



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA CAROLINA SEIDEL BATISTA

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DA MICROINFUSÃO DO
PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO NO NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO DE RATOS SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS E HORMONAIS**

ANA CAROLINA SEIDEL BATISTA

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DA MICROINFUSÃO DO PEPTÍDEO
INTESTINAL VASOATIVO NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO
HIPOTÁLAMO DE RATOS SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E
HORMONAIS**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B333a Batista, Ana Carolina Seidel.

Avaliação temporal da microinfusão do peptídeo intestinal vasoativo no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos sobre parâmetros metabólicos e hormonais / Ana Carolina Seidel Batista. – Londrina, 2012.
48 f. : il.

Orientador: Cássia Thais Bussamra Vieira Zaia.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2012.

Inclui bibliografia.

1. VIP – Teses. 2. PVN – Teses. 3. Neurovegetativo simpático – Teses. I. Zaia, Cassia Thais Bussamra. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612.8

ANA CAROLINA SEIDEL BATISTA

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DA MICROINFUSÃO DO PEPTÍDEO
INTESTINAL VASOATIVO NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO
HIPOTÁLAMO DE RATOS SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E
HORMONAIS**

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

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia
UEL – Londrina - PR

Profª Drª Helenir Medri de Souza
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Fábio Bessa Lima
USP – São Paulo - SP

Londrina, 24 de fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de forma muito especial à minha orientadora, a prof^a Dr^a Cássia Thaïs Bussamra Vieira Zaia por acreditar em mim e abrir as portas do laboratório para que eu fizesse parte da equipe do LaFiNeM; pela paciência para ensinar e orientar; pelo carinho e compreensão presentes a todo o momento ao longo deste período.

Aos colegas de laboratório, pessoas que são muito importantes e pelas quais tenho grande carinho: o Ângelo, a Karina e o Leonardo, que estiveram presentes rotineiramente no laboratório no primeiro ano de mestrado, e foram fundamentais para o meu aprendizado inicial, com relação às técnicas e procedimentos do laboratório; o Aryel, pelas dosagens de corticosterona; a Thamile, o Renato, o Pedro e a Karina pela amizade e prestatividade. Agradeço à Marcela, que além de me acompanhar e auxiliar em cada etapa do desenvolvimento deste trabalho, também se fez presente em momentos além da rotina de laboratório, demonstrando grande consideração e amizade.

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas por terem participado da minha trajetória na construção do conhecimento em fisiologia.

À Profa. Dra. Cláudia Bueno do Reis Martine por oferecer toda a infraestrutura de seu laboratório (LEFA) e à mestranda Luciana por ter auxiliado durante as dosagens de insulina e leptina.

Ao professor Dimas Augusto Morozin Zaia, pelo auxílio nas fatigantes dosagens de ácidos gráxos livres.

Agradeço de todo o coração aos meus pais, Ione e Olávio, que são meus alicerces, grandes exemplos em minha vida. Sempre foram compreensivos, me apoiaram e deram forças para seguir em frente.

Ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, pela oportunidade de expandir as fronteiras do conhecimento, permitindo a integração com outras universidades.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho
original.”

Albert Einstein

BATISTA, Ana Carolina Seidel. **Avaliação temporal da microinfusão do peptídeo intestinal vasoativo no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos sobre parâmetros metabólicos e hormonais.** 2012. 48f. Dissertação de mestrado (PMPGCF) – Universidade Estadual de Londrina – 2012.

RESUMO

O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) desempenha papel de integração dos sinais nutricionais atuando sobre o metabolismo periférico. O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) está presente nesse núcleo e participa das vias metabólicas ativando respostas simpáticas. O presente trabalho avaliou, em diferentes tempos, as alterações resultantes da ação do VIP microinfundido no PVN de ratos acordados, em jejum de 24 horas, sobre a concentração plasmática de glicose, colesterol, ácidos graxos livres, corticosterona, leptina e insulina. Os animais foram submetidos à implantação estereotáxica de cânula-guia no PVN por onde receberam microinfusão (5 μ l/10 min) de VIP (40 ng/g de peso corpóreo) ou salina (0,9%), no período matutino, entre 8 e 12h. Após 10, 30 ou 90 minutos da microinfusão de VIP ou salina foram eutanasiados. Os grupos experimentais compreendem: animais que receberam VIP (grupos VIP10, VIP30 e VIP90), ou salina (grupos SAL10, SAL30, SAL90), organizados de acordo com o tempo transcorrido desde o término das microinfusões até o momento da decapitação. Na comparação com os controles salina, nota-se aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração plasmática de glicose (VIP10: $149,72 \pm 4,49$ mg/dL, $n=11$; SAL10: $107,79 \pm 2,38$ mg/dL, $n=12$), AGL (VIP10: $101,48 \pm 7,67$ μ moles/dL, $n=11$; SAL10: $82,96 \pm 4,49$ μ moles/dL, $n=11$) e corticosterona (VIP10: $12,78 \pm 0,62$ μ g/dL, $n=9$; SAL10: $8,42 \pm 0,83$ μ g/dL, $n=12$) após 10 minutos da microinfusão de VIP; constatou-se retorno aos valores basais após 30 minutos para glicose (VIP30: $100,23 \pm 2,31$ mg/dL, $n=8$; SAL30: $95,90 \pm 3,12$ mg/dL, $n=7$), AGL (VIP30: $78,29 \pm 4,83$ μ moles/dL; SAL30: $64,88 \pm 2,61$ μ moles/dL, $n=7$) e corticosterona (VIP30: $5,48 \pm 1,04$ μ g/dL, $n=8$; SAL30: $5,98 \pm 0,83$, $n=7$) e 90 minutos para glicose (VIP90: $102,69 \pm 2,4$ mg/dL, $n=9$; SAL90: $95,90 \pm 3,12$ mg/dL, $n=5$), AGL (VIP90: $79,85 \pm 4,34$ μ moles/dL, $n=9$; SAL90: $67,60 \pm 4,32$ μ moles/dL, $n=5$) e corticosterona (VIP90: $5,76 \pm 1,2$ μ g/dL, $n=9$; SAL90: $7,1 \pm 0,56$ μ g/dL, $n=5$). A insulina apresenta uma tendência de aumento no grupo VIP10 ($1,15 \pm 0,26$ ng/mL, $n=5$; SAL10: $0,7 \pm 0,11$ ng/mL, $n=5$). Tanto o colesterol como a insulina e a leptina não demonstraram alterações resultantes da microinfusão do VIP. Com estes resultados concluímos que o VIP promove aumento da glicose, AGL e corticosterona plasmáticos a curto prazo (10 minutos). Sugerimos que haja uma provável ativação simpática pelo peptídeo promovendo lipólise (aumentando os AGL) e alterações hormonais que favorecem o aumento da glicemia. O retorno destas variáveis aos valores basais ocorre por uma provável resposta contra-regulatória para homeostase energética.

Palavras-chave: VIP. PVN. Neurovegetativo simpático.

BATISTA, Ana Carolina Seidel. **Temporal evaluation of vasoactive intestinal peptide microinfusion in the hypothalamus paraventricular nucleus of rats on metabolic and hormonal parameters.** 2012. 50p. Master thesis (PMPGCF) - (PMPGCF) – Universidade Estadual de Londrina – 2012.

ABSTRACT

The hypothalamus paraventricular nucleus plays a role of integration of nutritional signals acting on the peripheral metabolism. The vasoactive intestinal peptide (VIP) is present in this nucleus and participates in metabolic pathways by activating sympathetic responses. The present study evaluated at different times alterations resulting from the action of VIP microinfusion into the PVN of awake rats fasted for 24 hours on plasma glucose, cholesterol, free fatty acids (FFA), corticosterone, leptin and insulin at different times. The animals underwent stereotaxic implantation of guide cannula in the PVN where they received microinfusion (5 μ l/10 min) of VIP (40 ng/g BW) or saline (0.9%), at morning, between 8:00 and 12:00 a.m. After 10, 30, 90 minutes of the microinfusion of VIP or saline they were euthanized. The experimental groups comprises animals that received VIP (VIP10, VIP30 e VIP90 groups) or saline (SAL10, SAL30 e SAL90 groups) organized according to the time elapsed since the end of microinfusions until the moment of decapitation. Compared to saline controls, there was a significant increase ($p < 0,05$) in the plasma glucose concentration (VIP10: $149,72 \pm 4,49$ mg/dL, $n=11$; SAL10: $107,79 \pm 2,38$ mg/dL, $n=12$), FFA (VIP10: $101,48 \pm 7,67$ μ moles/dL, $n=11$; SAL10: $82,96 \pm 4,49$ μ moles/dL, $n=11$) and corticosterone (VIP10: $12,78 \pm 0,62$ μ g/dL, $n=9$; SAL10: $8,42 \pm 0,83$ μ g/dL, $n=12$) after 10 minutes of the microinfusion of VIP; there is a return to baseline levels after 30 minutes for glucose (VIP30: $100,23 \pm 2,31$ mg/dL, $n=8$; SAL30: $95,90 \pm 3,12$ mg/dL, $n=7$), FFA (VIP30: $78,29 \pm 4,83$ μ moles/dL; SAL30: $64,88 \pm 2,61$ μ moles/dL, $n=7$) and corticosterone (VIP30: $5,48 \pm 1,04$ μ g/dL, $n=8$; SAL30: $5,98 \pm 0,83$, $n=7$) and 90 minutes for glucose (VIP90: $102,69 \pm 2,4$ mg/dL, $n=9$; SAL90: $95,90 \pm 3,12$ mg/dL, $n=5$), FFA (VIP90: $79,85 \pm 4,34$ μ moles/dL, $n=9$; SAL90: $67,60 \pm 4,32$ μ moles/dL, $n=5$) and corticosterone (VIP90: $5,76 \pm 1,2$ μ g/dL, $n=9$; SAL90: $7,1 \pm 0,56$ μ g/dL, $n=5$). Insulin had a tendency to increase in the group VIP10 ($1,15 \pm 0,26$ ng/mL, $n=5$; SAL10: $0,7 \pm 0,11$ ng/mL, $n=5$). Cholesterol, insulin and leptin did not present any changes resulting from the microinfusion of VIP. With these results we conclude that VIP promotes an enhancement on plasmatic glucose and FFA at short time (10 minnutes). We suggest there is probably a sympathetic activation caused by the peptide promoting lipolysis (increased FFA) and hormonal changes that favor the increase of glycemia. The return of these variables to the baseline values occurs due a possible counter-regulatory response to energy homeostasis.

Keywords: VIP. PVN. Sympathetic neurovegetative.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Núcleos hipotalâmicos relevantes no controle da ingestão de alimentos e exemplos de vias neuronais..... 13
- Figura 2** - Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão de salina (grupos SAL10, n=12; SAL30, n=7; e SAL90, n=5) ou VIP (grupos VIP10, n=11; VIP30, n=8; e VIP90, n=9). Valores expressos como média \pm e.p.m..... 30
- Figura 3** - Concentrações plasmáticas de colesterol (mg/dL) 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão de salina (grupos SAL10, n=12; SAL30, n=7; e SAL90, n=5) ou VIP (grupos VIP10, n=11; VIP30, n=8; e VIP90, n=9). Valores expressos como média \pm e.p.m..... 30
- Figura 4** - Concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (AGL; μ moles/dL) 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão de salina (grupos SAL10, n=11; SAL30, n=7; e SAL90, n=5) VIP (grupos VIP10, n=11; VIP30, n=8; e VIP90, n=9). Valores expressos como média \pm e.p.m. #Diferente dos grupos C-JJ, SAL10, SAL30, SAL90, VIP10, VIP30 e VIP90 ($p < 0,05$)..... 31
- Figura 5** - Concentrações plasmáticas de corticosterona (μ g/dL) 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão de salina (grupos SAL10, n=12; SAL30, n=7; e SAL90, n=5) ou VIP (grupos VIP10, n=9; VIP30, n=8; e VIP90, n=9). Valores expressos como média \pm e.p.m..... 31
- Figura 6** - Concentrações plasmáticas de insulina (ng/mL) 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão de salina (grupos SAL10, n=5; SAL30, n=5; e SAL90, n=5) ou VIP (grupos VIP10, n=5; VIP30, n=5; e VIP90, n=5). Valores expressos como média \pm e.p.m..... 32

Figura 7 - Concentrações plasmáticas de leptina (pg/mL) 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão de salina (grupos SAL10, n=6; SAL30, n=5; e SAL90, n=4) ou VIP (grupos VIP10, n=9; VIP30, n=8; e VIP90, n=8). Valores expressos como média \pm e.p.m.....33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AGL	Ácido(s) Gráxo(s) Livre(s)
AgRP	Proteína relacionada ao gene agouti
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
BHE	Barreira hematoencefálica
CART	Transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina
CEEA	Comite de ética na experimentação animal
CIF	Ciências Fisiológicas
CRH	Hormônio corticotrófico
DMH	Núcleo dorso medial do hipotálamo
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HPT	Hipotálamo-pituitária-tireóide
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
ICV	Intracerebroventricular
i.p	intra peritoneal
LaFiNeM	Laboratório de fisiologia endócrina e metabolismo
LH	Núcleo hipotalâmico lateral
MCH	Hormônio de concentração de melanina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário
PACAP	Peptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária
POMC	Pró-opiomelanocortina
PRL	Prolactina
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SNC	Sistema nervoso central
TMB	Tetrametil benzeno
TRH	Hormônio tireotrófico
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
VMH	Núcleo ventromedial do hipotálamo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	O CONTROLE DA INGESTÃO DE ALIMENTOS	12
1.2	NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA INGESTÃO DE ALIMENTOS E BALANÇO ENERGÉTICO	13
1.3	ALGUNS PEPTÍDEOS E HORMÔNIOS ENVOLVIDOS NA SINALIZAÇÃO DA INGESTÃO DE ALIMENTOS	15
1.4	O PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO E SUA FUNÇÃO ANOREXIGÊNICA NO HIPOTÁLAMO.....	17
1.5	INTERCONEXÕES DE PARTE DA SINALIZAÇÃO HIPOTALÂMICA PARA A INGESTÃO DE ALIMENTOS: VIP, SISTEMA DE MELANOCORTINAS, LEPTINA E EIXO HPA	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	METODOLOGIA	22
3.1	ANIMAIS.....	22
3.2	DROGA UTILIZADA	22
3.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	22
3.4	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	23
3.5	MICROINFUSÃO	24
3.6	EUTANÁSIA	24
3.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	24
3.8	DOSAGENS PLASMÁTICAS	25
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4	RESULTADOS	29
5	DISCUSSÃO	34
	CONCLUSÃO	39

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	46
ANEXO A - Tabela 1. Valores médios plasmáticos de glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL) e ácidos graxos livres (AGL; μ moles/dL) de animais em jejum de 24 horas, acordados, submetidos à microinfusão de peptídeo intestinal vasoativo (VIP: 40 ng/g de peso corpóreo) ou salina (0,9%) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), após 10, 30 ou 90 minutos da microinfusão.....	47
ANEXO B - Tabela 2:Valores médios plasmáticos de corticosterona (μ g/dL), leptina (pg/mL) e insulina (ng/mL) de animais em jejum de 24 horas, acordados, submetidos à microinfusão de peptídeo intestinal vasoativo (VIP: 40 ng/g de peso corpóreo) ou salina (0,9%) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), após 10, 30 ou 90 minutos da microinfusão.....	48

1 INTRODUÇÃO

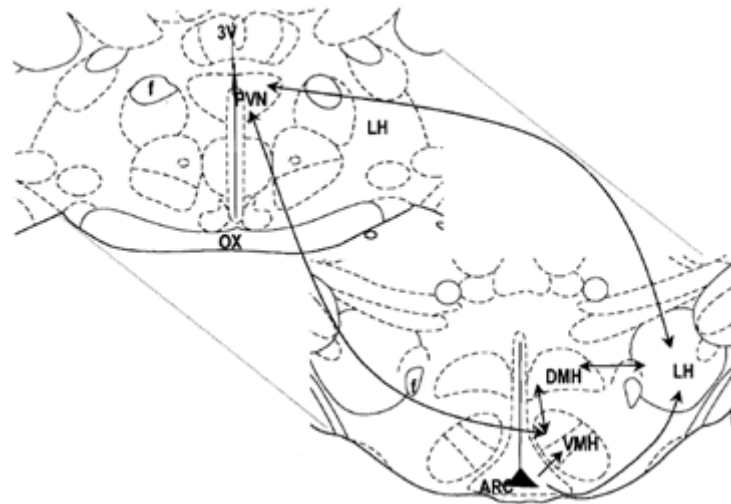
1.1 O CONTROLE DA INGESTÃO DE ALIMENTOS

Apetite, balanço energético e ganho de peso corpóreo são temas que contam com um crescente interesse no que se refere à elucidação dos mecanismos envolvidos no controle destas variáveis. Tal interesse se justifica pelo grande aumento na incidência de transtornos alimentares, como a obesidade, a anorexia e a bulimia nervosa, entre os quais, as características comuns convergem na ingestão de alimentos e balanço energético alterados. Em especial a obesidade representa um importante problema de saúde pública, devido às complicações que advém desta condição, como o desenvolvimento de diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares. Sendo assim, estes assuntos movimentam pesquisas em todo o mundo. É essencial entender como ocorre naturalmente o controle destes aspectos para investigar as causas e mecanismos envolvidos nas disfunções relacionadas, como aquelas supracitadas. Existem informações demonstrando ou sugerindo como ocorre a modulação fisiológica destes fatores, porém, os mecanismos são complexos e envolvem uma gama imensa de interconexões entre os sistemas gerando demasiados questionamentos que guiam o desenvolvimento de mais estudos na busca da melhor compreensão a cerca da circuitaria que rege a ingestão de alimentos e o balanço energético.

Sabe-se que este controle compreende a integração de sinais (hormonais, nutricionais, etc.) provenientes da periferia do organismo com sinais elaborados no sistema nervoso central (SNC). O hipotálamo é o local que coordena e integra estes sinais para então elaborar respostas neuroquímicas e neuroendócrinas apropriadas. Alguns núcleos hipotalâmicos apresentam destaque com relação ao controle da ingestão de alimentos e balanço energético. São eles: o núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), os núcleos ventromedial (VMH) e dorsomedial do hipotálamo (DMH) e o núcleo hipotalâmico lateral (LH) (SIMPSON, MARTIN e BLOOM, 2009). Estes, além de suas projeções e conexões hipotalâmicas intrínsecas, também expandem projeções que alcançam outras regiões encefálicas, como o tronco encefálico, onde o núcleo do trato solitário (NTS) tem papel crucial em direcionar tais sinais

hipotalâmicos para o sistema neurovegetativo, por meio de ativação ou inibição de vias neuronais descendentes.

Figura 1 - Núcleos hipotalâmicos relevantes no controle da ingestão de alimentos e exemplos de vias neuronais.



ARC: núcleo arqueado do hipotálamo. DMH: dorsomedial do hipotálamo. f: fórnix. LH: núcleo hipotalâmico lateral. PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo. OX: chiasma óptico. VMH: núcleos ventromedial. 3V: terceiro ventrículo. As setas indicam as interconexões entre os núcleos

Fonte: WILLIANS et al., 2001.

1.2 NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA INGESTÃO DE ALIMENTOS E BALANÇO ENERGÉTICO

O ARC tem papel fundamental na recepção dos sinais hormonais periféricos, pois está localizado numa região hipotalâmica privilegiada pela proximidade com a eminência média e na qual a barreira hematoencefálica (BHE) é modificada (BROADWELL e BRIGHTMAN, 1976) facilitando o contato de moléculas de peso molecular maior, por exemplo, os hormônios leptina e insulina¹, com receptores específicos no hipotálamo (RIBEIRO, 2009; BRUIJNZEIL et al., 2011).

É importante salientar que no ARC existem diferentes populações neuronais que expressam neuropeptídeos especialmente importantes na sinalização hipotalâmica de fome, como o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao

¹ Leptina e insulina são hormônios periféricos que atuam como sinais de adiposidade e saciedade informando o SNC via ARC o estado nutricional do organismo.

gene agouti (AgRP), e outros relacionados com a saciedade, como o transcrito relacionado a cocaína e a anfetamina (CART) e a pró-opiomelanocortina (POMC) (SIMPSON, MARTIN e BLOOM, 2009). Além disso, este núcleo possui receptores para a leptina e para a insulina (ARORA, 2006; BRUIJNZEIL et al., 2011) e projeções axonais que se estendem para o PVN, VMH, DMH e LH (BOURET, DRAPER e SIMERLY, 2004; WILLIANS et al., 2001).

Por sua vez, o PVN conta com um papel de destaque devido à convergência de sinais direcionados para ele, provenientes de outros núcleos (WILLIANS et al., 2001). Os sinais que chegam até o PVN podem, inclusive, modular a secreção neuroendócrina relacionada aos eixos hipotálamo-hipófise-tireóide (HPT) e hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), já que ele denota o local de produção e secreção do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e liberador de corticotrofina (CRH), respectivamente, controles primários dos eixos neuroendócrinos hipotalâmico-hipofisários citados. Estes hormônios são fortemente influenciados pelo estado nutricional e, portanto, pelos neuropeptídeos que sinalizam os estados de fome ou saciedade (NEARY, GOLDSTONE e BLOOM, 2004).

Outros núcleos hipotalâmicos que se destacam são o VMH e o LH. O VMH foi denominado o “centro da saciedade” por estudos antigos nos quais a estimulação do núcleo resultava em saciedade, enquanto a sua destruição por lesão bilateral resultava em hiperfagia e obesidade (HETHERINGTON e RANSON, 1940); o VMH é sítio de ligação do hormônio leptina secretado pelo tecido adiposo), importante sinalizador de saciedade (SATOH et al., 1997; ARORA, 2006). O LH, que uma vez estimulado promove aumento da ingestão de alimentos e sua destruição bilateral gera anorexia, foi denominado “centro da fome” (BROBECK, TEPPERMAN e LONG, 1943; LEIBOWITZ e WORTLEY, 2004; WELKENHUYSEN et al., 2008). Esse núcleo possui neurônios com glicorreceptores estimulados pela hipoglicemia, crucial para causar a hiperfagia decorrente deste estado (BERNARDIS e BELLINGER, 1996; LIU et al., 2001). O LH recebe projeções do ARC e produz neuropeptídeos orexigênicos (ex: orexinas e hormônio estimulador dos melanócitos - MCH) (BROBERGER, SUTCLIFFE e HOKFELT, 1998).

O DMH, assim como o VMH, tem papel de destaque no controle da saciedade, e projeta muitas conexões para o hipotálamo lateral, medial e tronco encefálico (WILLIANS et al., 2001), integrando e processando informações (ELMQUIST et al., 1998). O DMH possui receptores para leptina e insulina

(WILLIAMS et al, 2001); sua destruição bilateral também resulta em hiperfagia e obesidade (BERNARDIS e BELLINGER, 1984).

1.3 ALGUNS PEPTÍDEOS E HORMÔNIOS ENVOLVIDOS NA SINALIZAÇÃO DA INGESTÃO DE ALIMENTOS

O estímulo para a ingestão de alimentos depende não somente da hipoglicemia, mas também de outros sinais. O hormônio leptina, por exemplo, é secretado pelo tecido adiposo de maneira proporcional à massa adiposa (RÖNNEMAA et al., 1997). Por processo saturável (BOURET, DRAPER e SIMERLY, 2004; ZLOKOVIC et al., 2000), a leptina atravessa a BHE, porém a fome é capaz de reduzir este transporte e a ingestão aumenta, indicando modulação do transporte de leptina através da BHE pela ingestão (BANKS, 2006). Sendo assim, o balanço energético positivo resulta em maior liberação da leptina, enquanto o balanço energético negativo condiz com uma menor liberação deste hormônio. Desta maneira, valores baixos de leptina circulante refletem menor ligação aos receptores específicos no hipotálamo, sinalizando que os estoques energéticos estão baixos e, assim, culminando em ativação hipotalâmica dos comportamentos relacionados à fome (JANG et al., 2000). Defeito na sinalização pela leptina, tanto por deficiência da mesma (camundongos *ob/ob*, *knockout*² para o gene da leptina), quanto pela resistência à sua ação (camundongos *db/db*, *knockout* para o gene do receptor de leptina) resultam em hiperinsulinemia, hiperglicemia (DUBUC, 1976) e superexpressão de NPY (peptídeo orexigênico) no hipotálamo. Aliás, em camundongos *ob/ob*, a administração sistêmica de leptina é capaz de inibir a resultante superexpressão do gene do NPY por meio de ação específica no ARC, além de apresentar ação hipoglicemiante, em parte, independente da perda de peso causada pela sinalização de saciedade oferecida pela administração do hormônio (SCHWARTZ et al., 1996).

Admite-se que, além da massa adiposa, outros fatores podem influenciar a secreção da leptina como, por exemplo, as concentrações de glicocorticóides (PAPASPYROU-RAO et al., 1997).

² *Knockout*: técnica da engenharia genética que permite bloquear a expressão de um gene específico.

Com relação aos glicocorticóides, sabe-se que o aumento de sua concentração no plasma tem o potencial de estimular, no ARC, a produção e liberação de AgRP e NPY, ambos peptídeos orexigênicos que atuam no PVN. Além de estimular a fome, também alteram o metabolismo, reduzindo o gasto energético em condições de balanço energético negativo (GHAMARI-LANGROUDI, SRISAIB e CONEA, 2011). Muitas dessas alterações metabólicas são mediadas pela ativação de vias neuronais descendentes parassimpáticas nos tecidos periféricos, assim como simultânea redução da atividade simpática (DEVASKAR, 2001).

O papel do NPY como peptídeo orexigênico é ilustrado em experimentos tais como o de Stanley e col. (1985), no qual a microinjeção do peptídeo no PVN de ratos provoca comportamento alimentar de maneira dose-dependente, ocorrendo com uma pequena latência em animais saciados. Sua ação demonstra um efeito pronunciado com relação à fome por carboidratos (WANG et al., 1998). Entretanto, foi observado que a adrenalectomia previne o efeito do NPY sobre a ingestão e que a reposição de glicocorticóides repõe o efeito (STANLEY et al., 1989).

É interessante ressaltar que a injeção central de NPY na área do PVN promove aumento da concentração plasmática de corticosterona (WAHLESTEDT, 1987) e insulina (WALKER e ROMSOS, 1993) em camundongos, além de aumentar a atividade da lipase de lipoproteína no tecido adiposo branco resultando em maior estocagem de energia na forma de gordura (BILLINGTON et al., 1991).

Vale salientar que enquanto os glicocorticóides causam aumento de NPY, o qual aumenta a ingestão, o CRH, de maneira inversa, atua no hipotálamo como neuropeptídeo anorexigênico. Tal informação vai ao encontro dos resultados do estudo de Jang et al. (2000), demonstrando que a administração de leptina em camundongos inibe a secreção do NPY e estimula a secreção do CRH.

Sabe-se ainda, que o NPY administrado por via intracerebroventricular (ICV), aumenta a produção do óxido nítrico (NO) no hipotálamo em 147%. Mas quando a administração ICV é de leptina, ocorre aumento de CRH e redução do NO hipotalâmico, além da diminuição da ingestão e do peso corpóreo (MORLEY et al., 1999). Dados de nosso laboratório reforçam o papel do óxido nítrico (NO) envolvido no controle da ingestão de alimentos (TORRES DOS SANTOS, 2011).

O CRH e o TRH são neurohormônios produzidos no PVN e possuem uma função clássica de regulação dos eixos HPA e HPT, respectivamente. Porém, eles também atuam como neuropeptídeos anorexigênicos na circuitaria hipotalâmica de sinalização da ingestão de alimentos (UEHARA et al., 1998; CHOI et al., 2002).

Outro sinal importante para a saciedade é a insulina. Por se tratar de um hormônio anabólico, é secretada em situações em que os substratos para o anabolismo estão em maior quantidade na circulação. Sua secreção depende de estímulos resultantes ou de aumento de glicose/aminoácidos na circulação sanguínea (NGUYEN et al., 1994), ou um estímulo dado pelo sistema neurovegetativo parassimpático diretamente sobre as células beta do pâncreas. Sendo assim, após uma refeição, a concentração de insulina aumenta, principalmente pelo aumento de nutrientes na circulação. No SNC, existem transportadores de membrana que permitem a passagem da insulina pela BHE e, assim, ela pode se ligar a receptores específicos, cooperando com a informação sobre o estado nutricional do indivíduo naquele momento (BRUIJNZEIL et al., 2011). É constatado que a administração central de insulina em ratos suprime a ingestão de alimentos (MCGOWAN, ANDREWS e GROSSMAN, 1992; WOODS et al., 1979).

1.4 O PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO E SUA FUNÇÃO ANOREXIGÊNICA NO HIPOTÁLAMO

Além dos peptídeos e hormônios já mencionados, outro neuropeptídeo tem grande relevância no controle hipotalâmico de fome e saciedade: o peptídeo intestinal vasoativo (VIP).

O VIP é um peptídeo de 28 aminoácidos que foi descoberto no duodeno de porcos (SAID e MUTT, 1970). Está presente em diversos tecidos, incluindo o hipotálamo (SAMSON, SAID e MACCAIN, 1979), onde apresenta um importante papel no controle da ingestão de alimentos, uma vez que atua inibindo a fome, conforme demonstrado em experimentos com alguns vertebrados, como roedores (GHOUBAB et al., 2011), galinhas (TACHIBANA et al., 2003) e peixes (MATSUDA et al., 2005).

O VIP está distribuído de forma abundante no SNC onde atua na transmissão sináptica e excitabilidade neuronal. É comumente expresso em interneurônios GABAérgicos que podem usar este peptídeo para a comunicação

com alvos pós-sinápticos (ITRI e COWELL, 2003). Apresenta pronunciada atuação como liberador de prolactina (PRL) (SHIMATSU et al., 1984).

O VIP e o peptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária (PACAP) são membros da mesma superfamília de polipeptídeos (subfamília glucagon-secretina). Estruturalmente e funcionalmente são similares (MATSUDA et al., 2005). Atuam por meio de receptores PACAP-VIP, sendo que os receptores VPAC1 e VPAC2 têm alta afinidade para PACAP e VIP, enquanto o PAC1 tem maior afinidade para o PACAP e baixa para o VIP (ABAD et al., 2006).

O VIP está localizado em núcleos envolvidos com a ingestão de alimentos e a homeostase energética, incluindo o PVN (ROSTÉNE et al., 1982). Verifica-se que o estado nutricional do indivíduo afeta a quantidade de VIP no hipotálamo (GHOUBAB et al., 2011) e que tanto PACAP como VIP ativam os receptores VPAC e inibem a fome (KALSBECK et al., 2010).

O VIP hipotalâmico tem papel importante no controle da produção de glicose hepática. Camundongos com defeito na sinalização do VIP apresentam alterações na glicemia (redução) e no ritmo diário de metabolismo e comportamento alimentar (KALSBECK et al., 2010).

Foi observado que a hiperglicemia induzida pelo PACAP pode ser bloqueada por desnervação simpática do fígado. O PACAP inibe a ingestão e aumenta a atividade simpática enquanto diminui a parassimpática. Em galinhas a administração ICV de VIP ou PACAP, além de diminuir a ingestão, aumentam a concentração de ácidos graxos livres (AGL) no plasma com tendência de redução de triglicerídeos, sugerindo lipólise (KALSBECK et al., 2010). Mounien e col. (2009) demonstraram em camundongos que o PACAP ICV aumenta a glicemia e inibe o comportamento alimentar por meio da ativação do sistema de melanocortinas.

A administração de VIP no PVN estimula a secreção de CRH, sendo capaz de aumentar o ACTH e a corticosterona no plasma de maneira dose dependente, com o efeito máximo aos 15 minutos após a administração (ALEXANDER e SANDER, 1994). De acordo com Tachibana (2004), o CRH parece mediar, em galinhas, o efeito do VIP e do PACAP em inibir a fome por administração intraperitoneal (IP) ou ICV. Receptores para VIP estão presentes em neurônios CRH no PVN.

1.5 INTERCONEXÕES DE PARTE DA SINALIZAÇÃO HIPOTALÂMICA PARA A INGESTÃO DE ALIMENTOS: VIP, SISTEMA DE MELANOCORTINAS, LEPTINA E EIXO HPA

No hipotálamo o VIP aumenta a concentração do hormônio estimulador dos α -melanócitos (α -MSH). Este neuropeptídeo é conhecido por inibir o consumo de alimentos e estimular o catabolismo via ativação do receptor MC4-R (CONE, 2006). No ARC grande parte dos neurônios POMC (molécula precursora do α -MSH) expressam receptores PAC1 e VPAC2 (MATSUDA, 2007).

A administração de um inibidor de receptor MC3R e MC4R antes da administração de VIP ICV mostra que ele inibe parcialmente a inibição da ingestão produzida pelo VIP, sugerindo que o efeito anorexigênico do VIP é parcialmente mediado pelo sistema de melanocortinas (GHOUBAB et al., 2011). Foi constatado que camundongos *knockout* para MC4-R apresentam hiperfagia e obesidade, demonstrando a importância do sistema de melanocortinas no controle da saciedade (HUSZAR et al., 1997).

Como já mencionado, o VIP microinfundido no PVN de ratos é capaz de estimular a liberação de CRH, ACTH e corticosterona plasmáticas de maneira dose-dependente (ALEXANDER, EVANS e SANDER, 1995).

Os glicocorticóides parecem interferir na sinalização do hormônio leptina, dificultando sua ação no sistema nervoso central (SNC), já que os efeitos desta que ocorrem via SNC, como hipofagia e diminuição do peso corpóreo, parecem mais potentes na ausência de glicocorticóides e são marcadamente atenuados com a reposição de glicocorticóides (ZAKRZEWSKA et al., 1997).

Tem sido demonstrado que a leptina interfere com a sinalização da insulina de maneira dose-dependente e reduz nos adipócitos o transporte de glicose estimulado pela insulina, enquanto aumenta o transporte de glicose, síntese de glicogênio e oxidação dos ácidos graxos nos músculos. Em condições de normoglicemia e normoinsulinemia a leptina parece levar metabólitos do tecido adiposo para o músculo esquelético. Como se sabe, em camundongos *ob/ob* e *db/db* a hiperinsulinemia e hiperglicemia são normalizadas pela administração de leptina (CEDDIA et al., 1998).

Com as informações apresentadas aqui, fica exemplificado o quanto são complexos os mecanismos que regem o controle do metabolismo energético, fome e saciedade. Vários circuitos neuronais operam em diferentes escalas e

provavelmente atuam com funções específicas sob condições particulares de balanço energético alterado. Sendo assim, neste trabalho buscamos compreender um pouco mais sobre algumas alterações plasmáticas (metabólitos e hormônios) geradas pelo mediador químico da saciedade – o VIP - quando microinfundido em um dos núcleos hipotalâmicos (PVN) que apresenta elevada importância na mediação destes controles.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do peptídeo anorexigênico VIP no PVN de ratos acordados, em jejum de 24 horas, 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão do VIP, sobre alguns parâmetros plasmáticos (glicose, colesterol, ácidos graxos livres, corticosterona, leptina e insulina) relacionados ao metabolismo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos causados pela microinfusão de salina sobre o PVN de ratos acordados, em jejum de 24 horas, após 10, 30 e 90 minutos da microinfusão, sobre alguns parâmetros plasmáticos;
- Avaliar os efeitos causados pela microinfusão de VIP sobre o PVN de ratos acordados, em jejum de 24 horas, após 10, 30 e 90 minutos da microinfusão, sobre alguns parâmetros plasmáticos.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Os animais utilizados foram 52 ratos, machos, adultos, linhagem Wistar, pesando entre 220 e 230 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Estes animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) em gaiolas coletivas para até cinco animais, com ambiente de luz (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 °C) controladas, e receberam água e alimentação à vontade. Todos os experimentos foram executados no Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo (LaFiNeM) entre 8 h e 12 h para minimizar qualquer influência do ritmo circadiano.

O presente projeto foi aprovado pela Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEAA), processo No. 26341/2008.

3.2 DROGA UTILIZADA

A droga utilizada para os experimentos foi o peptídeo intestinal vasoativo (VIP, Sigma Co. - CA), armazenado em freezer a -20 °C na dose de 40 ng/g de peso corpóreo e salina (0,9%) foi utilizada como controle.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Controle experimental:

- *grupo salina 10 minutos (SAL10):* composto por 12 animais submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia sobre o PVN e receberam 5 μ L de salina (0,9%). Foram decapitados 10 minutos após a microinfusão de salina.
- *grupo salina 30 minutos (SAL30):* composto por 7 animais submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia sobre o PVN que receberam 5 μ L de salina (0,9%). Foram decapitados 30 minutos após a microinfusão de salina.
- *grupo salina 90 minutos (SAL90):* composto por 5 animais submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia sobre o PVN que receberam 5 μ L de Salina (0,9%). Foram decapitados 90 minutos após a microinfusão de salina.

Grupos experimentais que receberam o VIP:

- *grupo VIP 10 minutos (VIP10)*: composto por 11 animais submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia sobre o PVN que receberam 5 µL de VIP (40 ng/g de peso corpóreo). Foram decapitados 10 minutos após a microinfusão de VIP.
- *Grupo VIP 30 minutos (VIP30)*: composto por 8 animais submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia sobre o PVN e receberam 5 µL de VIP (40 ng/g de peso corpóreo). Foram decapitados 30 minutos após a microinfusão de VIP.
- *Grupo VIP 90 minutos (VIP90)*: composto por 9 animais submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia sobre o PVN e receberam 5 µL de VIP (40 ng/g de peso corpóreo). Foram decapitados 90 minutos após a microinfusão de VIP.

3.4 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais provenientes do Biotério Central da UEL, permaneciam por um período mínimo de 48 h no Biotério Setorial do CIF para adaptação ao novo ambiente antes de serem submetidos ao procedimento cirúrgico.

Para a realização da cirurgia os animais foram anestesiados com pentobarbiturato de sódio (Hypnol®; 40 mg/Kg de peso corpóreo; I.P.). Ao entrarem em hipnose, foi realizada a tricotomia na região dorsal da cabeça do animal onde, posteriormente, injetou-se 0,3 mL de cloridrato de lidocaína 2%.

Procedeuse então à cirurgia estereotáxica, a qual possibilitou a implantação unilateral (lado direito) da cânula-guia sobre o PVN (AP = 6,7 mm; H = 6,4 mm; L = 0,4 mm; utilizando-se como ponto zero a linha interaural, a calota craniana e a sutura sagital, respectivamente), segundo coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (1986).

A cânula-guia utilizada foi construída a partir de agulha hipodérmica 25 x 7 mm, cortada no comprimento de 5,6 mm. Para fixação da cânula na posição adequada, acrílico autopolimerizável (Simplex) foi depositado sobre a calota craniana, na qual foram previamente fixados parafusos metálicos formando, assim, um capacete acrílico que impedisse qualquer prujuízo ao posicionamento da cânula. Dentro da cânula implantada um mandril de aço foi posicionado para evitar a obstrução de sua luz por detritos após o procedimento cirúrgico.

Quando os animais acordavam da anestesia, eram colocados em gaiolas individuais com livre acesso à água e alimentação, onde permaneciam por 2 dias para sua recuperação. No terceiro dia estes animais foram privados de alimentação estendendo este jejum por um período de 24 horas.

3.5 MICROINFUSÃO

No quarto dia de experimento, em jejum de 24 horas, a microinfusão de VIP (40 ng/g de peso corpóreo) ou salina (0,9%) ocorria, no período matutino, com o auxílio de uma microseringa Hamilton 10 μ L que estava acoplada a um sistema de cânulas de polietileno (P20) ligado a uma microagulha, a qual era introduzida na cânula-guia. A velocidade de 5 μ L/10 min foi mantida através de uma bomba de microinfusão (Razel™ Syringe Pump, *Razel Scientific Instrument*). Este protocolo se baseia em resultados prévios mostrando resposta de anorexia quando VIP é microinfundido ICV ou no PVN de diferentes animais (MOUNIEN et al., 2009; TACHIBANA et al., 2003).

3.6 EUTANÁSIA

Todos os animais utilizados nos experimentos foram eutanasiados por decapitação. Imediatamente após a decapitação seus cérebros foram retirados e colocados em recipientes contendo solução fixadora de formol (10%) para posterior análise histológica. O conteúdo de sangue foi coletado com o auxílio de um funil de vidro que vertia seu conteúdo em tubos de vidro cilíndricos graduados contendo heparina. Estes tubos eram centrifugados a 14.000 g por 20 min a 4 °C para a obtenção do plasma que era, então, separado em alíquotas e armazenado em tubos tipo Eppendorf e congelado a -20 °C para posteriores dosagens por métodos bioquímicos e imunológicos.

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cérebros eram mantidos em solução de formol por pelo menos dois dias para adquirirem a consistência necessária. Eram então fatiados (300 μ m) em micrótomo de congelamento para análise dos cortes histológicos em

estereomicroscópio. Dessa forma era possível verificar a posição de implantação da cânula-guia e microagulha de infusão. Somente foram considerados os dados dos animais microinfundidos na área desejada.

3.8 DOSAGENS PLASMÁTICAS

Glicose:

A determinação espectrofotométrica da concentração plasmática de glicose foi realizada utilizando-se o Kit Comercial Glicose BioLiquid (Laborclin, PR), baseado na reação de Trinder (1969), onde a glicose é determinada por sua reação com a glicose oxidase, na qual são gerados o ácido glicurônico e o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio então reage com o hidroxibenzoato de sódio e 4-aminofenazona, produzindo quinoamina, que tem a cor rosa. A intensidade da coloração é proporcional à concentração de glicose da amostra, sendo seus valores expressos mg/dL.

Colesterol:

A determinação espectrofotométrica da concentração plasmática de colesterol foi realizada utilizando-se o Kit Comercial Colesterol BioLiquid (Laborclin, PR), baseado na reação de Allain e col. (1974) onde os ésteres de colesterol são inicialmente hidrolisados pela colesterol esterase. O colesterol liberado é oxidado pela colesterol oxidase formando colest-4-en-3-ona e peróxido de hidrogênio. Finalmente, o peróxido de hidrogênio produzido é detectado pelo aparecimento de um produto corado, produzido pela reação com 4-aminofenazona e fenol, na presença de peroxidase. O produto final de cor rosa (quinoneimina) apresenta uma absorvância máxima a 500 nm. A intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de peróxido de hidrogênio produzido e à quantidade de colesterol existente na amostra, sendo seus valores expressos em mg/dL.

Ácidos graxos livres:

Para a determinação da concentração de ácidos graxos livres (AGL) foi utilizado o método espectrofotométrico de Falholt e col. (1973). Este método

consiste na utilização de 100 µL de amostra de plasma; e como padrão, 50 µL de uma solução, baseada em uma solução estoque de 2 mmol de ácido palmítico em um litro de solução extratora (clorofórmio + heptano + metanol). Foi acrescido a este padrão 1 mL de tampão fosfato (pH: 6,4) e 6,0 mL de solução extratora. Posteriormente, foi feita agitação de 2 minutos, com um repouso de 15 minutos e centrifugação durante 20 minutos a 14.000 g. Descartou-se a fase aquosa e retirou-se 5,0 mL da fase inferior que foi transferida para outro tubo, onde foram adicionados 2,0 mL de reagente de Cooper (CuTEA; pH: 8,1). Novamente, as amostras foram agitadas por 5 minutos, com posterior centrifugação a 14.000 g por 15 min. Como última etapa, transferiu-se 3,0 mL da fase superior para outro tubo, sendo adicionado neste 1,0 mL de reagente de coloração (DPC: 10 mL de DPC, dietilditilcarbamato, 4% + 0,1 mL de TEA 1 M). Como branco foram utilizados os mesmos reagentes, excluindo-se os 100 µL de amostra de plasma. Após repouso de 15 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm, e os valores expressos em µmoles/dL.

Corticosterona:

A determinação da concentração de corticosterona plasmática foi feita pelo método do método de Guillemin e col. (1959). Este consiste em um método fluorimétrico, 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, 100 µL de plasma foram acrescidos de diclorometano, com posterior agitação e aspiração da fase superior, possibilitando a partição e extração da corticosterona; após isso, 250 µL de NaOH 0,1 N foram adicionados à amostra para lavagem da amostra, seguido por agitação e aspiração da fase superior; após, 250 µL de água destilada foram adicionados, fez-se agitação e 2 mL da fase inferior foram retirados e transferidos para uma nova bateria de tubos. Como branco, apenas 2 mL de diclorometano foram utilizados. Na segunda etapa da dosagem, 10 µL de solução "working" (0,5 mL de solução padrão e etanol) foram adicionados ao tubo da solução padrão, e 0,5 mL de [H₂SO₄ : Etanol] foi acrescido à todos os tubos para uma segunda extração, seguido por agitação, com repouso de 20 minutos. 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 $\mu\text{g/dL}$.

Leptina:

A determinação de leptina plasmática foi realizada por meio de Kit Comercial RayBio[®] Rat, da RayBiotech, Inc.; o qual consiste em um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a dosagem quantitativa de leptina de rato. Este ensaio emprega um anticorpo específico para a leptina de rato revestindo os 96 pocinhos da placa. Padrões e amostras são pipetados nos pocinhos e a leptina presente se liga aos anticorpos imobilizados nos pocinhos. Procede-se a lavagem e o anticorpo biotilado anti-leptina de rato é adicionado. Após a lavagem um composto de *streptavidin* conjugado com HRP (*horse radish peroxidase*) é adicionado. Os pocinhos são lavados novamente e uma solução de substrato cromogênico TMB é adicionado. A coloração que se desenvolve é proporcional à quantidade de leptina ligada. Uma solução ácida é adicionada para interromper a reação, alterando a coloração de azul para amarelo, e a intensidade da cor é mensurada espectrofotometricamente a 450 nm, sendo seus valores expressos em pg/mL .

Insulina:

A determinação de insulina plasmática foi realizada utilizando-se o Kit Comercial Rat Insulin ELISA Kit, da Shibayagi Co.; o qual consiste em um ensaio imunoenzimático (ELISA) *sandwich* para dosagem quantitativa de insulina de rato. O anticorpo anti-insulina conjugado com *biotin* e os padrões ou amostras são incubadas em pocinhos revestidos com um anticorpo monoclonal anti-insulina para captar a insulina ligada ao composto anti-insulina conjugado com *biotin*. Após 2 horas de incubação e lavagens, *streptavidin* conjugado com HRP é adicionado e incubado por 30 minutos. Após as lavagens, o *streptavidin* conjugado com HRP remanescente nos pocinhos reage com o tetrametil benzeno (TMB) por 30 minutos, e a reação é interrompida pela adição de solução ácida, gerando um produto amarelo. A absorvância é mensurada espectrofotometricamente a 450 nm. A absorvância é proporcional à concentração de insulina. A curva padrão é preparada

confrontando-se as absorvâncias contra as concentrações de cada ponto da curva. Os valores foram expressos em ng/mL.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística utilizou-se a Análise de Variância ANOVA seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, considerando-se como nível de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

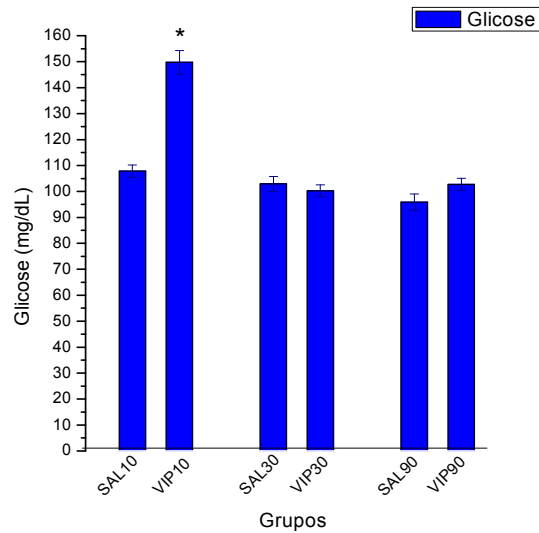
Verifica-se (figura 2, anexo A) que a microinfusão de 5 $\mu\text{L}/10$ min de VIP (40 ng/g de peso corpóreo) no PVN de ratos acordados em jejum de 24 horas resultou, 10 minutos após o término da microinfusão (grupo VIP10), em aumento do valor médio da concentração plasmática de glicose ($149,72 \pm 4,49$ mg/dL; n=11), que mostra-se estatisticamente diferente [$F(5,46) = 42,65$; $p < 0,05$] dos grupos SAL10 ($107,79 \pm 2,38$ mg/dL; n=12), SAL30 ($102,9 \pm 2,9$ mg/dL; n=7), SAL90 ($95,9 \pm 3,12$ mg/dL, n=5), VIP30 ($100,23 \pm 2,31$ mg/dL; n=8), VIP90 ($102,69 \pm 2,4$ mg/dL; n=9). Os grupos SAL10, SAL30, SAL90, VIP30 e VIP90 não diferem estatisticamente entre si.

Os resultados obtidos para as concentrações plasmáticas de colesterol (figura 3, anexo A), evidenciam que não existe diferença estatística entre os grupos VIP (VIP10: $64,64 \pm 3,05$ mg/dL, n=11; VIP30: $57,63 \pm 5,37$ mg/dL, n=8; e VIP90: $60,85 \pm 5,48$ mg/dL, n=9) e também não há diferença estatística com relação aos respectivos grupos Salina (SAL10: $63,6 \pm 4,76$ mg/dL, n=12; SAL30: $55,1 \pm 5,17$ mg/dL, n=7; SAL90: $57,83 \pm 3,86$ mg/dL, n=7).

A concentração plasmática de AGL (figura 4 anexo A) do grupo VIP10 ($101,48 \pm 7,67$ $\mu\text{moles}/\text{dL}$; n=11) difere [$F(5,45) = 5,56$; $p < 0,05$] dos grupos SAL10: $82,96 \pm 4,49$ $\mu\text{moles}/\text{dL}$, n=11; SAL30: $64,88 \pm 2,61$ $\mu\text{moles}/\text{dL}$, n=7; SAL90: $67,60 \pm 4,32$ $\mu\text{moles}/\text{dL}$, n=5; VIP30: $78,29 \pm 4,83$ $\mu\text{moles}/\text{dL}$, n=8 e VIP90: $79,85 \pm 4,34$ $\mu\text{moles}/\text{dL}$, n=9. Os grupos SAL10, SAL30, SAL90, VIP30 e VIP90 não são estatisticamente diferentes entre si.

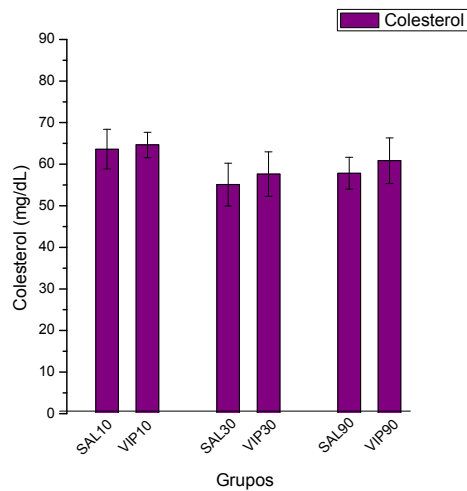
Com relação ao hormônio corticosterona verifica-se (figura 5, anexo B) que o grupo VIP10 ($12,78 \pm 0,62$ $\mu\text{g}/\text{dL}$; n=9) difere estatisticamente [$F(5,44) = 9,27$; $p < 0,05$] dos demais grupos (SAL10: $8,42 \pm 0,83$ $\mu\text{g}/\text{dL}$, n=12; SAL30: $5,98 \pm 0,83$ $\mu\text{g}/\text{dL}$, n=7; SAL90: $7,1 \pm 0,56$ $\mu\text{g}/\text{dL}$, n=5; VIP30: $5,76 \pm 1,04$ $\mu\text{g}/\text{dL}$, n=8; VIP90: $5,48 \pm 1,2$ $\mu\text{g}/\text{dL}$, n=9). Não há diferença estatística entre os grupos SAL10, SAL30, SAL90, VIP30 e VIP90.

Figura 2 - Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão de salina (grupos SAL10, n=12; SAL30, n=7; e SAL90, n=5) ou VIP (grupos VIP10, n=11; VIP30, n=8; e VIP90, n=9).



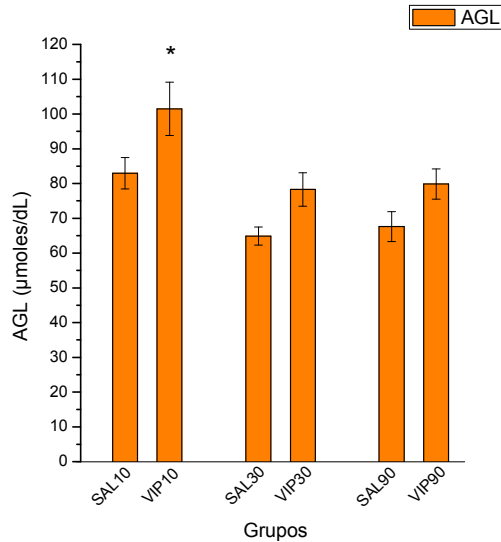
Valores expressos como média \pm e.p.m. *Diferente dos grupos SAL10, SAL30, SAL90, VIP30 e VIP90 ($p < 0,05$).

Figura 3 - Concentrações plasmáticas de colesterol (mg/dL) 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão de salina (grupos SAL10, n=12; SAL30, n=7; e SAL90, n=5) ou VIP (grupos VIP10, n=11; VIP30, n=8; e VIP90, n=9).



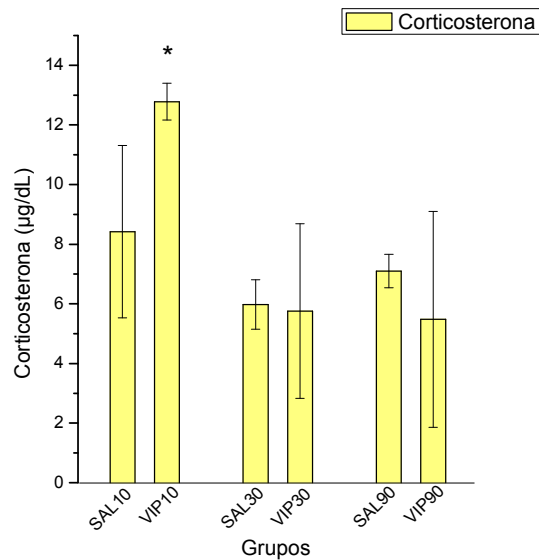
Valores expressos como média \pm e.p.m. *Diferente dos grupos SAL10, SAL30, SAL90, VIP10, VIP30 e VIP90 ($p < 0,05$).

Figura 4 - Concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (AGL; $\mu\text{moles/dL}$) 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão de salina (grupos SAL10, n=11; SAL30, n=7; e SAL90, n=5) VIP (grupos VIP10, n=11; VIP30, n=8; e VIP90, n=9). Valores expressos como média \pm e.p.m.



*Diferente dos grupos SAL10, SAL30, SAL90, VIP10, VIP30 e VIP90 ($p < 0,05$).

Figura 5 - Concentrações plasmáticas de corticosterona ($\mu\text{g/dL}$) 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão de salina (grupos SAL10, n=12; SAL30, n=7; e SAL90, n=5) ou VIP (grupos VIP10, n=9; VIP30, n=8; e VIP90, n=9).



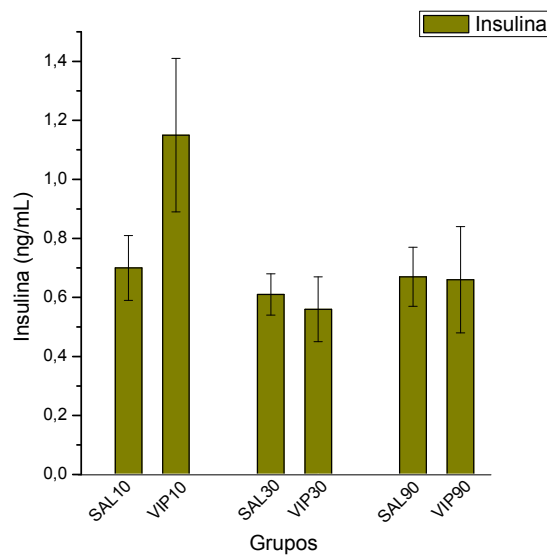
Valores expressos como média \pm e.p.m. *Diferente dos grupos SAL10, SAL30, SAL90, VIP30 e VIP90 ($p < 0,05$).

As concentrações plasmáticas de insulina (figura 6, anexo B) não apresentaram diferenças estatísticas tanto na comparação entre os grupos VIP (VIP10: $1,15 \pm 0,26$ ng/mL, n=5; VIP30: $0,56 \pm 0,11$ ng/mL, n=5; VIP90: $0,66 \pm 0,18$

ng/mL, n=5) como em relação aos respectivos grupos Salina (SAL10: $0,7 \pm 0,11$ ng/mL, n=5; SAL30: $0,61 \pm 0,07$ ng/mL, n=5; e SAL90: $0,67 \pm 0,1$ ng/mL, n=5).

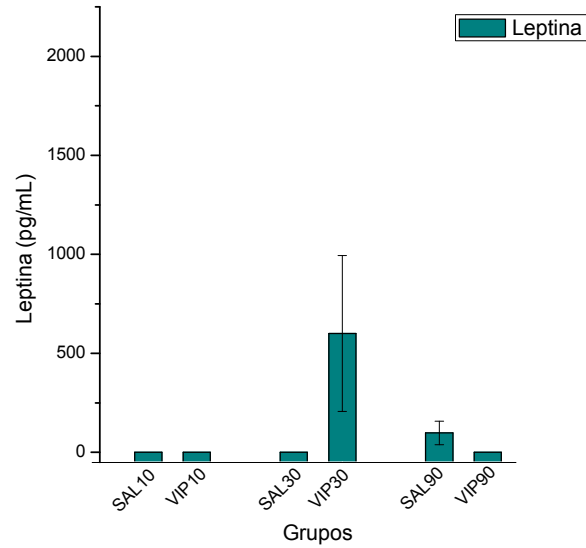
Para as dosagens plasmáticas de leptina (figura 7, anexo B), não há diferença estatística entre os grupos SAL10: <30 pg/mL, n=6; VIP10: <30 pg/mL, n=9; SAL30: <30 pg/mL, n= 5; VIP30: $600,94 \pm 393,71$ pg/mL, n=8; SAL90: $98,49 \pm 59,86$ pg/mL, n=4; VIP90: <30 pg/mL, n=8.

Figura 6 - Concentrações plasmáticas de insulina (ng/mL) 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão de salina (grupos SAL10, n=5; SAL30, n=5; e SAL90, n=5) ou VIP (grupos VIP10, n=5; VIP30, n=5; e VIP90, n=5).



Valores expressos como média \pm e.p.m.

Figura 7 - Concentrações plasmáticas de leptina (pg/mL) 10, 30 e 90 minutos após a microinfusão de salina (grupos SAL10, n=6; SAL30, n=5; e SAL90, n=4) ou VIP (grupos VIP10, n=9; VIP30, n=8; e VIP90, n=8).



Valores expressos como média \pm e.p.m.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o papel da microinfusão de VIP no PVN de ratos em jejum acordados, após 10, 30 e 90 minutos da microinfusão, sobre parâmetros hormonais e metabólicos importantes na manutenção da homeostase do balanço energético.

Sabe-se que o VIP, ao se ligar em receptores no PVN, atua como um sinal anorexigênico que promove alterações no metabolismo favorecendo o gasto energético (GHOUBAB et al., 2011) tanto por atuar diretamente em vias neuronais eferentes (ENDO et al., 1991), quanto indiretamente estimulando a liberação de hormônios, tais como, glicocorticóides por liberação de CRH (ALEXANDER et al., 1995).

É bem estabelecida a existência de uma relação entre o consumo alimentar e o sistema nervoso autonômico (BRAY; YORK; FISLER, 1989), sendo que peptídeos que atuam centralmente estimulando o consumo alimentar reduzem a atividade neurovegetativa simpática enquanto favorecem a atividade neurovegetativa parassimpática; de maneira contrária, os peptídeos que atuam centralmente sinalizando a saciedade, reduzem a atividade parassimpática, favorecendo a atuação nervosa simpática (SAKAGUCHI et al., 1988).

Assim, alguns dos efeitos observados no grupo VIP10 provavelmente sejam decorrentes da ativação de vias neuronais descendentes que ativariam vias simpáticas, as quais atuariam em diferentes órgãos resultando em alteração da concentração de metabólitos e hormônios no plasma. Seguindo este princípio, a atuação nervosa simpática sobre o tecido adiposo auxiliaria o entendimento de dois fenômenos observados: o aumento dos ácidos graxos livres e da glicose no plasma do grupo VIP10. Isso porque a estimulação simpática neste tecido resulta em lipólise (STANLEY et al., 2010), e os triglicerídeos armazenados nos adipócitos são hidrolisados gerando ácidos graxos livres e glicerol. O glicerol é um importante substrato gliconeogênico. Por isso, o aumento de glicose registrado seria, parcialmente, uma consequência do aumento deste substrato, que ao atingir o fígado pela veia porta, entra na via gliconeogênica. Pelo fato da utilização de animais em jejum de 24 horas para o presente experimento, considera-se que a via gliconeogênica já está ativada antes mesmo da microinfusão do peptídeo, por

compreender uma estratégia fisiológica para a manutenção da glicemia numa concentração média mínima necessária para evitar danos a tecidos nobres.

Sabe-se que tanto vias neuronais simpáticas, quanto parassimpáticas se projetam para o fígado (UYAMA et al., 2004). Sendo assim, esta ativação simpática promovida pelo VIP só reforça a informação já existente (dada pelo jejum) para o aumento da atividade da enzima fosfo-enol-piruvato carboxicinase (PEPCK) - enzima chave para que ocorra a gliconeogênese. O estímulo simpático sobre este órgão provoca um rápido efluxo de glicose, tanto pela glicogenólise quanto pela gliconeogênese (ARONOFF et al., 2004). Acredita-se que o glicogênio hepático já tenha sido consumido pelo jejum prévio e, por isso, um dos motivos para o aumento na glicemia registrado seria uma consequência da atividade da via gliconeogênica.

Além disso, este aumento da atividade simpática também atua sobre outros órgãos importantes na regulação do metabolismo energético. A estimulação sobre a medula adrenal resulta na liberação de catecolaminas, outro sinal para a gliconeogênese (LI et al., 1999); e sobre o pâncreas resulta em liberação de glucagon, um hormônio hiperglicemiante (BUIJS et al., 2001).

Também corrobora com o aumento da glicemia, a atuação da corticosterona, que apresentou elevada concentração no plasma dos animais do grupo VIP10. Este aumento da corticosterona mediado pela ação do VIP no PVN já foi demonstrado em outros trabalhos (ALEXANDER; SANDER, 1994; ALEXANDER et al., 1995), e ocorre especialmente por estimulação direta do VIP em neurônios CRH no PVN, ativando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).

O aumento de corticosterona estimula a gliconeogênese, a lipólise e a proteólise. Neste caso, outro substrato gliconeogênico entra em questão pela proteólise: os aminoácidos. Vale a pena ressaltar que além de aumentar os substratos energéticos disponíveis, a corticosterona também reduz a utilização de glicose pelos tecidos periféricos, assim como o glucagon, sendo mais um provável fator para o aumento da glicemia naqueles animais (RAALTE et al., 2011). A partir destas informações, o entendimento da glicemia elevada, em nossos resultados, é facilitado.

O tecido adiposo e o tecido muscular esquelético são potentes consumidores da glicose na presença de glicemia elevada e ação insulínica. Admitindo-se que a estimulação simpática sobre o tecido adiposo esteja

promovendo a lipólise, nesse momento, uma via bioquímica oposta seria ativada, inibindo enzimas que favoreceriam a captação da glicose. Caso a estimulação simpática não esteja sustentada neste momento a participação da corticosterona interferindo na ação insulínica deve ser considerada, não só para o tecido adiposo, como também para o tecido muscular esquelético, tecidos que sob a influência deste hormônio exprimem uma resistência à ação da insulina, e por isso, caracteriza uma capacidade reduzida para a captação da glicose, mantendo-a com a concentração elevada no plasma (SOUTHORN et al, 1990). Assim, o conjunto de fenômenos observados no grupo VIP10, somados ao possível aumento do glucagon e adrenalina hipotetizados tornam a glicemia deste grupo elevada.

Um aumento de AGL é outro fator que certamente contribuiu para o aumento da glicemia no grupo VIP10, uma vez que a utilização de AGL pelos tecidos muscular esquelético e adiposo, como fonte de energia, diminuem a captação e utilização periférica de glicose pelo ciclo de Randle (RANDLE, 1963).

A concentração plasmática de insulina no grupo VIP10 não é estatisticamente diferente dos demais grupos, no entanto, observa-se uma curiosa tendência de aumento da mesma no grupo VIP10. Acreditamos que este fato seja uma consequência do aumento da glicemia que atuaria diretamente nas células beta do pâncreas para a liberação da insulina. Possivelmente, o reduzido número de animais por grupo utilizados para a dosagem deste hormônio, somado à variabilidade biológica, resultaram em prejuízo à análise estatística.

A insulina é fisiologicamente liberada pelo pâncreas e o VIP é liberado no hipotálamo durante o estado alimentado. A liberação de insulina é um reforço à sinalização de saciedade, porém, em contrapartida, gera a captação da glicose pelos tecidos sensíveis a este hormônio, culminando em redução da glicemia num curto período, fato observado nos grupos VIP30 e VIP90, nos quais o hormônio corticosterona já apresenta-se reduzido na comparação com o grupo VIP10. Considerando-se que a liberação da insulina e do glucagon podem ser entendidas como uma relação insulina/glucagon, em situações fisiológicas, quanto maior a relação insulina/glucagon, mais expressiva é a ação permissiva da insulina sobre a captação de glicose. Portanto, quando a concentração de insulina é reduzida, isso representa uma queda na relação insulina/glucagon. Sendo assim, acredita-se que a concentração de glucagon elevou-se, numa estratégia para a estabilização da glicemia dentro de concentrações toleráveis nos grupos VIP30 e VIP90.

Uma informação importante sobre os grupos avaliados, diz respeito a concentração do hormônio leptina. Apesar de o hormônio insulina gerar a captação de glicose pelo tecido adiposo, esta captação não é capaz de modificar a liberação do hormônio leptina, pois o organismo continua em déficit energético, estabelecido pelo jejum. Esta é a razão para a liberação de leptina não aumentar nesta instância. Sendo assim, a baixa concentração de leptina na corrente sanguínea é um potente sinalizador no hipotálamo de que, apesar da presença do VIP no PVN, o balanço energético continua negativo e a correção desta situação será necessária.

Após 30 e 90 minutos (grupos VIP30 e VIP90) os valores de glicose, ácidos graxos livres e corticosterona plasmáticos não diferem dos respectivos controles salina (SAL30 e SAL90). Estes dados indicam que os efeitos causados pela microinfusão do VIP no PVN, possivelmente, são rapidamente contra-regulados, pois as vias orexigênicas devem estar ativadas em paralelo, fato exemplificado neste experimento pela dosagem do hormônio leptina, que estava muito reduzida (devido ao jejum) ou nem mesmo possível de ser detectada no plasma, dada a limitação imposta pela sensibilidade do método utilizado.

As vias orexigênicas promovem uma sinalização inversa às ativadas pelo VIP. Ocorre a redução da atividade simpática e aumento do tônus parassimpático (CUSIN et al., 2001; SAINSBURY et al., 2001; KALSBECK et al., 2010) e, assim, tendo diversas consequências por modificar a sinalização sobre os tecidos já citados, alterando a prevalência da atividade simpática para a parassimpática (SNITKER et al., 2000). O metabolismo é reduzido e a fome é sinalizada.

É sabido que os corticosteróides podem atuar centralmente bloqueando a secreção de ACTH (ROTSZTEJN et al., 1981), e assim reduzindo a secreção de corticosterona. Ou seja, o aumento de corticosterona observado no grupo VIP10 pode não ter sido sustentado para os tempos de 30 e 90 minutos devido à atuação deste hormônio centralmente, bloqueando o sinal para sua liberação, num mecanismo de *feedback*.

Com relação ao metabolismo das gorduras, já foi demonstrado que a microinfusão do VIP no PVN provoca um aumento dos valores plasmáticos de ácidos graxos livres em animais anestesiados (ARAUJO et al., 2003), sendo esta constatação confirmada para animais acordados, no presente trabalho. Porém, a ação central deste peptídeo sobre o metabolismo de gorduras na periferia não foi

capaz de alterar a concentração do colesterol total no plasma de nenhum dos grupos experimentais.

Com relação aos AGL, o grupo VIP10 está aumentado com relação ao respectivo grupo salina (SAL10). Este aumento sugere ação do peptídeo resultando em estimulação da atividade neurovegetativa simpática sobre o tecido adiposo, causando a lipólise e conseqüente aumento do AGL.

As diferenças observadas entre os grupos VIP e salina, para as concentrações plasmáticas de glicose, AGL e corticosterona somente são observadas no tempo 10 minutos. Estas diferenças não persistem nos tempos 30 e 90 minutos (VIP30/SAL30 e VIP90/SAL90), ilustrando a ação aguda do VIP no PVN. Possivelmente, este efeito agudo está relacionado à depuração do VIP, visto que na circulação periférica o tempo de meia-vida mostra-se curto (0,4 a 1,0 minuto) (GOLOLOBOV et al., 1998), e à contra regulação promovida pelos mecanismos neurais e hormonais envolvidos na homeostase em caso de balanço energético negativo.

Para esclarecer, nesse mecanismo, a participação de outros hormônios, tais como glucagon e adrenalina, e metabólitos como glicerol e aminoácidos, mais estudos devem ser conduzidos.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que o VIP é capaz de aumentar a concentração de glicose, ácidos gráxos livres e corticosterona plasmáticos em animais acordados em jejum de 24 horas. Esta ação é de curto prazo, visto que somente foi registrada no tempo de 10 minutos após a microinfusão do peptídeo no PVN. Após 30 e 90 minutos da microinfusão, estes valores são semelhantes aos controles.

Estes resultados sugerem que o VIP tenha um papel ativador de vias que estimulam a resposta neurovegetativa simpática resultando em alterações metabólicas compatíveis com o quadro simpático e a anorexia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, C. et al. Neurotransmitter and immunomodulatory actions of VIP and PACAP: lessons from knockout mice. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 12, n. 3, p. 297-310, 2006.
- ALLAIN, C.C. et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*, v. 20, p. 470-475, 1974.
- ALEXANDER, L.D., EVANS, K., SANDER, L.D. A possible Involvement of VIP in feeding-induced secretion of ACTH and corticosterone in the rat. *Physiology & Behavior*, v. 58, n. 2, p. 409-413, 1995.
- ALEXANDER, L.D., SANDER, L.D. Vasoactive intestinal peptide stimulates ACTH and corticosterone release after injection into the PVN. *Regulatory Peptides*, v. 51, p. 221-227, 1994.
- ARAUJO, B.B. et al. Efeito agudo da microinjeção do peptídeo intestinal vasoativo (VIP) no núcleo arqueado do hipotálamo em alguns parâmetros metabólicos. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA FESBE, Livro de Resumos, v. 18, 2003.
- ARONOFF, S.L. et al. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectrum*, v. 17, n. 3 p.183-190, 2004.
- ARORA, A.S. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity - a review, news and reviews. *Neuropeptides*, v. 40, p. 375-401, 2006.
- BANKS, W.A. Blood-Brain Barrier and Energy Balance. *Obesity*, v. 14, p. 234S-237S, 2006.
- BERNARDIS, L.L., BELLINGER, L.L. Suppression of feeding by cholecystokinin but not bombesin is attenuated in dorsomedial hypothalamic nuclei lesioned rats. *Peptides*, v. 5, p. 547-552, 1984.
- BERNARDIS, L.L., BELLINGER, L.L. The lateral hypothalamic area revisited. *Brain research*, v. 20, p. 189-287, 1996.
- BILLINGTON, C.J. et al. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 260, n. 2, p.321-327, 1991.
- BOURET, S.G., DRAPER S. J., SIMERLY, R.B. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *The Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 11, p. 2797-2805, 2004.
- BRAY, G.A., YORK, D.A., FISLER, J.S. Experimental obesity: a homeostatic failure due to defective nutrient stimulation of the sympathetic nervous system. *Vitamins and Hormones*, v. 45, p. 1-125, 1989.

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

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

BROBERGER, C., SUTCLIFFE, J.G.D.; HOKFELT, T. Hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 402, n. 4, p. 460-474, 1998.

BRUIJNZEIL, A.W. et al. Effects of insulin and leptin in the ventral tegmental area and arcuate hypothalamic nucleus on food intake and brain reward function in female rats. *Behavioral Brain Research*, v. 219, p. 254-264, 2011.

BUIJS, R.M. et al. Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *The journal of comparative neurology*, v. 431, p. 405-423, 2001.

CEDDIA, R.B. et al. Pivotal role of leptin in insulin effects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, n. 6, p. 715-722, 1998.

CHOI, Y. et al. TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. *Physiology & Behavior*, v. 77, p. 1-4, 2002.

CONE, R.D. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocrinology Reviews*, v. 27, n. 7, p. 736-749, 2006.

CUSIN, I., ROURU, J., ROHNER-JEANRENAUD, F. Intracerebroventricular Glucocorticoid infusion in normal rats: induction of parasympathetic-mediated obesity and insulin resistance. *Obesity Research*, v. 9, n. 7, p. 401-406, 2001.

DEVASKAR, S.U. Neurohumoral regulation of body weight gain. *Pediatric Diabetes*, v. 2, p. 131-144, 2001.

DUBUC, P.U. The development of obesity, hyperinsulinemia and hyperglycemia in ob/ob mice. *Metabolism*, v. 25, n. 12, p. 1567-1574, 1976.

ELMQUIST, J.K. et al. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 2, p. 741-746, 1998.

ENDO, M. et al. Mechanism for the cardiovascular action of intracerebroventricularly administered vasoactive intestinal polypeptide in rats. *Experimental and Clinical Endocrinology*, v. 97, n. 1, p. 55-62, 1991.

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.

GHAMARI-LANGROUDIA, M., SRISAIB, D., CONEA, R.D. Multinodal regulation of the arcuate/paraventricular nucleus circuit by leptin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 1, p. 355-360, 2011.

GHOUREB, S. et al. Intracerebroventricular administration of vasoactive intestinal peptide inhibits food intake. *Regulatory Peptides*, v. 172, n. 3, p. 8-15, 2011.

GOLOLOBOV, G. et al. Stabilization of vasoactive intestinal peptide by lipids. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. V. 285, n. 2, p. 753-785.

GUILLEMIN, R. et al. 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, p. 149-172, 1940.

HUSZAR, D. et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, v. 88, p. 131-141, 1997.

ITRI, J., COLWELL, C.S. Regulation of inhibitory synaptic transmission by vasoactive intestinal peptide (VIP) in the mouse suprachiasmatic nucleus. *The Journal of Neurophysiology*, v. 90, p. 1589-1597, 2003.

JANG, M. et al. Leptin rapidly inhibits hypothalamic neuropeptide y secretion and stimulates corticotropin-releasing hormone secretion in adrenalectomized mice. *The Journal of Nutrition*, v. 130, p. 2813-2820, 2000.

KALSBECK, A. et al. Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *Annals of The New York Academy of Sciences*, v. 1212, p. 114-129, 2010.

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

LI, Q., JOHANSSON, H., GRIMELIUS, L. Innervation of human adrenal gland and adrenal cortical lesions. *Virchows Arch*, v. 435, p. 580-589, 1999.

LIU, X.H. et al. A preferentially excites glucose-sensitive neurons in the lateral hypothalamus of the rat in vitro. *Diabetes*, v. 50, p. 2431-2437, 2001.

MATSUDA, K., MARUYAMA, K. Regulation of feeding behavior by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in vertebrates. *Peptides*, v. 28, n. 9, p. 1761-1766, 2007.

MATSUDA, K. et al. Inhibitory effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on food intake in the goldfish, *carassius auratus*. *Peptides*, v. 26, p. 1611-1616, 2005.

MCGOWAN, M.K., ANDREWS, K.M., GROSSMAN, S.P. Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiology & Behavior*, v. 51, n. 4, p. 753-766, 1992.

MORLEY, J.E. et al. Leptin and neuropeptide Y (NPY) modulate nitric oxide synthase: further evidence for a role of nitric oxide in feeding. *Peptides*, v. 20, p. 595-600, 1999.

MOUNIEN, L. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits food intake in mice through activation of the hypothalamic melanocortin system. *Neuropsychopharmacology*, v. 34, p. 424-435, 2009.

NEARY, N.M., GOLDSTONE, A.P., BLOOM, S.R. Appetite regulation: from gut to the hypothalamus. *Clinical Endocrinology*, v. 60, p. 153-160, 2004.

NGUYEN, P. et al. Composition of meal influences changes in post prandial incremental glucose and insulin in health dogs. *The Journal of Nutrition*, v. 124, n. 12, p. 2707S-2711S, 1994.

PAPASPYROU-RAO, S. et al. Dexamethasone increases leptin expression in humans in vivo. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, v. 82, p. 1635-1637, 1997.

PAXINOS, G., WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Orlando: Academic Press, 2. ed., 1986.

RAALTE, D.H. et al. Low-dose glucocorticoid treatment affects multiple aspects of intermediary metabolism in healthy humans: a randomised controlled trial. *Diabetologia*, v. 54, p. 2103–2112, 2011.

RANDLE, P. J. et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, v. 1, n. 7285, p. 785-9, 1963. RIBEIRO, E.B. Studying the central control of food intake and obesity in rats. *Revista de Nutrição*, v. 22, n. 1, p. 163-171, 2009.

RÖNNEMAA, T. et al. Relation between Plasma Leptin Levels and Measures of Body Fat in Identical Twins Discordant for Obesity. *Annals of Internal Medicine*, v. 126, p. 26-31, 1997.

ROSTÉNE, W.H. et al. Distribution of vasoactive intestinal vasoactive peptide (VIP) following various brain transections in the rat by radioimmunoassay and electromicroscopic immunocytochemistry. *Neuropeptides*, v. 2, p. 337-350, 1982.

ROTSZTEJN, W.H. et al. Rapid glucocorticoid inhibition of vasoactive intestinal peptide-induced cyclic AMP accumulation and prolactin release in rat pituitary cells in culture. *Cell biology*, v. 78, n. 12, p. 7584-7588, 1981.

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

SAINSBURY, A., WILKS, D., COONEY, G.J. Central but not peripheral glucocorticoid infusion in adrenalectomized male rats increases basal and substrate-induced insulinemia through a parasympathetic pathway. *Obesity Research*, v. 9, n. 4, p. 274-291, 2001.

SAKAGUCHI, T., TAKAHASHI, M., BRAY, G.A. diurnal changes in sympathetic activity: relation to food intake and to insulin injected into the ventromedial or

suprachiasmatic nucleus. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 82, p. 282-286, 1988.

SAMSON, W.K., SAID, S.I., MCCANN, S.M. Radioimmunologic localization of vasoactive intestinal peptide in hypothalamic and extrahypothalamic sites in the rat brain. *Neuroscience Letters*, v. 12, p. 265-269, 1979.

SATOH, N. et al. Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for the loss of its satiety effect in the VMH-lesioned rats. *Endocrinology*, v. 138, p. 947-954, 1997.

SCHWARTZ, M.W. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*, v. 45, n. 4, p. 531-535, 1996.

SHIMATSU, A. et al. Involvement of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in prolactin secretion induced by serotonin in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 175, p. 414-416, 1984.

SIMPSON, K.A., MARTIN, N.M., BLOOM, S.R. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. Review. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*, v. 53, n. 2, p. 120-128, 2009.

SNITKER, S. et al. The sympathetic nervous system and obesity: role in etiology and treatment. *Obesity Reviews*, v. 1, p. 5-15, 2000.

SOUTHORN, B.G., PALMER, R.M., GARLICK, P.J. Acute effects of corticosterona on tissue protein synthesis and insulin-sensitivity in rats *in vivo*. *Biochemical Journal*, v. 272, p. 187-91, 1990.

STANLEY, B.G. et al. Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides*, v. 6, p. 1205-1209, 1985.

STANLEY, B.G. et al. Suppression of neuropeptide Y-elicited eating by adrenalectomy or hypophysectomy: reversal with corticosterone. *Brain Research*, v. 501, p. 32-36, 1989.

STANLEY, S. et al. Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, v. 117, n. 15, p. 7024-7029, 2010.

TACHIBANA, T. et al. Anorexigenic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in the chick brain are mediated by corticotrophin-releasing factor. *Regulatory Peptides*, v. 120, p. 99-105, 2004.

TACHIBANA, T. et al. Inacerebroventricular injection of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibits feeding in chicks. *Neuroscience Letters*, v. 339, p. 203-206, 2003.

TORRES DOS SANTOS, A.A. *Polipeptídeo intestinal vasoativo no núcleo paraventricular do hipotálamo, produção de óxido nítrico, neuropeptídeo Y, hormônio*

tireotrófico e ingestão alimentar. 2011. Dissertação (Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 6, p. 24, 1969.

UEHARA, Y. et al. Hypothalamic corticotrophin-releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin. *Diabetes*, v. 47, p. 890-893, 1998.

UYAMA, N., GEERTS, A., REYNAERT, H. Neuronal connections between the hypothalamus and the liver. *The Anatomical Record*, part A, v. 280A, p. 808-820, 2004.

WAHLESTEDT, C. Neuropeptide Y (NPY) in the area of the hypothalamic paraventricular nucleus activates the pituitary-adrenocortical axis in the rat. *Brain Research*, v. 417, p. 33-38, 1987.

WALKER, H.C., ROMSOS, D.R. Similar effects of NPY on energy metabolism and on plasma insulin in adrenalectomized ob/ob and lean mice. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, v. 264, n. 2, p. 226-230, 1993.

WANG, J. et al. Neuropeptide Y in relation to carbohydrate intake, corticosterone and dietary obesity. *Brain Research*, v. 802, p. 75-88, 1998.

WELKENHUYSEN, M. et al. Electrical stimulation in the lateral hypothalamus in rats in the activity-based anorexia model. *Neurosurgery Focus*, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2008.

WILLIAMS, G. et al. The hypothalamus and the control of energy homeostasis. Different circuits, different purposes. *Physiology & Behavior*, v. 74, p. 683-701, 2001.

WOODS, S. et al. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*, v. 282, p. 503-505, 1979.

ZAKRZEWSKA, K. E. et al. Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance. *Diabetes*, v. 46, p. 717-719, 1997.

ZLOKOVIC, B.V. et al. Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology*, v. 141, p. 1434-1441, 2000.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 1 - Valores médios plasmáticos de glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL) e ácidos graxos livres (AGL; μ moles/dL) de animais em jejum de 24 horas, acordados, submetidos à microinfusão de peptídeo intestinal vasoativo (VIP: 40 ng/g de peso corpóreo) ou salina (0,9%) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), após 10, 30 ou 90 minutos da microinfusão.

Grupos Experimentais	Glicose	Colesterol	AGL
Salina10	107,79 \pm 2,38 (12)	63,60 \pm 4,76 (12)	82,96 \pm 4,49 (11)
Salina30	102,90 \pm 2,90 (7)	55,10 \pm 5,17 (7)	64,88 \pm 2,61 (7)
Salina90	95,90 \pm 3,12 (5)	57,83 \pm 3,86 (7)	67,60 \pm 4,32 (5)
VIP10	149,72 \pm 4,49* (11)	64,64 \pm 3,05 (11)	101,48 \pm 7,67* (11)
VIP30	100,23 \pm 2,31 (8)	57,63 \pm 5,37 (8)	78,29 \pm 4,83 (8)
VIP90	102,69 \pm 2,40 (9)	60,85 \pm 5,48 (9)	79,85 \pm 4,34 (9)

Valores expressos como média \pm erro padrão da média. (): número de animais.

* Diferente dos grupos SAL10, SAL30, SAL90, VIP30 e VIP90 ($p < 0,05$).

ANEXO B

Tabela 2 - Valores médios plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dL}$), leptina (pg/mL) e insulina (ng/mL) de animais em jejum de 24 horas, acordados, submetidos à microinfusão de peptídeo intestinal vasoativo (VIP: 40 ng/g de peso corpóreo) ou salina (0,9%) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), após 10, 30 ou 90 minutos da microinfusão.

Grupos Experimentais	Corticosterona	Leptina	Insulina
Salina10	8,42 \pm 0,83 (12)	>30 (6)	0,70 \pm 0,11 (5)
Salina30	5,98 \pm 0,83 (7)	>30 (5)	0,61 \pm 0,07 (5)
Salina90	7,1 \pm 0,56 (5)	98,49 \pm 59,86 (4)	0,67 \pm 0,10 (5)
VIP10	12,78 \pm 0,62* (9)	>30 (9)	1,15 \pm 0,26 (5)
VIP30	5,76 \pm 1,04 (8)	600,94 \pm 393,71 (8)	0,56 \pm 0,11 (5)
VIP90	5,48 \pm 1,2 (9)	>30 (8)	0,66 \pm 0,18 (5)

Valores expressos como média \pm erro padrão da média. (): número de animais. >30: valor menor que o limite mínimo de detecção do método (30 pg/mL).

*Diferente dos grupos SAL10, SAL30, SAL90, VIP30 e VIP90 ($p < 0,05$);