimentar. Esses mecanismos de regulação são complexos e envolvem geralmente o sistema nervoso central (SNC), mais especificamente áreas hipotalâmicas, e tecidos periféricos (WOODS et al., 1998). A estimulação do hipotálamo lateral (LH) promove aumento da ingestão alimentar e sua lesão bilateral gera anorexia (BROBECK, TEPPERMAN, LONG, 1943; SHIMAZU et al., 1966; LEIBOWITZ e WORTLEY, 2004; WELKENHUSEN et al., 2008). A estimulação do núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) causa saciedade e sua destruição bilateral resulta em hiperfagia e obesidade (HETHERINGTON e RANSON, 1940; ZAIA et al., 1987). O núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) tem papel no controle da saciedade e sua lesão também resulta em hiperfagia e obesidade (WILLIAN et al., 2001; BERNARDIS e BELLINGER, 1984; ZAIA et al., 1997). O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) tem um papel importante, pois sinais de outros núcleos se direcionam a ele (WILLIANS et al., 2001) e dele partem estímulos para o LH desencadeando ativação da via de fome e ingestão alimentar (AKABAYASHI et al., 1994). O núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) tem papel importante como um dos alvos da sinalização hormonal devido a sua localização hipotalâmica, próximo da eminência média e na qual a barreira hematoencefálica é modificada (BROADWELL e BRIGHTMAN, 1976), propiciando e facilitando maior contato de moléculas de alto peso molecular, como insulina e leptina, com receptores nessa

área (BRUIJNZEIL et al., 2011; LEIBOWITZ e WORTLEY, 2004). A ingestão alimentar e seus sinais neurais e humorais vindos do sistema gastrointestinal afetam regiões do tronco cerebral caudal, incluindo o núcleo do trato solitário (NTS); nessa área a ocitocina exerce um efeito estimulador sobre a resposta de colecistoquinina (CCK) em neurônios no NTS reduzindo o tamanho da refeição (BLEVINS et al., 2003).

Vários neuropeptídeos hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos controlam esses núcleos hipotalâmicos desencadeando fome ou saciedade (ARORA, 2006). O neuropeptídeo Y (NPY), sintetizado no ARC, é um importante modulador orexigênico estimulando o PVN e resultando em ingestão de alimentos (STANLEY et al., 1985). O NPY produz aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona, por aumento da liberação hipotalâmica do CRH (DALLMAM et al., 1995) e a síntese de NPY é dependente de corticosterona (STANLEY et al., 1989). Por outro lado, CRH tem papel anorexigênico, sua liberação é controlada por NPY (DALLMAM et al., 1995), sendo que adrenalectomia inibe os efeitos do NPY na ingestão alimentar, e a suplementação de glicocorticóide reverte esse efeito (STANLEY *et al.*, 1989; SAINSBURY et al., 1997).

O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) contém 28 resíduos de aminoácidos, pertence à família do glucagon-secretina, e foi primeiramente isolado do trato gastrointestinal (SAID e MUTT, 1970) e posteriormente do hipotálamo (TAYLOR e PERT, 1979). O VIP está presente no PVN (MORIN et al., 1994), estimula a síntese de NPY (BALBI e ALLEN, 1993) e participa de vias metabólicas induzindo a glicogenólise hepática pela ativação do AMPc (MAGISTRETTI et al., 1981). Quando microinjetado no PVN de ratos, o VIP promove uma série de alterações metabólicas, sendo, estimulação da liberação de CRH resultando em aumento plasmático do hormônio adrenocorticotrófico e de corticosterona de maneira dose dependente (ALEXANDER e SANDER, 1994), aumento de glicose e ácidos graxos livres, bem como diminuição da ingestão alimentar (LARA-GALVÃO, 2003; GHOURAB et al., 2011).

Neurônios que expressam o VIP estão distribuídos em diversas áreas do SNC, como córtex, hipocampo, núcleo amigdalóide, tálamo e hipotálamo. O núcleo supraquiasmático do hipotálamo (SCN) apresenta grande concentração de neurônios VIPérgicos. Os receptores de VIP (VPAC1 e VPAC2) acoplados à

proteína G são encontrados nos núcleos hipotalâmicos supraóptico (SO), SCN, ARC, e preferencialmente na região parvocelular do PVN. Esses receptores de VIP estão também presentes na pituitária anterior (GERHOLD et al., 2001) controlando a secreção dos hormônios ocitocina (OT) e prolactina (USDIN et al., 1994; NUSSDORFER e MALENDOWICZ, 1998).

A OT é um peptídeo sintetizado nos neurônios magnocelulares e parvocelulares do PVN e nos neurônios magnocelulares do SO (GIMPL, 2001). A OT é um neuropeptídeo envolvido no controle da função autonômica e da ingestão alimentar (OLSON et al., 1991), sendo que ratos com obesidade induzida por dieta têm diminuição de ingestão alimentar e perda de peso com administração periférica de OT (MORTON et al., 2012). A resposta de inibição da ingestão alimentar por OT em ratos é dose-dependente, podendo ser prevenida pela administração intracerebroventricular (ICV) de vasotocina (OVT), um antagonista do receptor de ocitocina (ARLETTI et al., 1989).

Alguns autores sugerem que OT no cérebro medeia a anorexia induzida pelo CRH e o bloqueio dos receptores de OT resulta em reversão do quadro hipofágico induzido pelo CRH (OLSON et al., 1991). Sugere-se também que a OT atua como neuromodulador da hipofagia, em animais adrenalectomizados e as projeções de neurônios ocitocinérgicos do PVN para o núcleo do trato solitário poderiam contribuir para a resposta de saciedade induzida pela adrenalectomia (UCHÔA et al., 2009; UCHÔA et al., 2013).

O PVN apresenta 8 subdivisões, sendo 3 delas magnocelulares-anterior, medial e posterior e 5 parvocelulares-periventricular, anterior, dorsal, lateral e medial. A divisão magnocelular projeta-se para a porção posterior da hipófise, responsável pela secreção de OT e vasopressina, e alguns agrupamentos neuronais da região parvocelular se projetam para regiões relacionadas no tronco encefálico, medula espinhal e eminência mediana (AIRES, 2012, p.372-373). Testes imunistoquímicos indicaram que os principais alvos das fibras dos neurônios OT e de vasopressina para o cérebro são a porção medial do núcleo do trato solitário, o núcleo motor dorsal do vago, o núcleo comissural e o núcleo reticular lateral e nessas áreas, as fibras de ocitocina predominam (SOFRONIEW, 1980). Técnicas de identificação de mRNAs em tecidos, como a imunistoquímica, utilizam de famílias de proteínas como o c-FOS, que alteram a transcrição gênica, em resposta a sinais

na superfície da célula, para localizar o núcleo da célula e são úteis para avaliar ativação neuronal, permitindo a detecção de marcadores no núcleo, no citoplasma ou em ambos, com uma técnica de dupla marcação (HOFFMAN et al., 1993). Uchôa et al. (2009) observaram, por meio da técnica de imunistoquímica, que a realimentação induz um aumento no número de neurônios imuno-reativos de Fos/OT na região parvocelular posterior do PVN (PaPo) em animais controle, indicando que os neurônios de OT do PVN estão relacionados com resposta de saciedade. Por outro lado, na região parvocelular medial de PVN (PaMP) houve um aumento no número de neurônios imunorreativos para Fos, mas poucos neurônios com dupla marcação Fos/OT, sugerindo que nesta região a maioria dos neurônios expressando Fos são neurônios CRH (UCHÔA et al., 2009).

Sabendo que: a) o VIP promove anorexia, aumento de glicemia, corticosterona e AGL plasmáticos, e estimula a secreção de CRH e OT; b) o CRH é anorexígeno e tem sua ação mediada pela OT; c) a OT estimula a anorexia e controla metabólitos em situação de estresse; d) OVT bloqueia a OT, surge a questão. Poderia a ocitocina participar da anorexia causada pelo VIP?

2 OBJETIVOS

Avaliar a participação da ocitocina nos efeitos do VIP sobre parâmetros plasmáticos (glicose, ácidos graxos livres e corticosterona) e de ingestão alimentar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Drogas

As drogas microinjetadas foram: VIP (Sigma Co., CA) na dose de 40 ng/g rato em 6 μ L/1min (ALEXANDER e SANDER, 1994); e vasotocina (OVT, Peninsula/Bachem) 5 μ g em 5 μ L/1min (UCHÔA et al., 2019, 2013). Como veículo foi microinjetado 5 μ L/1min de salina estéril (NaCl 0,9%).

3.2 Animal

Foram utilizados ratos adultos Wistar (n=159), pesando entre 260-280 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF), com ambiente de luz (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 °C) controladas, e água e alimentação à vontade, sendo que somente após 48 horas de adaptação ao novo ambiente, os animais foram submetidos aos procedimentos experimentais. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo (LaFiNeM) do CIF/UEL e sempre pela manhã, para minimizar qualquer influência do ritmo circadiano. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (processo N° 4929.2015.80).

3.3 Protocolos experimentais

Todos os animais foram submetidos à estereotaxia e, após 6 dias de recuperação deste procedimento, os ratos foram submetidos a jejum de 16 horas e no dia seguinte (7º dia pós-cirúrgico) foram realizados os experimentos.

Para os *Protocolos 1 e 2*, os animais receberam duas microinjeções intracerebroventricular (ICV), com intervalo de 15 min entre elas, e constituíram os seguintes grupos experimentais:

- *Grupo SAL-SAL*: ratos que receberam duas microinjeções ICV de salina, como veículos da OVT e VIP;
- *Grupo OVT-SAL*: ratos que receberam microinjeção ICV de OVT e de salina (como veículo do VIP);
- *Grupo SAL-VIP*: ratos que receberam microinjeção ICV de salina (como veículo da OVT) e de VIP;
- *Grupo OVT-VIP*: ratos que receberam microinjeção ICV de OVT e de VIP.

Protocolo 1. Avaliação do efeito do pré-tratamento central com antagonista do receptor de OT na microinjeção central de VIP em parâmetros plasmáticos: 93 ratos foram agrupados como descrito anteriormente e, após 15 min da segunda

microinjeção ICV, foram eutanasiados por decapitação e o sangue coletado em tubos heparinizados para obtenção de plasma, que foi utilizado para dosagens plasmáticas.

Protocolo 2. Avaliação do efeito do pré-tratamento central do antagonista do receptor de OT na microinjeção central de VIP na quantidade de alimento ingerido: 66 ratos foram agrupados como descrito anteriormente e, após 15 min da segunda microinjeção ICV, ração foi ofertada, sendo a ingestão alimentar avaliada no período de 120 min após a oferta de alimento.

Protocolo 3. Avaliação da microinjeção central de VIP na ativação de neurônios que expressam OT no PVN: 24 ratos receberam uma única microinjeção ICV de salina ou VIP e após 90 min da microinjeção foram submetidos à perfusão transcardíaca.

3.4 Procedimentos cirúrgicos

Cirurgia estereotáxica foi realizada em animais anestesiados i.p. com dose de 100 mg/kg de ketamina (Agener União, 10%) e 20 mg/kg de cloridrato de xilazina (Anasedan®; Vetbrands, Jacareí, Brazil; 2%) e, ao entrarem em anestesia, foi realizada a tricotomia seguida de injeção de 0,3 mL de cloridrato de lidocaína 2% na região dorsal da cabeça do animal. Por estereotaxia unilateral, foi implantada cânula-guia de aço inoxidável (0,7 mm de diâmetro externo, 0,4 mm de diâmetro interno e 10 mm de comprimento), no ventrículo lateral direito AP = - 0,8 mm; H = - 3,6 mm; L = - 1,5 mm; utilizando-se como referências o Bregma, a calota craniana e a sutura sagital, respectivamente, segundo coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (1997). A cânula-guia foi então fixada com acrílico autopolimerizante (Simplex®) sobre a calota craniana, onde previamente foram fixados parafusos para assegurar a adesão do polímero ao osso. O critério para a verificação da posição da cânula no ventrículo lateral se deu pelo influxo de salina (NaCl 0,9%), por meio de uma coluna de salina, durante a cirurgia de implantação da cânula. Dentro da cânula implantada, um mandril de aço foi posicionado para evitar a sua obstrução por detritos após o procedimento cirúrgico. Ao final da cirurgia, foi dada uma dose profilática de antibiótico (50.000 unidades de penicilina G: 0,1 mL por 100 g de peso corpóreo via intramuscular) e paracetamol (200 mg/kg, via oral). Os animais foram

mantidos em gaiolas coletivas contendo no máximo três animais, para melhor recuperação da cirurgia, recebendo água e alimentação à vontade. Dois dias antes do jejum eles foram acomodados em gaiolas individuais para adaptação.

3.5 Eutanásia

Todos os animais utilizados nos experimentos foram eutanasiados por decapitação e, imediatamente após, os cérebros foram retirados e colocados em recipientes contendo solução fixadora de formol (10%) para posterior análise histológica para verificação da posição da cânula, ou então levados ao congelador para conservação e futuras análises. O sangue também foi imediatamente coletado em tubos heparinizados e centrifugados a 14000 x g por 20 min a 4 °C para a obtenção do plasma que foi separado em alíquotas e armazenado a -20 °C para posteriores dosagens por métodos químicos.

3.6 Procedimentos analíticos

3.6.1 Dosagem de glicose plasmática: a determinação espectrofotométrica da concentração plasmática de glicose foi realizada utilizando-se o Kit Comercial Glicose BioLiquid (Laborclin, PR), baseado na reação da peroxidase (Trinder, 1969), onde a glicose é determinada por sua reação com a glicose oxidase, na qual são gerados o ácido glucurônico e o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio então reage com o hidroxibenzoato de sódio e 4-aminofenazona, produzindo um complexo corado de cor rosa com máximo de absorção em 500 nm. A intensidade da coloração é proporcional à concentração de glicose da amostra, sendo seus valores expressos em mg.dL⁻¹.

3.6.2 Dosagem de AGL plasmático: para a determinação plasmática da concentração de AGL foi utilizado o método espectrofotométrico de Falholt et al. (1973). Amostras de plasma (100 µL) foram submetidas a duas extrações seguidas de agitação, aspiração da fase superior e centrifugação. Como padrão, foram utilizados 50 µL de ácido palmítico (2 mmolar) em 1,0 mL de tampão fosfato (pH 6,4) e 6,0 mL de solução extratora, e para o branco apenas a solução extratora. Na 1ª extração utilizou-se 1,0 mL de tampão fosfato (pH 6,4) e 6,0 mL de solução de

clorofórmio + heptano + metanol, e na 2ª extração 2,0 mL CuTEA (pH 8,1). Após, em 3,0 mL da fase superior foi adicionado 1,0 mL do reagente de cor (DPC: 4% de 1,5-difenilcarbazida-difenilcarbazona em 0,1 mL de TEA 1 M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm e os resultados expressos em $\mu\text{moles.dL}^{-1}$.

3.6.3 Dosagem de corticosterona plasmática: a determinação da concentração de corticosterona plasmática foi feita pelo método fluorimétrico de Guillemín et al. (1959), o qual se baseia na fluorescência da corticosterona em ácido sulfúrico. Para a execução do método, tem-se como solução padrão 1 mg de corticosterona dissolvida em 10 mL de etanol absoluto. Em relação às amostras dos animais, 200 μL de plasma foram acrescidos em 6 mL de diclorometano, com posterior agitação e aspiração da fase superior, possibilitando a partição e extração da corticosterona. Após isso, 500 μL de NaOH 0,1 N foram adicionados à amostra para lavagem, seguido por agitação e aspiração da fase superior; após, 500 μL de água destilada foram adicionados, fez-se agitação. Como branco, apenas 4 mL de diclorometano foram utilizados. Na segunda etapa do método, 5, 10 e 20 μL de solução "working" (0,5 mL de solução padrão e etanol) foram adicionados ao tubo da solução padrão e 1 mL de (H_2SO_4 : etanol) foi acrescido à todos os tubos para uma segunda extração, seguido por agitação, em repouso de 20 min. A leitura foi feita em fluorímetro, com excitação 477 nm, emissão 520 nm e sensibilidade 11. Os valores da concentração plasmática de corticosterona obtidos foram expressos em $\mu\text{g.dL}^{-1}$.

3.7 Análise histológica

Para a avaliação do posicionamento correto da cânula, os cérebros foram removidos cuidadosamente após a eutanásia, fixados em formol 10% por 15 dias e por secção transversal, foram feitas fatias sucessivas de 60 μm até a identificação do posicionamento da cânula. Para a análise dos cortes histológicos utilizou-se o atlas de Paxinos e Watson (1997).

3.8 Perfusão de cérebro

Os animais do protocolo 3 foram anestesiados com solução de ketamina (Cloridrato de cetamina, Agener; 80 mg/Kg peso corporal, i.p.) associada com

xilazina (Coopazine®, Coopers; 10 mg/Kg peso corporal, i.p.) e, após o desaparecimento dos reflexos raqui-medulares, foram submetidos à perfusão do SNC. A perfusão intracardíaca foi iniciada com a infusão de 200 mL de solução salina isotônica (NaCl 0,15 M) com heparina (diluição 1:80) seguida pela infusão de 400 mL de paraformoldeído 4%, utilizando bomba peristáltica com velocidade de infusão de 10 mL/min. O tecido foi pós-fixado em paraformoldeído 4%, por 1 h, e então estocado em uma solução de sacarose 30% a 4 °C para a realização dos procedimentos imunoistoquímicos.

3.9 Imunoistoquímica FRA-OT

Para a avaliação imunoistoquímica de FRA (antígenos relacionados à Fos - *Fos-related antigens*), que são proteínas quimicamente semelhantes ao FOS, e FRA-OT (antígenos relacionados à FOS-ocitocina), os tecidos cerebrais foram seccionados em cortes de 30 µm de espessura utilizando-se um criostato, separados em alíquotas e mantidos em solução crioprotetora em freezer -20 °C. No primeiro dia, os cortes foram lavados três vezes com tampão fosfato (PB 0,01 M, pH: 7,4) por 5 min cada lavagem, e imediatamente após, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução H₂O₂ (30%) durante 30 min em agitação leve, e após o bloqueio os cortes foram lavados três vezes em PB 0,01M durante 5 min por lavagem. Em seguida, fez-se o bloqueio das ligações inespecíficas utilizando-se albumina bovina 5% durante uma hora, e logo após incubou-se com o primeiro anticorpo anti-FRA (1:2000, K25, Santa Cruz), sob agitação leve durante uma hora em temperatura ambiente e incubação por 48 horas a 4 °C. No segundo dia, lavou-se os cortes com PB 0,01 M três vezes por 5 min cada, e posteriormente incubou-se com o segundo anticorpo (biotinilado, 1:200, Vector) por uma hora sob agitação leve, e em seguida lavou-se mais três vezes por 5 min cada. Incubou-se com solução avidina-biotina-peroxidase (1:200, ABC, Vectastain) durante uma hora sob agitação, e após lavou-se mais três vezes por 5 min. Para a visualização da expressão de FRA, os cortes foram revelados empregando-se diaminobenzidina (DAB 0,01%) e cloreto de níquel como cromógenos, cuja reação conferiu ao núcleo das células uma coloração de violeta escuro a preto. Após a revelação, os cortes foram lavados com PB 0,01 M e logo em seguida foram encubados com albumina 5% por uma hora, para o bloqueio das ligações inespecíficas, e posteriormente foram incubados com

primeiro anticorpo anti-OT (1:20 000, Bachem) durante uma hora em temperatura ambiente e em seguida durante 48 horas, a 4 °C. No terceiro dia, os cortes foram lavados com PB 0,01 M e incubados com o segundo anticorpo biotilado (1:200, Vector), durante uma hora sob agitação leve. Em seguida, os cortes foram lavados com PB 0,01 M e depois incubado com solução ABC (1:200, Vectastain) por uma hora sob agitação. Após, os cortes foram lavados novamente com PB 0,01M, e para a revelação empregou-se DAB, cuja reação conferiu ao citoplasma cor marrom escura, e depois foram lavados três vezes os cortes com PB 0,01 M por 5 min cada. Em seguida, os cortes foram montados em lâminas histológicas, para posterior análise em microscópio óptico. As fotomicrografias representativas foram feitas com o auxílio de um sistema de imagem acoplado ao microscópio (Motic). A delimitação do PVN foi realizada com base nas coordenadas descritas por Paxinos e Watson (2009). As porções parvocelular medial (PaMP) e parvocelular posterior (PaPo) do PVN foram avaliadas nas coordenadas -1,8 e -2,12 mm em relação ao bregma, respectivamente, conforme o esquema a seguir.

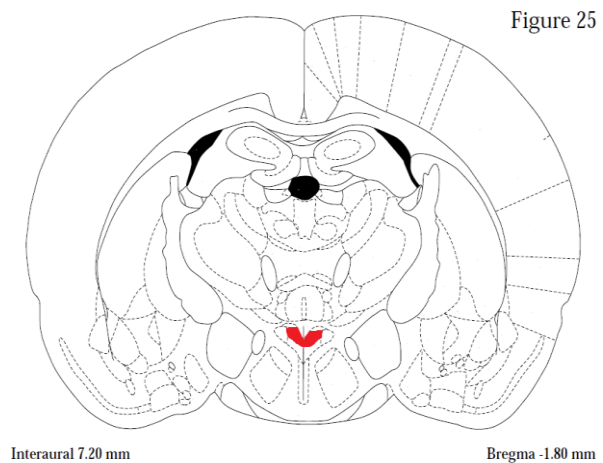
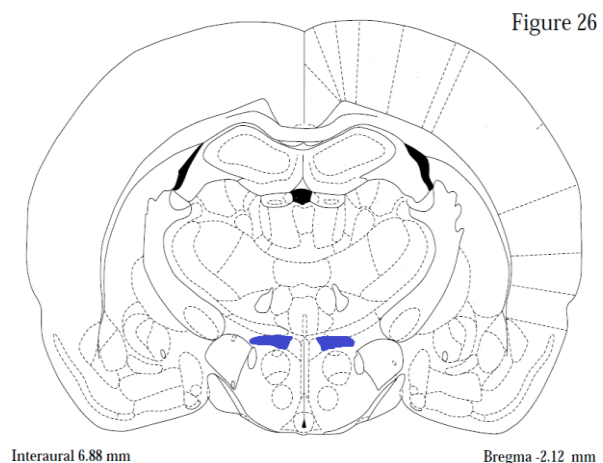


Figura 1. Cortes coronais mostrando as coordenadas -1,8 e -2,12 mm em relação ao Bregma. Nos destaques estão em vermelho a porção parvocelular medial (PaMP) e em azul a porção parvocelular posterior (PaPo) do núcleo paraventricular do hipotálamo, que foram consideradas no estudo. Retirado de Paxinos e Watson (2009).



3.10 Análise estatística

A distribuição normal e a homogeneidade dos dados foram testados e os resultados foram então analisados por Análise de Variância (ANOVA) two-way Anova, sendo apresentados como médias \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os cálculos e os testes paramétricos foram realizados no programa Graph Pad Prism 6.0 e Sigma Plot 11.0, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do pré-tratamento central com o antagonista do receptor de OT na microinjeção de VIP sobre alguns parâmetros plasmáticos

Pelos resultados da figura 2, verifica-se hiperglicemia (mg/dL^{-1}) após microinjeção de VIP (SAL-VIP, $n=14$: $171,92 \pm 5,35$; $p < 0,001$) comparado com o grupo salina (SAL-SAL, $n=15$: $113,26 \pm 5,17$). O grupo tratado com OVT não diferiu do grupo salina (OVT-SAL, $n=17$: $116,57 \pm 4,85$), no entanto, OVT reduziu significativamente ($p < 0,001$) a glicemia quando microinjetado antes do VIP (OVT-VIP, $n=13$: $140,03 \pm 5,55$), entretanto o grupo OVT-VIP apresentou aumento da glicemia quando comparado ao grupo OVT-SAL ($p < 0,003$).

A concentração plasmática de corticosterona ($\mu\text{g.dL}^{-1}$) aumentou significativamente ($p < 0,001$) após a microinjeção de VIP (SAL-VIP, $n=14$: $50,31 \pm 3,33$) ou de OVT-SAL ($42,13 \pm 3,02$; $n=17$) em relação ao grupo salina SAL-SAL ($32,50 \pm 3,22$; $n=15$); o grupo OVT-SAL não foi diferente dos grupos SAL-VIP e OVT-VIP ($50,61 \pm 3,46$; $n=13$) (figura 3).

Os valores plasmáticos de AGL ($\mu\text{moles.dL}^{-1}$) diminuíram após a microinjeção de VIP (SAL-VIP, $n=14$: $58,04 \pm 4,34$) quando comparado ao grupo salina (SAL-SAL, $n=15$: $76,93 \pm 4,20$). Por outro lado, houve aumento dos AGL com microinjeção de OVT (OVT-SAL, $n=17$: $77,12 \pm 3,94$) ou quando VIP foi microinjetado após o OVT (OVT-VIP, $n=13$: $78,21 \pm 4,51$) em comparação com o com o grupo SAL-SAL ou SAL-VIP, respectivamente. Os grupos OVT-SAL e OVT-VIP não diferiram estatisticamente entre si (figura 4).

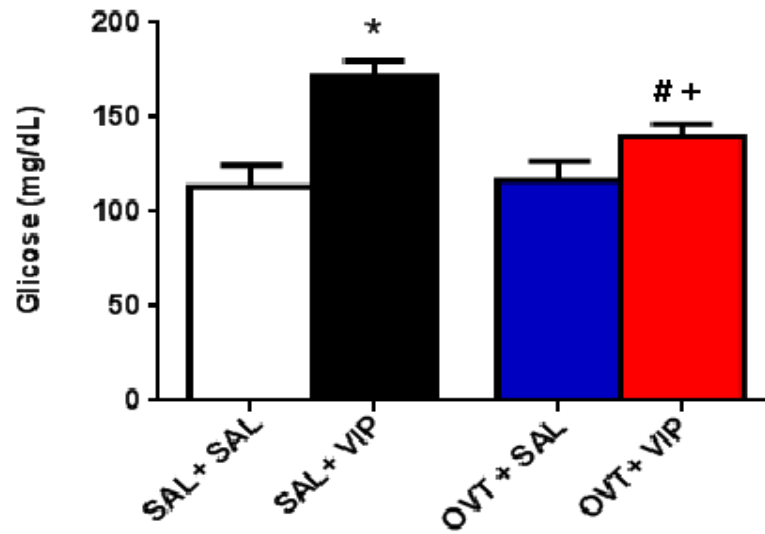


Figura 2. Valores médios (\pm e.p.m.) da concentração plasmática de glicose (mg.dL^{-1}) de ratos microinjetados ICV com salina (SAL), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) ou vasotocina (OVT). *Diferente do grupo SAL-SAL ($p < 0,001$). #Diferente dos grupos SAL-VIP ($p < 0,019$) e +diferente do grupo OVT-SAL ($p < 0,003$). Resultados analisados por análise de variância two-way ANOVA.

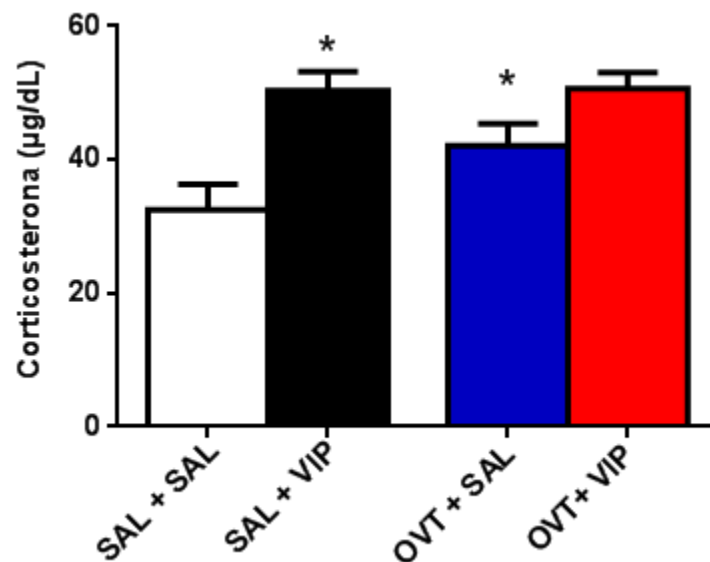


Figura 3. Valores médios (\pm e.p.m.) da concentração plasmática de corticosterona ($\mu\text{g.dL}^{-1}$) de ratos microinjetados ICV com salina (SAL), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) ou vasotocina (OVT). *Diferentes do grupo SAL-SAL ($p < 0,001$). Resultados analisados por análise de variância two-way ANOVA.

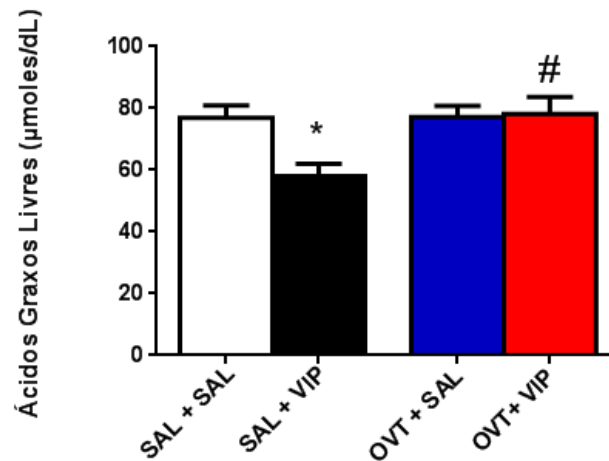


Figura 4. Valores médios (\pm e.p.m.) da concentração plasmática de ácidos graxos livres ($\mu\text{moles.dL}^{-1}$) de ratos microinjetados ICV com salina (SAL), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) ou vasotocina (OVT). *Diferente do grupo SAL-SAL ($p < 0,003$). #Diferente do grupo SAL-VIP ($p < 0,002$). Resultados analisados por análise de variância two-way ANOVA.

4.2 Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor de OT na microinjeção central de VIP na quantidade de alimento ingerido

Pelos resultados da figura 5, observa-se redução significativa da ingestão alimentar (g/100 g peso corpóreo) após a microinjeção de VIP (grupo SAL-VIP, $n=15$: $1,85 \pm 0,25$) em relação ao grupo salina (SAL-SAL, $n=16$: $3,58 \pm 0,24$); por outro lado, não diferiram entre si os grupos OVT-SAL ($3,06 \pm 0,23$; $n=18$) e OVT-VIP ($2,42 \pm 0,24$; $n=17$) e os grupos OVT-VIP e SAL-VIP.

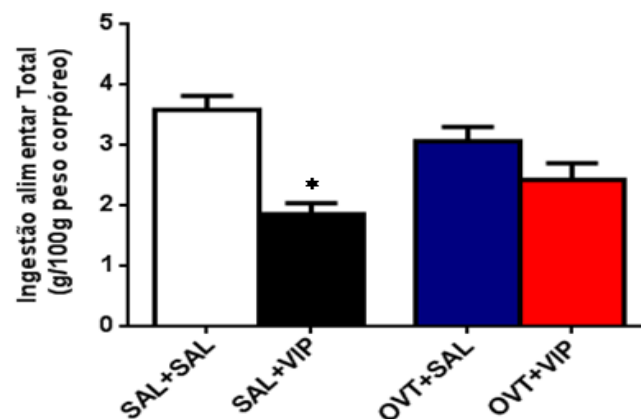


Figura 5. Valores médios (\pm e.p.m.) da quantidade de alimento ingerido (g/100g peso corpóreo) por duas horas, após microinjeção (ICV) de salina (SAL), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) ou vasotocina (OVT) em ratos. *Diferente do grupo SAL-SAL (* $p < 0,001$). Resultados analisados por análise de variância two-way ANOVA.

4.3 Análise imuno-histoquímica FRA-OT

A figura 6 mostra fotomicrografias representativas de imunoistoquímica FRA-OT no PaMP dos grupos salina e VIP. Pode-se observar que houve um aumento qualitativo no número de neurônios imunorreativos para FRA e dupla marcação FRA-OT no PaMP no grupo VIP, comparado ao grupo salina. Na figura 7 estão apresentadas fotomicrografias de imunoistoquímica FRA-OT no PaPo dos grupos salina e VIP. Tal como para o PaMP, pode-se observar que a microinjeção de VIP promoveu um aumento qualitativo no número de neurônios imunorreativos para FRA e dupla marcação FRA-OT no PaPo, comparado com o tratamento com salina.

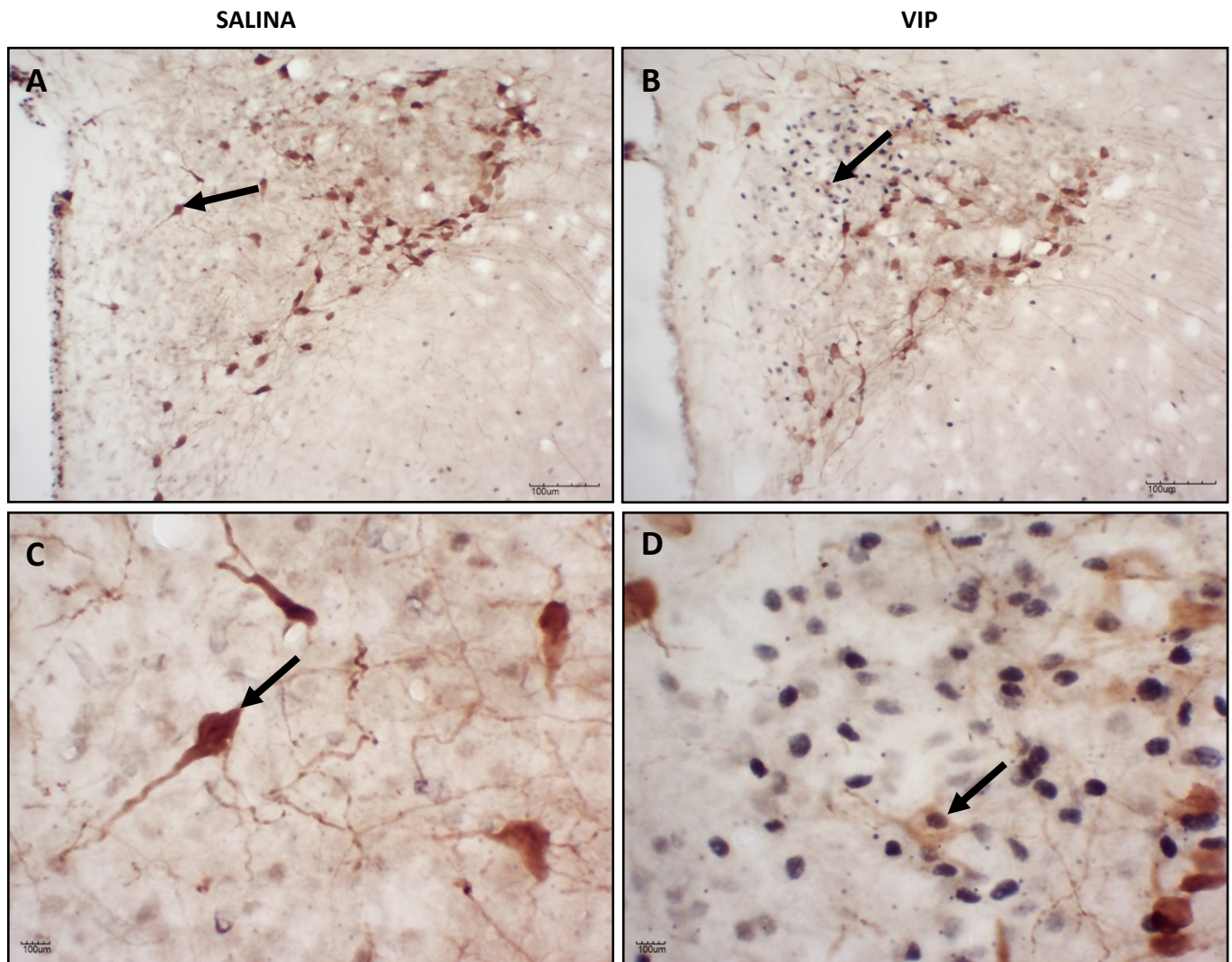


Figura 6. Fotomicrografias representativas (aumento de 10x **A** e **B**) das secções coronais, que mostram a imunoreatividade FRA-OT na subdivisão PaMP do PVN de animais microinjetados com salina (**A** e **C**) ou VIP (**B** e **D**). **C** e **D** representam a área onde a fotomicrografia foi tirada com um aumento de 40x. As setas em **A** e **C** apontam neurônios OT sem dupla marcação com FRA, **B** e **D** apontam uma dupla marcação FRA-OT.

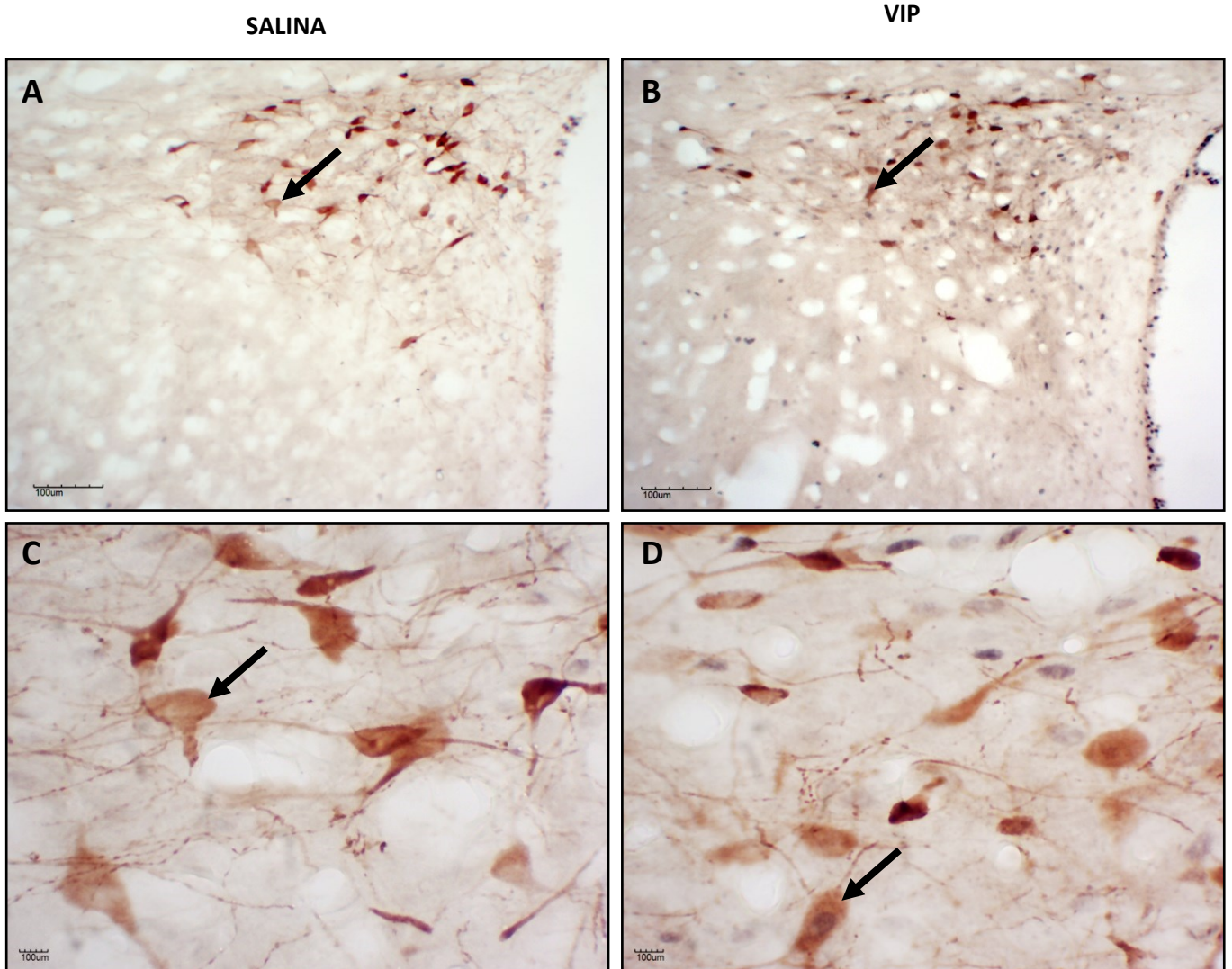


Figura 7. Fotomicrografias representativas (aumento de 10x **A** e **B**) das secções coronais, que mostram a imunoreactividade FRA-OT na subdivisão PaPo do PVN de animais microinjetados com salina (**A** e **C**) ou VIP (**B** e **D**). **C** e **D** representam a área onde a fotomicrografia foi tirada com um aumento de 40x. As setas em **A** e **C** apontam neurônios OT sem dupla marcação com FRA, **B** e **D** apontam uma dupla marcação FRA/OT.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a microinjeção ICV do antagonista de receptor de ocitocina, OVT, seguida da microinjeção de VIP foi realizada para avaliar o efeito da ocitocina nas respostas anorexigênica e metabólicas do VIP e para isso foram analisados parâmetros plasmáticos e de ingestão.

O efeito de hiperglicemia observado após microinjeção ICV de VIP corrobora dados obtidos por Nagai (1994), sendo essa hiperglicemia promovida por VIP uma resposta semelhante à induzida pela injeção (ICV) de 2-deoxy-D-glucose com hiper glucagonemia associada sem elevação na insulina do sangue. O pré-tratamento com OVT promoveu bloqueio parcial do efeito do VIP, isto é, o antagonista de ocitocina atenuou a hiperglicemia promovida pelo VIP. Verifica-se, pela literatura, que infusão de ocitocina pela veia safena promove aumento da glicemia em cães conscientes, sendo essas alterações acompanhadas por aumento rápido da produção de glicose e em seguida um aumento da captação dessa glicose (ALTSZULER e HAMPSHIRE, 1981). Em humanos saudáveis, da mesma forma, administração periférica de ocitocina aumenta a concentração de glicose no sangue (VILA et al., 2009). Neste estudo, a microinjeção de OVT foi capaz de reduzir à hiperglicemia promovida pelo VIP, como pode ser observado na figura 2.

O VIP também aumentou a concentração de corticosterona plasmática (figura 3), corroborando estudos de Alexander e Sander (1994) que mostraram que o VIP induz elevações de corticosterona no plasma de ratos quando microinjetado no PVN. Além disso, Itoh et al. (1982) mostraram que o VIP causa aumento de corticosterona no plasma quando administrado ICV, mas não quando injetado intraperitonealmente, sugerindo que o VIP estimula os neurônios CRH direta ou indiretamente. Estudos como os de Windle et al. (1997) mostram que a ocitocina ICV, diminui a corticosterona no sangue em resposta ao estresse por barulho, e suportando a hipótese de que a ocitocina endógena pode modular as repostas fisiológicas importantes ao estresse. Visto que o VIP é capaz de elevar a corticosterona, a OT teria um papel em reduzi-la e o seu antagonista a capacidade de elevar a corticosterona. Neste trabalho a OVT preveniu a somação de resposta da corticosterona em animais OVT-VIP.

Os ácidos graxos livres plasmáticos apresentaram-se diminuídos após microinjeção de VIP (figura 4) e esse resultado entra em contraste com a literatura.

Araújo (2003) verificou aumento de AGL no sangue de ratos microinjetados com VIP no PVN. Da mesma forma, Richter et al. (1988) observaram que o VIP estimula o aumento da liberação dos AGL pelo tecido adiposo humano *in vitro*. A vasotocina sozinha foi capaz de promover aumento dos ácidos graxos livres, e Mirsky (1963) observou diminuição da concentração de ácidos graxos livres no plasma de cães diabéticos e não diabéticos com injeção intravenosa de ocitocina. Além disso, Vila et al., em 2009, verificaram que a injeção intravenosa de ocitocina, em homens saudáveis, aumentava os ácidos graxos livres plasmáticos e que a ocitocina reduziu os ácidos graxos quando o aumento era produzido por lipopolisacarídeo, mostrando assim o papel da ocitocina como um importante regulador da homeostase energética e da resposta ao estresse. Neste trabalho o VIP reduziu os AGL, causando contraste com a literatura, e o OVT foi capaz de reverter à resposta promovida pelo VIP nos dados apresentados.

A OT e o CRH possuem ações similares no efeito inibitório da ingestão alimentar, e esse efeito causado pelo CRH é completamente bloqueado pelo tratamento ICV com OVT, sugerindo que a OT seja um possível mediador central da anorexia induzida por CRH (OLSON et al., 1991). CCK também é capaz de reduzir a ingestão alimentar em animais de jejum e a OVT reduz significativamente essa ação (BLEVINS et al., 2003). A OVT também é capaz de atenuar os efeitos de redução de ingestão alimentar causados pela leptina (BLEVINS et al., 2004). Dessa forma, a OT parece ser um importante mediador do efeito anorexígeno de diferentes tratamentos.

Neste trabalho houve diminuição da ingestão alimentar nos ratos que receberam VIP (figura 4). Esses dados corroboram estudo de Araújo (2003), que observou diminuição da ingestão de alimentos quando microinfundiu VIP no PVN de ratos, e de Ghourab et al. (2011), que observaram diminuição potente e de curta duração da ingestão de alimentos e aumento da atividade e do gasto de energia após injeção de VIP ICV. Os grupos OVT não diferiram entre si e nem mesmo diferiram do grupo SAL-VIP. Estudos de Arletti et al. (1990) mostram que a ocitocina injetada em ratos ICV inibe a ingestão de alimentos e água e que o pré-tratamento com a OVT previne o efeito da ocitocina nesse comportamento. Olson et al. (1990), também com injeções ICV de ocitocina e um agonista, mostraram o bloqueio da ingestão alimentar com reversão desse bloqueio com pré-tratamento com antagonista, e também não observaram aumento de insulina e glucagon, que

normalmente são reportados em experimentos de administração periférica de OT. No presente trabalho, o VIP reduziu a ingestão alimentar e a microinjeção de OVT, que é capaz de reverter o bloqueio de ingestão promovido pela OT em outros trabalhos, promoveu reversão parcial da hipofagia mediada pelo VIP.

Os dados obtidos nesse trabalho sobre neurônios OT corroboram a literatura. A OT é um peptídeo sintetizado nos neurônios magnocelulares e parvocelulares do PVN (GIMPL, 2001). Dentro das subdivisões do hipotálamo, a região do PaPo é conhecida por participar no controle de atividade simpática e da regulação da ingestão de alimentos (SWANSON e KUYPERS, 1980; SAWCHENKO, 1998) e o PaMP encontra-se em uma região com uma maior expressão de neurônios CRH. A administração ICV de OT ou CRH ativam a expressão de FOS em regiões do tronco encefálico caudal que regulam a ingestão alimentar (BENOIT et al, 2000; OLSON et al., 1993). Análises de c-Fos mostram um aumento significativo de neurônios ativos quando há administração de CCK (i.p.) em regiões do núcleo do trato solitário levando à redução na ingestão alimentar, o tratamento com OVT, reverte esse efeito, e a marcação com c-Fos indica que os axônios de neurônios OT, que descendem do PVN para o NTS são posicionados para interagir com neurônios do NTS que respondem ao sinal periférico de CCK. Estudos de imunistoquímica mostraram que o OVT é capaz de bloquear a habilidade da leptina em potencializar a ativação de c-Fos de CCK no NTS, sugerindo que neurônios que contêm ocitocina são componentes chaves de uma via descendente do PVN parvocelular para o NTS (BLEVINS et al, 2004). FRA (antígenos relacionados à Fos) são proteínas quimicamente semelhantes ao FOS que alteram a transcrição celular, positiva ou negativamente, em resposta aos sinais na superfície celular, e são úteis na avaliação de ativação neuronal (DRAGUNOW, 1990; MORGAN e CURRAN, 1989; SHARP et al., 1991; HOFFMAN et al., 1993). A análise imunistoquímica revela um aumento qualitativo na expressão de FRA no grupo que recebeu microinjeção de VIP. Após a microinjeção de VIP, observaram-se também neurônios duplamente marcados (FRA-OT), evidenciando a ativação de neurônios que expressam OT na região parvocelular do PVN, sugerindo a participação de neurônios OT no controle de ingestão alimentar promovido pelo VIP.

6 CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que:

- O VIP promoveu hiperglicemia e redução da ingestão alimentar e o pré-tratamento com o antagonista do receptor de ocitocina (OVT) diminuiu estes efeitos do VIP.
- O VIP promoveu a elevação plasmática da corticosterona e diminuição plasmática dos ácidos graxos livres quando comparado ao seu controle; e o OVT não alterou essas respostas.
- Houve dupla marcação de neurônios FRA-OT (antígenos relacionados à FOS-Ocitocina) na posição parvocelular do PVN, sugerindo a participação de neurônios ocitocinérgicos no controle da ingestão promovida pelo VIP.

Os resultados obtidos mostram que o tratamento prévio com OVT reverte parcialmente o efeito anorexígeno e algumas alterações metabólicas plasmáticas promovidas pelo VIP. A análise qualitativa da imunistoquímica evidencia participação de neurônios OT, sugerindo que a ocitocina possa ser um regulador do VIP na homeostase energética.

REFERÊNCIAS

ABESO. Quase 60% dos brasileiros estão acima do peso, revela IBGE. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, 2015. Disponível em <<http://www.abeso.org.br/noticia/quase-60-dos-brasileiros-estao-acima-do-peso-revela-pesquisa-do-ibge>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. v. 1. 1352 p. ISBN: 9788527721110.

AKABAYASHI, A.; ZAIA, C. T. B. V.; KÖENIG, J. I.; GABRIEL, S. M.; LEIBOWITZ, S. F. Diurnal rhythm of galanin-like immunoreactivity in the paraventricular and suprachiasmatic nuclei and other hypothalamic areas. **Peptides**, v. 15, n. 8, p. 1437-1444, 1994.

ALEXANDER, L. D.; SANDER, L. D. Vasoactive intestinal peptide stimulates ACTH and corticosterone release after injection into the PVN. **Regulatory Peptides**, v. 51, n. 3, p. 221-227, 1994.

ALTSZULER, N.; HAMPSHIRE, J. Oxytocin infusion increases plasma insulin and glucagon levels and glucose production and uptake in the normal dog. **Diabetes**, v. 30, n. 2, p. 112-114, 1981.

ARAÚJO, B.B. **Efeito do peptídeo intestinal vasoativo no controle do metabolismo periférico e da ingestão alimentar**. [Monografia de Bacharelado em Biomedicina – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR]. Londrina, 46p, 2003.

ARLETTI, R.; BENELLI, A.; BERTOLINI, A. Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. **Peptides**, v. 10, n. 1, p. 89-93, 1989.

ARLETTI, R.; BENELLI, A.; BERTOLINI, A. Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. **Physiology & Behavior**, v. 48, n. 6, p. 825-830, 1990.

ARORA, S. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity. A review. **Neuropeptides**, v. 40, n. 6, p. 375-401, 2006.

BALBI, D.; ALLEN, J. M. Structure and Expression of the Neuropeptide Y Gene. **The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides Contemporary Neuroscience**, p. 43-64, 1993.

BELLINGER, L. L.; BERNARDIS, L. L. Suppression of feeding by cholecystokinin but not bombesin is attenuated in dorsomedial hypothalamic nuclei lesioned rats. **Peptides**, v. 5, n. 3, p. 547-552, 1984.

BENOIT, S. C.; THIELE, T. E.; HEINRICHS, S. C.; RUSHING, P. A.; BLAKE, K. A.; STEELEY, R. J. Comparison of central administration of corticotropin-releasing hormone and urocortin on food intake, conditioned taste aversion, and c-Fos expression. **Peptides**, v. 21, n. 3, p. 345-351, 2000.

BLEVINS, J. E.; EAKIN, T. J.; MURPHY, J. A.; SCHWARTZ, M. W.; BASKIN, D. G. Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. **Brain research**, v. 993, n. 1, p. 30-41, 2003.

BLEVINS, JAMES E.; SCHWARTZ, MICHAEL W.; BASKIN, DENIS G. Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 1, p. 87-96, 2004.

BUIJS, R. M. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. **Cell Tissue Research**, v. 192, p. 423-435, 1978.

BROBECK, J. R.; TEPPERMAN, J.; LONG, C. N. H. Experimental hypothalamic hyperphagia in the albino rat. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 15, n. 6, p. 831-853, 1943.

BROADWELL, R. D.; BRIGHTMAN, M. W. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. **Journal of Comparative Neurology**, v. 166, n. 3, p. 257-283, 1976.

BRUIJNZEEL, A. W.; CORRIE, L. W.; ROGERS, J. A.; YAMADA, H. Effects of insulin and leptin in the ventral tegmental area and arcuate hypothalamic nucleus on food intake and brain reward function in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 219, n. 2, p. 254-264, 2011.

DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; STRACK, A. M., HANSON, E. S.; SEBASTIAN, R. J. The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRH neurons. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 771, p. 730-742, 1995.

DRAGUNOW, M.; ROBERTSON, H. A. Kindling stimulation induces c-fos protein (s) in granule cells of the rat dentate gyrus. **Nature**, v. 329, n. 6138, p. 441-442, 1987.

FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 46, n. 2, p. 105-111, 1973.

GHOUREAB, S.; BEALE, E. K.; SEMJONOUS, N. M.; SIMPSON, K. A.; MARTIN, N. M.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R.; SMITH, K. L. Intracerebroventricular administration of vasoactive intestinal peptide inhibits food intake. **Regulatory Peptides**, v. 172, n. 3, p. 8-15, 2011.

GERHOLD, L. M.; HORVATH, T. L.; FREEMAN, M. E. Vasoactive intestinal peptide fibers innervate neuroendocrine dopaminergic neurons. **Brain Research**, v. 919, p. 48-56, 2001.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function and regulation. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 629-683, 2001.

GUILLEMIN, R.; CLAYTON G. W.; SMITH, J. D.; LIPSCOMB, H. S. Measurement of free corticosteroids in rat plasma: physiological validation of a method. **Endocrinology**, v. 63, n. 3, p. 349-358, 1958.

HETHERINGTON, A. W.; RANSON, S. W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **The Anatomical Record**, v. 78, n. 2, p. 149-172, 1940.

HOFFMAN, GLORIA E.; SMITH, M. SUSAN; VERBALIS, JOSEPH G. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 14, n. 3, p. 173-213, 1993.

IBGE. Índice de homens com sobrepeso quase triplica em 35 anos. 27 de agosto de 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/saude/2013/08/obesidade-atinge-mais-da-metade-da-populacao-brasileira-aponta-estudo>>. Acesso em: 15 maio 2015.

ITOH, S.; HIROTA, R; KATSUURA, G. Effect of cholecystokinin octapeptide and vasoactive intestinal polypeptide on adrenocortical secretion in the rat. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 32, n. 4, p. 553-560, 1982.

LARA-GALVÃO, M. O. **Efeito do peptídeo ativador da adenilciclase hipofisária no controle do metabolismo periférico e da ingestão alimentar**. [Monografia de Bacharelado em Biomedicina – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR], Londrina, 35p, 2003.

LEIBOWITZ, S. F. Hypothalamic paraventricular nucleus: interaction between noradrenergic system and circulating hormones and nutrients in relation to energy balance. **Neuroscience Biobehavioral Review**, v. 12, n. 2, p. 101-109, 1988.

LEIBOWITZ, S. F.; WORTLEY, K. E. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. **Peptides**, v. 25, p. 473-504, 2004.

MAGISTRETTI, P. J.; MORRISON, J. H.; SHOEMAKER, W. J.; SAPIN, V.; BLOOM, F. E. Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices: a possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. **Proceeding of National Academy of Science of USA**, v. 78, n. 10, p. 6535-6539, 1981.

MIRSKY, I. A. Effect of oxytocin, vasopressin, and related peptides on plasma free fatty acids. **American Journal of Physiology**, Legacy Content, v. 204, n. 5, p. 842-846, 1963.

MORGAN, JAMES I.; CURRAN, TOM. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. **Trends in neurosciences**, v. 12, n. 11, p. 459-462, 1989.

MORIN, A. J.; MOYSE, E.; DENOROY, L.; JOUVET, M. VIP binding sites in adult rat hypothalamus: nuclear distribution and daily variations. **Peptides**, v. 15, n. 1, p. 117-123, 1994.

MORTON, G. J.; THATCHER, B. S.; REIDELBERGER, R. D.; OGIMOTO, K.; WOLDEN-HANSON, T.; BASKIN, D. G.; BLEVINS, J. E. Peripheral oxytocin suppresses food intake and causes weight loss in diet-induced obese rats. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 1, p. E134-E144, 2012.

NAGAI, N.; KAJIKAWA, H.; SASAKI, T.; NAGAI, K.; NAKAGAWA, H. Hyperglycemic response to intracranial injection of vasoactive intestinal peptide. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 29-34, 1994.

NUSSDORFER, G.; MALENDOWICZ, L. K. Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Peptides**, v. 19, n. 8, p. 1443-1467, 1998.

OLLER DO NASCIMENTO CURI, C. M.; RIBEIRO, E. B.; ZAIA, C. T. B. V.; DOLNIKOFF, M. S. Glycemic response to stress stimulation by ether exposure in adrenalectomized rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 37, n. 3, p. 399-403, 1990.

OLSON, B. R.; DRUTAROSKY, M. D.; CHOW, M. S.; HRUBY, V. J.; STRICKER, E. M.; VERBALIS, J. G. Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. **Peptides**, v. 12, n. 1, p. 113-118, 1991.

OLSON, B. R.; DRUTAROSKY, M. D.; STRICKER, E. M.; VERBALIS, J. G. Brain oxytocin receptor antagonism blunts the effects of anorexigenic treatments in rats: evidence for central oxytocin inhibition of food intake. **Endocrinology**, v. 129, n. 2, p. 785-791, 1991.

OLSON, B. R.; FREILINO, M.; HOFFMAN, G. E.; STRICKER, E. M.; SVED, A. F.; VERBALIS, J. G. c-Fos expression in rat brain and brainstem nuclei in response to treatments that alter food intake and gastric motility. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 93-106, 1993.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1997.

RICHTER, W. O.; ROBL, H.; SCHWANDT, P. Human glucagon and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) stimulate free fatty acid release from human adipose tissue in vitro. **Peptides**, v. 10, n. 2, p. 333-335, 1989.

SAID, S.I.; MUTT, V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. **Science**, v. 169, p. 1217-1218, 1970.

SAINSBURY, A.; CUSIN, I.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; JEANRENAUD, B. Adrenalectomy prevents the obesity syndrome produced by chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats. **Diabetes**, v. 46, p. 209-214, 1997.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. **Brain Research Reviews**, v. 4, n. 3, p. 275-325, 1982.

SHARP, F. R.; SAGAR, S. M.; HICKS, K., LOWENSTEIN, D.; & HISANAGA, K. c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress. **Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 8, p. 2321-2331, 1991.

SHIMAZU, T.; FUKUDA, A.; BAN, T. Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. **Nature**, v. 210, p. 1178-1179, 1966.

SOFRONIEW, M. V. Projections from vasopressin, oxytocin, and neurophysin neurons to neural targets in the rat and human. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 28, n. 5, p. 475-478, 1980.

STANLEY, B. G.; DANIEL, D. R.; CHIN, A. S.; LEIBOWITZ, S. F. Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. **Peptides**, v. 6, n. 6, p. 1205-1211, 1985.

STANLEY, B. G.; LANTHIER, D.; CHIN, A. S.; LEIBOWITZ, S. F. Suppression of neuropeptide Y-elicited eating by adrenalectomy or hypophysectomy: reversal with corticosterone. **Brain Research**, v. 501, p. 32-36, 1989.

SWANSON, L. W.; KUYPERS, H. G. J. M. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. **Journal of Comparative Neurology**, v. 194, n. 3, p. 555-570, 1980.

TAYLOR, D. P.; PERT, C. B. Vasoactive intestinal polypeptide: specific binding to rat brain membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 76, n. 2, p. 660-664, 1979.

UCHÔA, E. T.; SILVA, L. E. C. M.; CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. Hypothalamic oxytocin neurons modulate hypophagic effect induced by adrenalectomy. **Hormones and Behavior**, v. 56, p. 532-538, 2009.

UCHÔA, E. T.; ZAHM, D. S.; DE CARVALHO BORGES, B.; RORATO, R.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. Oxytocin projections to the nucleus of the solitary tract contribute to the increased meal-related satiety responses in primary adrenal insufficiency. **Experimental Physiology**, v. 98, n. 10, p. 1495-1504, 2013.

USDIN, T. B.; BONNER, T. I.; MEZEY, E. Two receptors for vasoactive polypeptide with similar specificity and complementary distributions. **Endocrinology**, v. 135, n. 6, p. 2662-2680, 1994.

VILA, G.; RIEDL, M.; RESL, M.; VAN DER LELY, A. J.; HOFLAND, L. J.; CLODI, M.; LUGER, A. Systemic administration of oxytocin reduces basal and lipopolysaccharide-induced ghrelin levels in healthy men. **Journal of Endocrinology**, v. 203, n. 1, p. 175-179, 2009.

WELKENHUYSEN, M.; VAN KUYCK, K.; DAS, J.; SCIOT, R.; NUTTIN, B. Electrical stimulation in the lateral hypothalamus in rats in the activity-based anorexia model. **Neurosurgical Focus**, v. 25, n. 1, E7, p. 1-9, 2008.

WILLIAMS, G.; BING, C.; CAI, X. J.; HARROLD, J. A.; KING, P. J.; LIU, X. H. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 4, p. 683-701, 2001.

WINDLE, R. J.; SHANKS, N.; LIGHTMAN, S. L.; INGRAM, C. D. Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. **Endocrinology**, v. 138, n. 7, p. 2829-2834, 1997.

WOODS, S. C.; SEELEY, R. J.; PORTE JR, D.; SCHWARTZ, M. W. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. **Science**, v. 280, n. 5368, p. 1378-1383, 1998.

ZAIA, C. T. B. V.; OLLER do NASCIMENTO, C. M.; TIMO-IARIA, C.; DOLNIKOFF, M. S. Time course of insulin, corticosterone and metabolic changes caused by lesion of the ventromedial hypothalamus in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 39, n.6, p. 707-714, 1987.

ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M.; DELATTRE, E.; DOLNIKOFF, M. S.; TIMO-IARIA, C. Effect of chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamic nucleus on blood plasma glucose, triglycerides and free fatty acids in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 195-198, 1997.