

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

**Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
UNESP/UFSCAR**

Laísa Taís Cabral Rodrigues Xavier

Participação do Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) no hipotálamo lateral/área perifornical (LH/PFA) e locus coeruleus (LC) na resposta ventilatória à hipercapnia em ratos durante o sono e vigília

Botucatu

2020

LAÍSA TAÍS CABRAL RODRIGUES XAVIER
Licenciada/Bacharela em Ciências Biológicas

Participação do Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) no hipotálamo lateral/área perifornical (LH/PFA) e locus coeruleus (LC) na resposta ventilatória à hipercapnia em ratos durante o sono e vigília

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, para obtenção do título de Mestre pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mirela Barros Dias

BOTUCATU

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO
CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Laísa Taís Cabral Rodrigues Xavier, realizada em 25/11/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Mirela Barros Dias (UNESP)

Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva (UFMG)

Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhao (UNESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Agradecimentos:

Agradeço a Deus por estar presente no meu dia a dia, me dando forças e coragem para vencer os desafios que encontrei durante essa caminhada.

Agradeço à minha família por sempre estarem próximos a mim nos momentos difíceis, com palavras de encorajamento e abraços reconfortantes. Agradeço ao meu marido Jean, aos meus pais Claudia e Moyses, ao meu irmão João Lucas e minha prima Drieli, por ouvirem meus desabafos sobre os desafios diários da vida de cientista e me apoiarem emocionalmente e financeiramente quando foi necessário, minha gratidão e amor é incondicional.

Agradeço à minha orientadora, professora Mirela por ser um ponto de apoio, estar sempre disposta a tirar minhas dúvidas e resolver os problemas que surgiram durante o mestrado, por vezes estava desanimada e foram as suas palavras que não me deixaram desistir. É sem dúvidas uma referência profissional e pessoal para mim, sempre tão dedicada ao trabalho, mas também à vida familiar, o que para mim é muito importante.

Agradeço aos meus amigos Eliandra, Bruno, Marcelo, Yumi e Stefany por promover os nossos encontros da tarde e me apoiarem quando tudo parecia estar dando errado, vocês recarregaram minhas energias e me ajudaram a continuar.

Agradeço a minha amiga Giovanna pois sempre esteve presente me escutando e me estimulando com palavras encorajadoras.

Agradeço aos meus amigos da UNESP de Araraquara, pois me acolheram no momento em que mais precisei, me dando o apoio necessário para cursar o primeiro semestre do mestrado.

Agradeço ao técnico de laboratório do Departamento de Fisiologia da UNESP de Araraquara, Silas Pereira Barbosa, por fornecer as informações necessárias para que eu pudesse realizar as cirurgias estereotáxicas bilaterais.

Agradeço aos meus amigos da UNESP de Jaboticabal, pois me ajudaram tirando minhas dúvidas e me receberam com todo o carisma e cumplicidade, pude desfrutar de momentos altamente divertidos e cheios de conhecimento durante as disciplinas.

Agradeço ao programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e à FAPESP (processo nº. 2018/01781-0), por fornecerem bolsas de

mestrado, recurso financeiro que me permitiu cursar as disciplinas, participar de eventos científicos e executar todas as etapas do projeto de mestrado.

Agradeço aos representantes e servidores técnicos do Departamento de Fisiologia (Laboratório do Controle da Ventilação) pela infraestrutura e colaboração que permitiram a realização deste projeto de pesquisa em todas as suas etapas.

Agradeço ao Profº Dr. Rodrigo Egydio Barreto, pois contribuiu grandemente com as análises estatísticas.

Agradeço à Banca Examinadora de Qualificação composta pelos professores: Carlos Cesar Crestani, Luciane Helena Gargaglioni Batalhão e Wladimir Beck, por todas as sugestões e questionamentos que foram fundamentais para a conclusão desse trabalho de dissertação.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca”.

(Paulo Freire)

RODRIGUES, Laísa Taís Cabral. Participação do Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) no hipotálamo lateral/área perifornical (LH/PFA) e locus coeruleus (LC) na resposta ventilatória à hipercapnia em ratos durante o sono e vigília. 2020. 55 pp. Dissertação para obtenção do título de Mestre pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu. Botucatu.

RESUMO:

O Hormônio Concentrador de Melanina (MCH), é um neuropeptídeo produzido por neurônios localizados em algumas áreas do SNC, incluindo o hipotálamo lateral/área perifornical (LH/PFA). Evidências sugerem a participação de MCH na modulação do quimiorreflexo hipercápnico central, mas os mecanismos envolvidos não foram investigados até o momento. Dessa forma, avaliamos se o MCH modula o quimiorreflexo central atuando no LH/PFA e/ou no locus coeruleus (LC). Para isso, foram realizadas microinjeções de MCH [0.4 mM] no LH/PFA e LC, bem como microinjeções do antagonista MCH1-R, SNAP-94847 [63 mM], no LH/PFA em ratos Wistar não-anestesiados, sendo avaliadas as alterações na ventilação pulmonar, por meio de pletismografia de corpo inteiro, na temperatura corporal e no EEG/EMG em ar ambiente e em 7% CO₂ durante a vigília e o sono, nas fases clara e escura. MCH intra-LH/PFA causou uma diminuição da resposta ventilatória ao CO₂ durante a vigília e sono, na fase clara, mas não na fase escura, bem como o SNAP-94847 intra-LH/PFA causou um aumento da resposta ventilatória ao CO₂ durante a vigília na fase clara. No LC, o MCH não alterou a resposta ventilatória hipercápnica dos animais. Nossos resultados sugerem que o MCH via MCH1-R no LH/PFA, mas não no LC, exerce uma modulação inibitória da ventilação hipercápnica durante a fase clara.

Palavras chave: Quimiorrecepção central. Hipercapnia. MCH. Microinjeção central. Ventilação pulmonar.

RODRIGUES, Laísa Taís Cabral. Participation of melanin-concentrating hormone (MCH) in the lateral hypothalamus/perifornical area (LH/PFA) and locus coeruleus (LC) in the ventilatory response to hypercapnia in rats during sleep and wakefulness. 2020. 55 pp. Dissertation to obtain the title of master by the Interinstitutional Graduate Program in Physiological Sciences, UFSCar/UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu. Botucatu.

ABSTRACT:

The melanin-concentrating hormone (MCH), a neuropeptide produced by neurons of a few areas in the CNS including the lateral hypothalamus/perifornical area (LH/PFA), has been implicated in the central hypercapnic chemoreflex, but the mechanisms involved have not been studied yet. Here, we evaluated whether MCH modulates the central chemoreflex acting in the LH/PFA and/or in the locus coeruleus (LC). For this, unanesthetized Wistar rats were microinjected with MCH [0.4 mM] into the LH/PFA and LC, and the MCH1-R antagonist SNAP-94847 [63 mM], into the LH/PFA, while the pulmonary ventilation was evaluated in room air and 7% CO₂ together with body temperature, EEG and EMG, during wakefulness and sleep, in the dark and light periods. MCH intra-LH/PFA caused a decreased CO₂ ventilatory response during wakefulness and sleep, in the light, but not in the dark period while SNAP-94847 intra-LH/PFA caused an increased CO₂ ventilatory response during wakefulness in the light period. In the LC, MCH caused no change in the hypercapnic ventilatory response of rats. Our results suggest that MCH via MCH1-R in the LH/PFA, but not in the LC, exerts an inhibitory modulation of the hypercapnic ventilatory during the light-inactive period.

Keywords: Central chemoreception. Hypercapnia. MCH. Central microinjection. Pulmonary ventilation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3V:** Terceiro ventrículo
4V: Quarto ventrículo
7% CO₂: Hipercapnia
aCSF: Líquido cerebrospinal artificial
AP: Anteroposterior
ASIC: Canais de íons com detecção de ácido
cAMP: Adenilato ciclase
CO₂: Gás carbônico
DMSO: Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DV: Dorso-ventral
EEG: Eletrodo de eletroencefalograma
EMG: Eletrodo de eletromiograma
fR: Frequência respiratória
GPCR: Receptores acoplados à proteína G
H⁺: Hidrogênio
Kir3: Canais de K⁺ da família GIRK
L: Lateral
LC: locus coeruleus
LH: hipotálamo lateral
PFA: área perifornical
MAP: Proteína quinase ativada por mitogênio
MAPK: Subfamília de proteínas-quinase
MCH: Hormônio concentrador de melanina
MCH1-R: Receptor MCH-1
MCH2-R: Receptor MCH-2
MCHRI: gene do receptor MCH
mM: Milimolar
N₂: Nitrogênio
NEI: Ácido glutâmico-isoleucina
NGE: Ácido glutâmico-glicina
NREM: Movimento não rápido dos olhos
O₂: Oxigênio

OX: Neurônios orexinérgicos

pMCH: prepro-MCH (molécula precursora de MCH)

PMCH: gene MCH

REM: Movimento rápido dos olhos

RTN: núcleo retrotrapezóide

SNAP-94847: Antagonista dos MCH1-R

SNC: Sistema nervoso central

Tc: Temperatura corporal

V_T: Volume corrente

\dot{V}_E : Ventilação

ZI: zona incerta

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Representação esquemática do gene PMCH e do neuropeptídeo MCH codificado.....	15
Figura 2: Representação esquemática de um receptor MCH1.....	16
Figura 3: Esquema da distribuição dos neurônios MCH em um corte sagital de encéfalo de rato.....	17
Figura 4: Desenho esquemático de um animal posicionado no aparelho esterotáxico.....	21
Figura 5: Desenho esquemático do sistema de pletismografia de corpo inteiro com registro contínuo de EEG, EMG, temperatura e ventilação pulmonar do animal.....	23
Figura 6: Diagrama esquemático da sequência temporal de eventos experimental.....	25
Figura 7: Trecho representativo de um dos experimentos mostrando o registro de pressão inspiratória EMG e EEG durante a vigília (A) e sono NREM (B) em normocapnia.....	27
Figura 8: Localização anatômica da microinjeção.....	29
Figura 9: Efeito da microinjeção de MCH ou solução veículo intra-LH/PFA no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar (\dot{V}_E) de ratos expostos a normocapnia e hipercapnia (7% CO ₂) durante a vigília (A) e o sono NREM (B) na fase clara.....	31
Figura 10: Efeito da microinjeção de MCH ou veículo intra-LH/PFA no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar (\dot{V}_E) de ratos expostos a normocapnia e hipercapnia (7% CO ₂) durante a vigília (A) e o sono NREM (B) durante a fase escura.....	33
Figura 11: Efeito da microinjeção de MCH ou veículo intra-LH/PFA no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar (\dot{V}_E) de ratos expostos a normocapnia durante a vigília (A) e o sono NREM (B) durante a fase clara.....	35
Figura 12: Efeito da microinjeção de SNAP-94847 ou solução veículo intra-LH/PFA no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de ratos expostos à hipercapnia (7% CO ₂) durante a vigília (A) e o sono NREM (B) durante a fase clara.....	37
Figura 13: Efeito da microinjeção de MCH ou solução veículo intra-LC no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de ratos expostos à hipercapnia (7% CO ₂) durante a vigília (A) e o sono NREM (B) durante a fase clara.....	39
Figura 14: Efeito da microinjeção de MCH ou solução veículo intra-LC no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de ratos expostos a condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO ₂) durante a vigília (A) e o sono NREM (B) durante a fase escura.....	41
Figura 15: Efeito da microinjeção de MCH ou veículo intra-LH/PFA na temperatura corporal de ratos não-anestesiados em condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO ₂) na fase clara e escura.....	42
Figura 16: Efeito da microinjeção de MCH ou veículo intra-LH/PFA na temperatura corporal de ratos não-anestesiados em condições normocápnicas na fase clara.....	43
Figura 17: Efeito da microinjeção de SNAP-94847 ou veículo intra-LH/PFA na temperatura corporal de ratos não-anestesiados em condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO ₂) na fase clara.....	43
Figura 18: Efeito da microinjeção de MCH ou veículo intra-LC na temperatura corporal de ratos não-anestesiados em ar ambiente ou em hipercapnia a 7% CO ₂ na fase clara e escura.....	44
Figura 19: Ilustração esquemática de um suposto mecanismo da sinalização de MCH no LH/PFA, na modulação do quimiorreflexo hipercápnico.....	47

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: PORCENTAGEM DE TEMPO EM VIGÍLIA E SONO-NREM.....28

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO:	14
2. MATERIAL E MÉTODOS:	19
2.1. <i>Animais:</i>	19
2.2. <i>Procedimento cirúrgico:</i>	19
2.3. <i>Microinjeção:</i>	21
2.4. <i>Medida de ventilação pulmonar:</i>	22
2.5. <i>Medida da temperatura corporal (Tc):</i>	23
2.6. <i>Registro do eletroencefalograma e eletromiograma:</i>	23
2.7. <i>Histologia:</i>	24
2.8. <i>Análise estatística:</i>	24
2.9. <i>Protocolos experimentais:</i>	25
2.9.1. <i>Efeito da microinjeção de MCH intra-LH/PFA na ventilação em normocapnia e hipercapnia em ratos durante a vigília e o sono, na fase clara e escura.</i>	25
2.9.2. <i>Efeito da microinjeção de MCH intra-LH/PFA na ventilação em normocapnia em ratos durante a vigília e o sono, na fase clara.</i>	25
2.9.3. <i>Efeito da microinjeção de SNAP-94847 intra-LH/PFA na ventilação em normocapnia e hipercapnia em ratos durante a vigília e o sono, na fase clara.</i>	26
2.9.4. <i>Efeito da microinjeção de MCH intra-LC na ventilação em normocapnia e hipercapnia em ratos durante a vigília e o sono, na fase clara e escura.</i>	26
3. RESULTADOS:	26
3.1. <i>Sono e vigília:</i>	26
3.2. <i>Histologia:</i>	28
3.3. <i>Efeito da microinjeção intra-LH/PFA de MCH ou veículo resposta ventilatória à hipercapnia, em ratos durante a vigília e o sono na fase clara e escura.</i>	30
3.4. <i>Efeito da microinjeção intra-LH/PFA de MCH ou veículo na respiração basal, em ratos durante a vigília e o sono na fase clara.</i>	34
3.5. <i>Efeito da microinjeção intra-LH/PFA de SNAP-94847 (antagonista dos MCH1-R) ou veículo na resposta ventilatória à hipercapnia, em ratos durante a vigília e o sono na fase clara.</i>	36
3.6. <i>Efeito da microinjeção intra-LC de MCH ou veículo na resposta ventilatória à hipercapnia, em ratos durante a vigília e o sono na fase clara e escura.</i>	38
3.7. <i>Temperaturas da câmara e do ambiente:</i>	42
3.8. <i>Temperatura corporal (Tc):</i>	42
4. DISCUSSÃO:	44
4.1. <i>MCH e o quimiorreflexo central:</i>	45
4.2. <i>MCH e os ciclos sono-vigília e claro e escuro:</i>	49
4.3. <i>MCH e a termorregulação:</i>	49
5. CONCLUSÃO:	50
6. REFERÊNCIAS:	50
ANEXO - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO ANIMAL (CEUA)	55

1. INTRODUÇÃO:

A modulação da respiração em mamíferos tem papel fundamental na regulação do equilíbrio ácido-base, uma vez que o CO₂ produzido metabolicamente e intimamente relacionado aos níveis de H⁺ no organismo, pode ser removido por meio da ventilação pulmonar. Essa modulação é realizada por células quimiossensíveis que são capazes de detectar alterações nos níveis de CO₂/pH e estimular respostas ventilatórias afim de que esses parâmetros sejam mantidos em níveis adequados. Essas células quimiossensíveis foram identificadas tanto periféricamente, células glômicas do corpo carotídeo (quimiorreceptores periféricos) quanto no SNC.

Quimiorreceptores centrais têm sido identificados em múltiplas regiões do SNC e parecem compreender tanto neurônios quanto astrócitos (NATTIE E LI, 2012). A ativação dos quimiorreceptores centrais pela elevação de CO₂ e/ou diminuição de pH no SNC desencadeia aumento na ventilação pulmonar. Estudos demonstram que essas células possuem propriedades de membranas diferenciadas das demais, pois expressam canais iônicos sensíveis a ácido (ASIC). De fato, foi demonstrado na região do hipotálamo lateral/área perifornical (LH/PFA), que neurônios orexinérgicos (OX) expressam canais ASIC1 (SONG et al, 2012). Essa região tem sido apontada como um sítio quimiorreceptor (DIAS et al, 2010; DA SILVA et al, 2018; RODRIGUES et al, 2019) e essa propriedade parece ser atribuída aos neurônios OX, que são encontrados exclusivamente nessa região hipotalâmica (PEYRON et al. 1998).

Nesse sentido, foi demonstrado que a acidificação local do LH/PFA em ratos resulta em hiperventilação durante a vigília, especialmente na fase escura do ciclo claro/escuro (LI et al., 2013). Além disso, de acordo com estudos *in vitro* e *in vivo* os neurônios OX são sensíveis à alterações de CO₂/pH (WILLIAMS et al, 2007; LI et al, 2016) e camundongos *knockout* para prepro-orexina (precursor das orexinas) demonstraram uma diminuição de 50% na resposta ventilatória ao CO₂ durante a vigília, mas não durante o sono (DENG et al., 2007), o que sugere um papel fundamental dos neurônios orexinérgicos na função quimiossensível do LH/PFA.

Apesar da atividade quimiossensível do LH/PFA ser atribuída primariamente aos neurônios orexinérgicos, foi demonstrado que neurônios de outra identidade neuroquímica presentes nessa região, os neurônios MCHérgicos, modulam a resposta ventilatória hipercápica. O Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) é um neuropeptídeo que em mamíferos, é composto por 19 aminoácidos, e é sintetizado a partir de uma molécula precursora, a prepro-MCH (pMCH) (VAUGHAN et al, 1989). A síntese de MCH se inicia a partir de um

único gene, o PMCH, notavelmente conservado entre os mamíferos e que codifica a pMCH, originando três neuropeptídeos: o ácido glutâmico-glicina (NGE), o ácido glutâmico-isoleucina (NEI) e o MCH (DINIZ E BITTENCOURT, 2019).

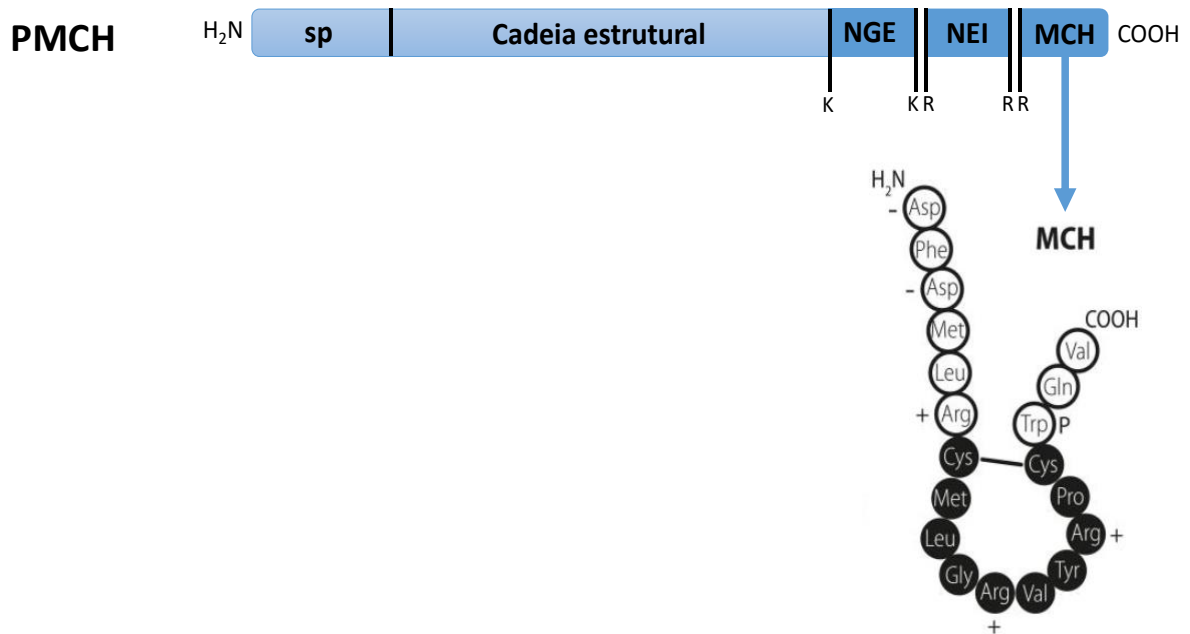


Figura 1: Representação esquemática do gene PMCH e do neuropeptídeo MCH codificado. O primeiro exon do gene PMCH corresponde ao peptídeo sinal (sp) e a primeira parte da cadeia estrutural da prepro-MCH (pMCH). O segundo e terceiro exon codificam o segmento restante da cadeia estrutural e os neuropeptídeos NGE, NEI e MCH (Adaptado de DINIZ E BITTENCOURT, 2019).

Os receptores MCH, são divididos em 2 tipos, o MCH1-R e MCH2-R, sendo que ambos são expressos em humanos, mas em roedores foi confirmada apenas a expressão do MCH1-R. (SAILER et al, 2001; MACNEIL, 2013). Em ratos, esse receptor é codificado pelo gene *MCHR1* (Gene ID: 83567) e a proteína resultante tem 353 aminoácidos de comprimento, formando uma estrutura caracterizada por sete domínios transmembranares, característica comum de receptores pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G (GPCR). Estudos mostraram que o MCH1-R pode se acoplar as proteínas Gi e Go e Gq, podendo causar a inibição da produção de cAMP, o aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular livre, estimular a proteína quinase ativada por mitogênio (MAP) e induzir a atividade da MAPK (CHUNG et al, 2009).

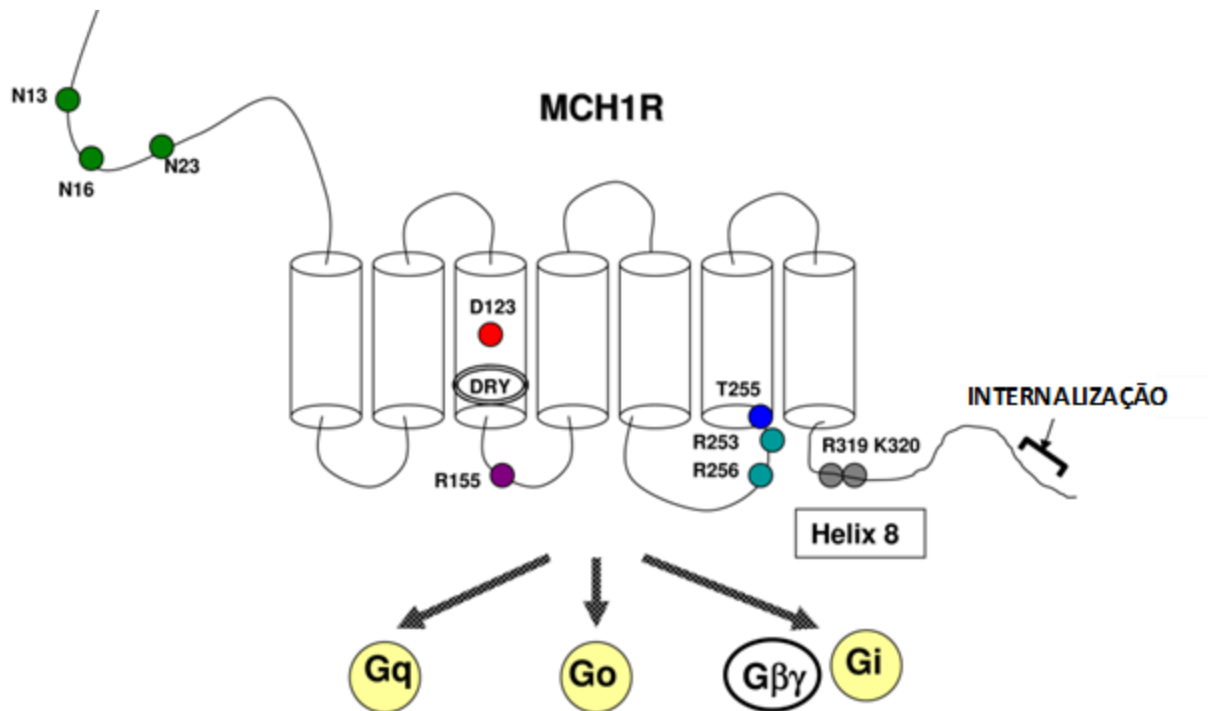


Figura 2: Representação esquemática de um receptor MCH1. Na imagem estão representados alguns locais importantes para o funcionamento do receptor MCH1-R. Os N13, N16 e N23 (círculos em verde) indicam o local de N-glicosilação, o D123 (círculo vermelho) indica um local importante para a ligação de MCH e ativação do receptor. O R155 (círculo roxo) regula a transdução de sinal. O T255 (círculo em azul) regula a expressão de MCH1-R na superfície celular, e o local DRY pode desempenhar papéis fundamentais no controle da conformação do receptor e no acoplamento da proteína G (Adaptado de CHUNG et al, 2009).

Os corpos celulares dos neurônios MCH estão localizados principalmente na região do LH/PFA e zona incerta (ZI) (ADAMANTIDIS E DE LECEA, 2008). Evidências demonstram que o MCH participa da modulação de uma série de funções em nosso organismo como da regulação da homeostase energética (MARSH et al, 2002) nas funções cardiovasculares (MESSINA E OVERTON, 2007), no balanço do ciclo sono e vigília (TORTEROLO et al 2011; TORTEROLO et al, 2015; ONO E YAMANAKA, 2017), no controle da ingestão alimentar e perda de peso (DELLA-ZUANA et al, 2002) e do controle da resposta ventilatória à hipercapnia (LI et al., 2014). Isso se deve principalmente pelas características de seus receptores MCH1-R que são acoplados as proteínas G, e estão amplamente distribuídos pelo SNC (MARSH et al, 2002; SAILER et al, 2001). Além disso, seus neurônios enviam projeções para diversas regiões do SNC, inclusive para regiões quimiossensíveis como o núcleo retrotapezóide (RTN) e locus coeruleus (LC) (PEYRON et al, 1998).

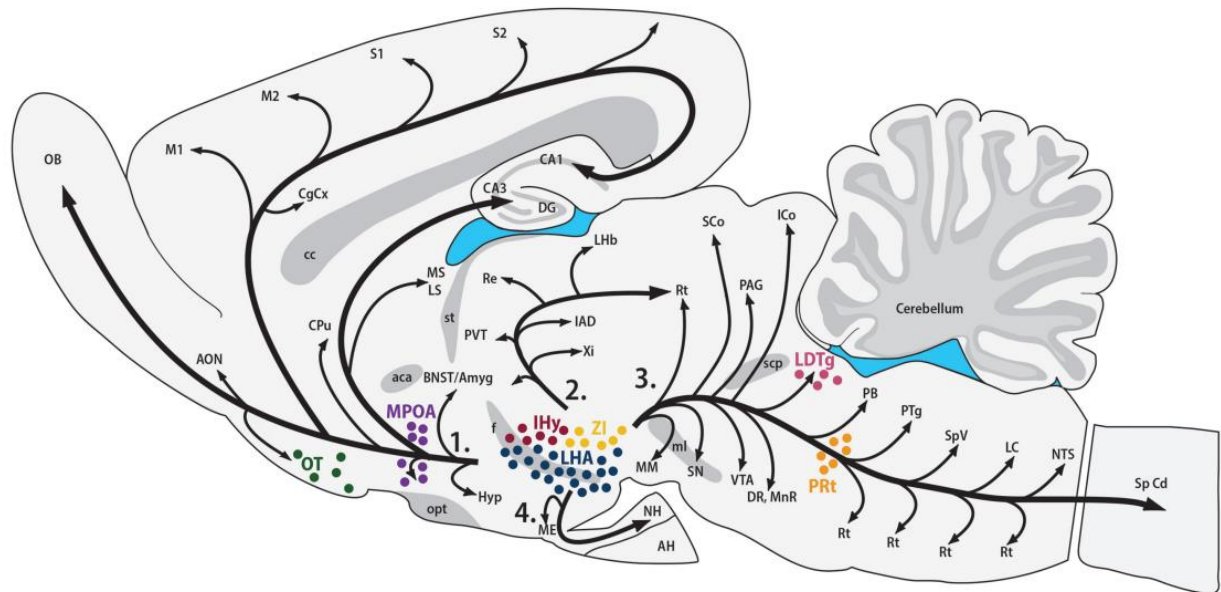


Figura 3: Esquema da distribuição dos neurônios MCH em um corte sagital de encéfalo de rato. Os círculos azuis, amarelos e vermelhos representam a localização dos neurônios que sintetizam o MCH, localizados no hipotálamo lateral (LHA), área hipotalâmica incerta (IHy) e zona incerta (ZI). As setas indicam as projeções dos neurônios MCH para diferentes áreas do SCN, destaque para as regiões que participam da quimiorrecepção central como o locus coeruleus (LC), núcleo do trato solitário (NTS), núcleo parabraquial (PB). (DINIZ E BITTENCOURT, 2017).

Quanto ao envolvimento dos neurônios MCHérgicos no controle respiratório, foi observado que o silenciamento gênico do precursor de MCH, pela técnica de RNA interferente causou um aumento da resposta ventilatória hipercápnica em ratos durante a vigília, mas não durante o sono (LI et al., 2014) o que sugere que o MCH age como um supressor da resposta ventilatória hipercápnica durante a vigília. Tal ação é oposta àquela dos neurônios orexinérgicos. De fato, segundo a literatura, neurônios MCHérgicos e orexinérgicos estabelecem relações sinápticas recíprocas, mas enquanto as orexinas são neuropeptídeos predominantemente excitatórios (BURDAKOV et al., 2013), o MCH é um neuropeptídeo inibitório (VAN DEN POL et al., 2004; WU et al., 2009). Como resultado, neurônios orexinérgicos e MCHérgicos são antagonistas em muitas de suas ações fisiológicas, inclusive no controle respiratório. No entanto, o mecanismo pelo qual o MCH modula o quimiorreflexo central não foi, até o momento, elucidado. A principal hipótese é de que seu efeito inibitório modula a atividade de neurônios quimiossensíveis que expressam MCH1-R, o que poderia ser tanto localmente, no LH/PFA, onde já foi confirmada a expressão de MCH1-R (LEMBO et al., 1999) e é onde ocorrem interações sinápticas com os neurônios OX (GUAN et al, 2002), quanto à distância, agindo em outras regiões quimiossensíveis para os quais esses neurônios se projetam.

Dentre os núcleos quimiossensíveis, o LC pode ser eleito como possível alvo dos neurônios MCH na modulação do quimiorreflexo central, uma vez que os neurônios dessa região recebem densas projeções dos neurônios MCH (YOON E LEE, 2013a; YOON E LEE, 2013b), expressam os MCH1-R (LEMBO et al, 1999; SAITO et al, 2001; YE et al, 2018) e os neurônios noradrenérgicos dessa região são quimiossensíveis (BIANCARDI et al, 2008; GARGAGLIONI et al, 2010). Além disso, como os neurônios MCH, os neurônios noradrenérgicos do LC também participam da regulação do ciclo sono-vigília (ASTON-JONES E BLOOM, 1981; BERRIDGE E WATERHOUSE, 2003; BERRIDGE et al, 2012).

Em relação ao ciclo sono-vigília e claro-escuro, sabe-se que os neurônios MCHérgicos atuam promovendo o sono, especialmente o sono REM. Em um estudo de HASSANI e colegas (2009), o registro da taxa de disparo dos neurônios MCHérgicos durante o ciclo de sono e vigília de ratos revelou que os neurônios MCH disparam durante o sono, mas não durante a vigília. Sugere-se que o papel dos neurônios MCHérgicos na indução do sono pode ser devido ao efeito inibitório do MCH nos neurônios orexinérgicos, os quais são reconhecidamente promotores da vigília. (LI et al, 2014; SAKURAI et al., 2010; TORTEROLO et al, 2011). Dessa forma, a interação dos neurônios MCHérgicos com os orexinérgicos parece contribuir para regulação do ciclo sono-vigília, e sua atividade parece ser dependente ciclo circadiano. (ONO E YAMANAKA, 2017).

Segundo estudos anteriores, tanto o LH/PFA quanto o LC estão envolvidos na termorregulação (TAKAHASHI et al, 2001; RAVANELLI E BRANCO, 2008; MORRISON, 2017). Considerando a participação dos neurônios MCHérgicos no balanço energético, tem sido demonstrado que a perda da sinalização de MCH em camundongos *knockout* para MCH resulta em aumento da temperatura corporal, do consumo de oxigênio, da frequência cardíaca e da pressão arterial média (TAKASE et al, 2014). Além disso, foi demonstrado que camundongos sem a expressão dos MCH1-R apresentam uma temperatura corporal basal média aumentada, principalmente durante a fase clara (AHNAOU et al, 2011), sugerindo que o neuropeptídeo MCH pode participar da regulação da temperatura corporal, no entanto até o momento não há estudos relacionados com a participação do MCH no controle da temperatura corporal durante a hipercapnia.

Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi avaliar o possível papel do MCH, atuando no LH/PFA e no LC, na modulação da resposta ventilatória hipercápnic e do controle da temperatura corporal durante a hipercapnia, via receptores MCH1-R. Para tanto foi investigado o efeito da microinjeção de MCH intra-LH/PFA e intra-LC e do antagonista MCH1-R (SNAP-

94847) intra-LH/PFA na resposta ventilatória hipercápica e na temperatura corporal em diferentes fases do ciclo sono-vigília durante as fases clara e escura do ciclo diurno de ratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

2.1. Animais:

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 270-350g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Unesp campus de Botucatu, e mantidos em caixas com no máximo 5 animais até a realização do procedimento cirúrgico, em ambiente com temperatura controlada (23 °C) e com oferta de ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos entre o biotério do ciclo parcialmente invertido onde as luzes eram acesas as 15hrs e apagadas as 3hrs e o biotério do ciclo regular onde as luzes eram acesas as 7hrs e apagadas as 19hrs. Com isso, ambos os grupos foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12hrs. Todos os experimentos foram realizados entre 9-15hrs. Os animais do ciclo invertido tiveram um processo de adaptação de no mínimo 2 semanas, para auxiliar a visão do experimentador foi utilizado uma luz vermelha durante os procedimentos realizados no biotério e experimentos do ciclo parcialmente invertido. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – IBB, UNESP, Botucatu, SP; protocolo nº 1104-CEUA).

2.2. Procedimento cirúrgico:

Durante o procedimento cirúrgico foram realizados os implantes de um sensor de temperatura, eletrodos de eletroencefalograma (EEG), eletrodos de eletromiograma (EMG) e cânulas-guia direcionadas ao hipotálamo lateral/área perifornical (LH/PFA) bilateralmente e ao locus coeruleus (LC) unilateralmente. Para realização de tais procedimentos, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente). Em seguida foi feita a tricotomia do abdômen e da região dorsal da cabeça e a assepsia da pele com álcool iodado. Um sensor de temperatura (Subcue Datalogger, Calgary, Alberta, CA) foi introduzido na cavidade abdominal dos animais por meio de laparotomia mediana e, após sutura da musculatura e da pele abdominal, os ratos foram posicionados no aparelho estereotáxico, sendo a cabeça colocada na posição plana e fixada por meio de barras auriculares.

Após injeção subcutânea de um anestésico local com vasoconstritor (cloridrato de lidocaína e epinefrina) na região do escalpo a ser aberta, foi feita uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo-se a região da calota craniana, sendo possível ver as suturas que representam o bregma e o lambda. Dessa maneira foram anotados os parâmetros ântero-posteriores e laterais a partir do bregma e do lambda para marcar a localização dos eletrodos de eletroencefalograma (EEG), representados na figura 4. Foram feitos pequenos orifícios na calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica, para implante de eletrodos corticais para registro de EEG. Foram introduzidos três eletrodos de EEG: o eletrodo frontal localizado a 2 mm anterior ao bregma e 2 mm lateral à linha média, o eletrodo parietal a 4 mm anterior ao lambda e 2 mm lateral à linha média, e o eletrodo “terra” que foi inserido entre os eletrodos frontal e parietal. Para o registro do eletromiograma (EMG), foi inserido um par de eletrodos profundamente na musculatura do pescoço dos ratos, sendo que os fios desses eletrodos foram direcionados, subcutaneamente, até a cabeça para que, juntamente com os eletrodos de EEG, fossem acoplados à um dispositivo plástico que serviu de soquete para o posicionamento dos eletrodos (Plastic One Inc.).

Em seguida foram anotados os parâmetros ântero-posteriores, dorso-ventrais e laterais a partir do bregma e lambda para determinação dos pontos de introdução das cânulas-guia, em direção ao LH/PFA bilateralmente ou ao LC unilateralmente. Assim, foram feitos os orifícios na calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação, e por esses orifícios foram introduzidas as cânulas, cuja extremidade inferior ficou localizada cerca de 1 mm acima da superfície das regiões desejadas. As coordenadas que foram utilizadas para a inserção das cânulas foram baseadas em estudos anteriores e de acordo com o atlas de PAXINOS & WATSON (2014): AP= -2,7 mm a partir do bregma, L= -1,2 mm da linha média, DV= -7,4 mm ventral à superfície do osso para as cirurgias direcionadas ao LH/PFA e AP= -3,4 mm a partir do lambda, L= -1,2 mm da linha média, DV= -6,0 mm ventral à superfície do osso para as cirurgias direcionadas ao LC.

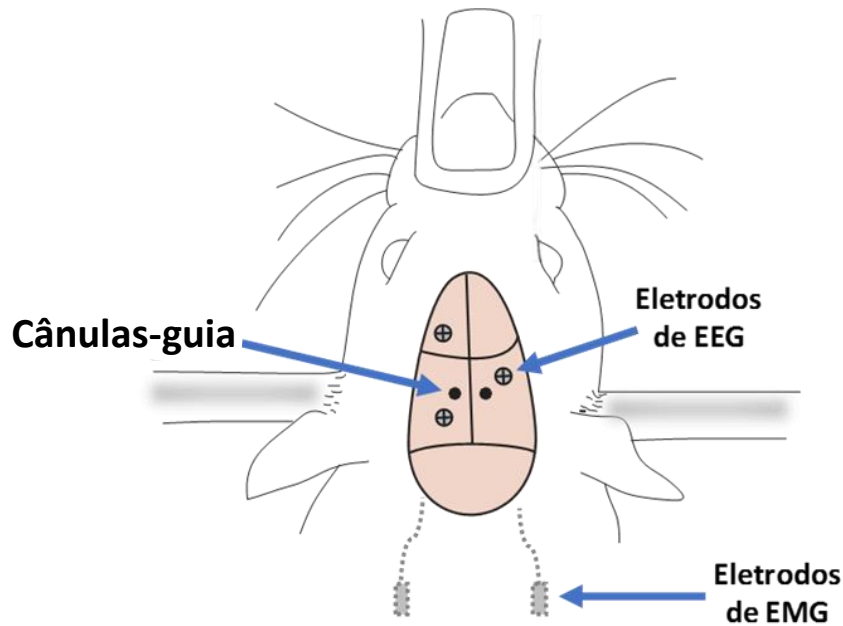


Figura 4: Desenho esquemático de um animal posicionado no aparelho esterotáxico, mostrando o posicionamento dos eletrodos de eletromiograma (EMG) e eletroencefalograma (EEG) e cânulas-guia bilateralmente direcionadas ao LH/PFA.

As cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica de uso odontológico e ancoradas pelos parafusos dos eletrodos de EEG, previamente introduzidos na calota craniana. Após completa fixação da cânula, a torre do estereotáxico foi removida. Como medida profilática pós-cirúrgica, o animal foi tratado com antibiótico (0,3 ml de benzilpenicilina, 1.200.000 U; via intramuscular) e analgésico (megluminato de flunixinina, 2,5 mg/kg; via subcutânea). Após esses procedimentos, os animais foram retirados do estereotáxico, colocados em caixas individuais com água e ração *ad libitum* e mantidos no biotério por um período de 7 dias. Após esse período, eles foram submetidos aos protocolos experimentais.

2.3. Microinjeção:

Foram realizadas microinjeções de MCH (hormônio concentrador de melanina; 0.4 mM; Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, EUA), ou do seu veículo (salina estéril), no LH/PFA bilateralmente e no LC unilateralmente, bem como do antagonista dos receptores MCH-1, SNAP-94847 (63 mM; Sigma, St Louis, MO, USA) ou de seu veículo (aCSF + 5% DMSO) no LH/PFA bilateralmente. Para a realização das microinjeções foi utilizada uma agulha gengival (28 gauge), conectada por meio de um tubo de polietileno (PE-10) à uma seringa Hamilton de 5 μ L (Hamilton, Reno, NV). O volume microinjetado foi de 100 η L, com a duração de aproximadamente de 30 segundos tanto

para o LH/PFA quando para LC. As doses utilizadas foram baseadas em estudos anteriores (BROWN et al., 2007; YE et al., 2018).

2.4. Medida de ventilação pulmonar:

As medidas de ventilação foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro, em um sistema fechado (JACKY, 1978). A figura 5 é uma representação esquemática do sistema de pletismografia de corpo inteiro. As oscilações de pressão causadas pela respiração do animal foram monitoradas por um transdutor de pressão, conectado à câmara. Os sinais coletados foram convertidos e digitalizados em um computador equipado com um programa para análise de dados. A conexão de entrada de ar foi conectada a um misturador de gases que permitiu o fluxo de ar normocápnico ou hipercápnico (7% CO₂, 21% O₂ e N₂ balanço) quando necessário de acordo com o protocolo experimental e a conexão de saída foi conectada à uma bomba a vácuo que garantiu a saída de ar em um fluxo de 2L/min, igual ao fluxo de entrada de ar. O fluxo de entrada e saída de gases na câmara pletismográfica foi equilibrado para prevenir uma condição hiper ou hipobárica dentro da câmara, e nos permitiu realizar o registro contínuo dos parâmetros ventilatórios, uma vez que o ar dentro da câmara foi continuamente renovado. A calibração do volume foi obtida injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1 mL) com o uso de uma seringa graduada. Variáveis respiratórias, como a frequência respiratória (fR), volume corrente (V_T) e ventilação (\dot{V}_E) foram estimadas por meio de um programa de análise de dados do software Prism 6. As medidas de ventilação foram realizadas continuamente durante 70 minutos a partir do início dos tratamentos, tanto na fase clara quanto escura e para cada fase, os momentos de sono NREM e de vigília foram separados e analisados em grupos distintos.

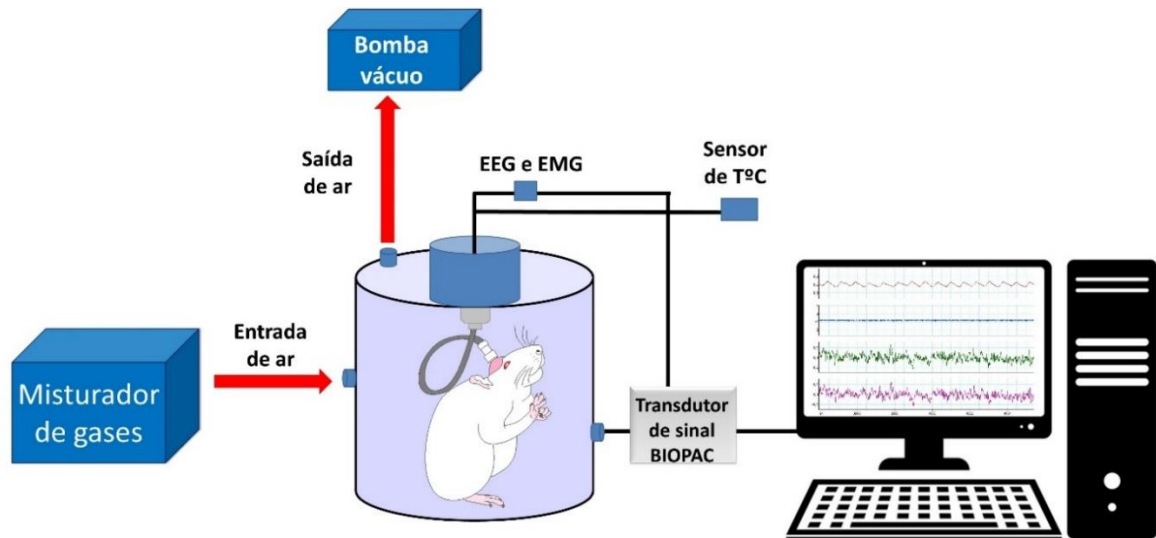


Figura 5: Desenho esquemático do sistema de pletorespirometria de corpo inteiro com registro contínuo de EEG, EMG, temperatura e ventilação pulmonar do animal.

2.5. Medida da temperatura corporal (T_c):

Durante os experimentos, T_c foi monitorada continuamente por meio de um sensor e registrador de temperatura integrado (SubCue, Calgary, Alberta, CA), implantado na cavidade abdominal dos ratos. Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os sensores de temperatura foram conectados a um computador, via conexão óptica e programados para a coleta de dados ao longo dos experimentos com leituras a cada 5 minutos. Para os procedimentos de programação dos sensores bem como para o acesso aos dados armazenados foi utilizado o programa “SubCue temperature datalogger software”. A temperatura ambiente e da câmara foram também mensuradas por meio de termosensores.

2.6. Registro do eletroencefalograma e eletromiograma:

Os sinais dos eletrodos de EEG e de EMG foram coletados em 150 hertz, filtrados em 0.3-50 e 0.1-100 hertz, respectivamente, e gravados diretamente em um computador. Assim, os dados de EEG e EMG obtidos em cada experimento foram qualificados pela fase do ciclo sono-vigília. Foram visualmente avaliados e separados em dois grupos: vigília caracterizado por ondas de EEG de baixa amplitude e alta frequência, com atividade muscular esquelética aumentada observada pelo aumento na amplitude do sinal de EMG e sono NREM caracterizado

por ondas de EEG de alta amplitude e baixa frequência, com atividade muscular esquelética diminuída.

2.7. Histologia:

Para verificar a localização do sítio de microinjeção, foram realizados procedimentos histológicos. Para isso, ao final dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados para realização do procedimento da perfusão transcardíaca, com 300 mL de solução salina seguida por 300 mL de solução fixadora filtrada composta por paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente. A perfusão foi realizada com o auxílio de uma bomba perfusora peristáltica (Masterflex®, Cole Parmer International, Vernon Hills, IL, EUA), ajustada a um fluxo de 30 mL/min. Em seguida, o encéfalo foi retirado e imerso em solução de paraformaldeído a 4%. No dia seguinte o encéfalo foi crioprotegido por imersão em uma solução de sacarose a 30% por pelo menos 72 hrs. Posteriormente, os encéfalos foram cortados no plano coronal em secções seriadas de 40 µm em um criostato (Reichert-Jung, Leica, Alemanha), em toda a extensão do LH/PFA ou LC, e montados em lâminas gelatinizadas. Os cortes obtidos foram então corados pelo método de Nissl com coloração com cresil violeta (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA). A análise microscópica da localização do sítio de microinjeção foi feita em microscópio óptico. Os sítios anatômicos de referência bem como os sítios de microinjeção foram identificados com o auxílio do atlas de PAXINOS & WATSON (2014).

2.8. Análise estatística:

Os valores são relatados como média \pm SEM. As variações nas respostas ventilatórias e de temperatura corporal à hipercapnia foram analisadas por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni para comparações post-hoc. Quanto às análises de sono-vigília, foi utilizada a análise de variância multivariada MANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls para comparações post-hoc. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando um programa de software (GraphPad Prism 6). Os gráficos de vigília são apresentados com a média dos dados coletados a cada 10 minutos ao longo de todo o experimento enquanto que os gráficos de sono são apresentados com a média antes e depois da microinjeção, isso se deve pelo fato de que períodos de vigília geralmente

ocorrem ao longo de todo experimento, enquanto que períodos de sono ocorrem apenas em alguns momentos.

2.9. Protocolos experimentais:

2.9.1. Efeito da microinjeção de MCH intra-LH/PFA na ventilação em normocapnia e hipercapnia em ratos durante a vigília e o sono, na fase clara e escura.

Os ratos foram colocados no interior da câmara pletismográfica ventilada com ar ambiente e, após a fase de aclimação (30-60 minutos), o registro dos parâmetros ventilatórios, EEG e EMG foi iniciado, antes da microinjeção, para obtenção dos parâmetros basais. Após 30 minutos, a agulha de microinjeção foi inserida na cânula-guia e a microinjeção bilateral de MCH ou salina estéril foi realizada no LH/PFA. Em seguida, todos os parâmetros foram registrados por mais 10 minutos em ar ambiente seguido por 30 minutos em hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂ e N₂ balanço), a seqüência temporal desses eventos estão representados na figura 6. Os dados de temperatura ambiente, da câmara e corporal (T_b) foram registrados durante todo o experimento. Com a posterior análise do registro de EEG/EMG, os dados foram separados em momentos de vigília e sono NREM.

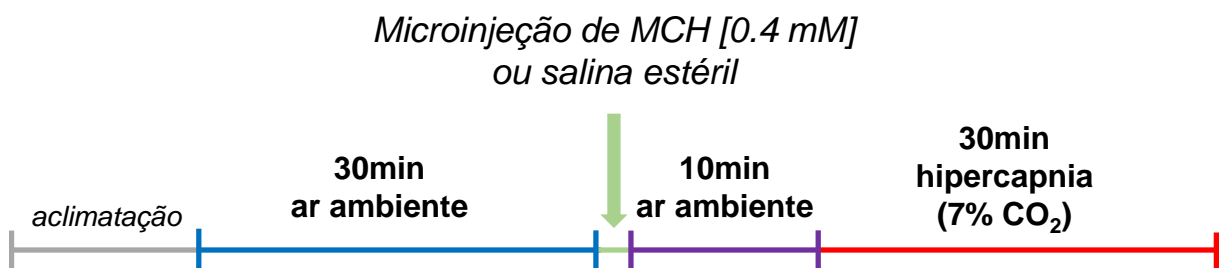


Figura 6: Diagrama esquemático da seqüência temporal de eventos experimental.

2.9.2. Efeito da microinjeção de MCH intra-LH/PFA na ventilação em normocapnia em ratos durante a vigília e o sono, na fase clara.

Todos os procedimentos experimentais deste protocolo foram realizados como descrito no protocolo 2.9.1, com exceção de que neste protocolo o registro de ventilação foi feito apenas em normocapnia.

2.9.3. Efeito da microinjeção de SNAP-94847 intra-LH/PFA na ventilação em normocapnia e hipercapnia em ratos durante a vigília e o sono, na fase clara.

Todos os procedimentos experimentais deste protocolo foram realizados como descrito no protocolo 2.9.1, com exceção de que neste protocolo foi realizado a microinjeção bilateral de SNAP-94847 no LH/PFA.

2.9.4. Efeito da microinjeção de MCH intra-LC na ventilação em normocapnia e hipercapnia em ratos durante a vigília e o sono, na fase clara e escura.

Todos os procedimentos experimentais deste protocolo foram realizados como descrito no protocolo 2.9.1, com exceção de que neste protocolo foi realizado a microinjeção unilateral no LC.

3. RESULTADOS:

3.1. Sono e vigília:

Na figura 7 está representado um trecho do registro de um animal representativo dos grupos mostrando as variações de pressão inspiratória (Pinsp), EMG e EEG durante a vigília (A) e o sono NREM (B). Como podemos observar, durante a vigília, o EEG é caracterizado por ondas de alta frequência e baixa amplitude (dessincronização). Durante o sono NREM, observamos diminuição da frequência das ondas cerebrais no EEG, predominando ondas de baixa frequência e alta amplitude.

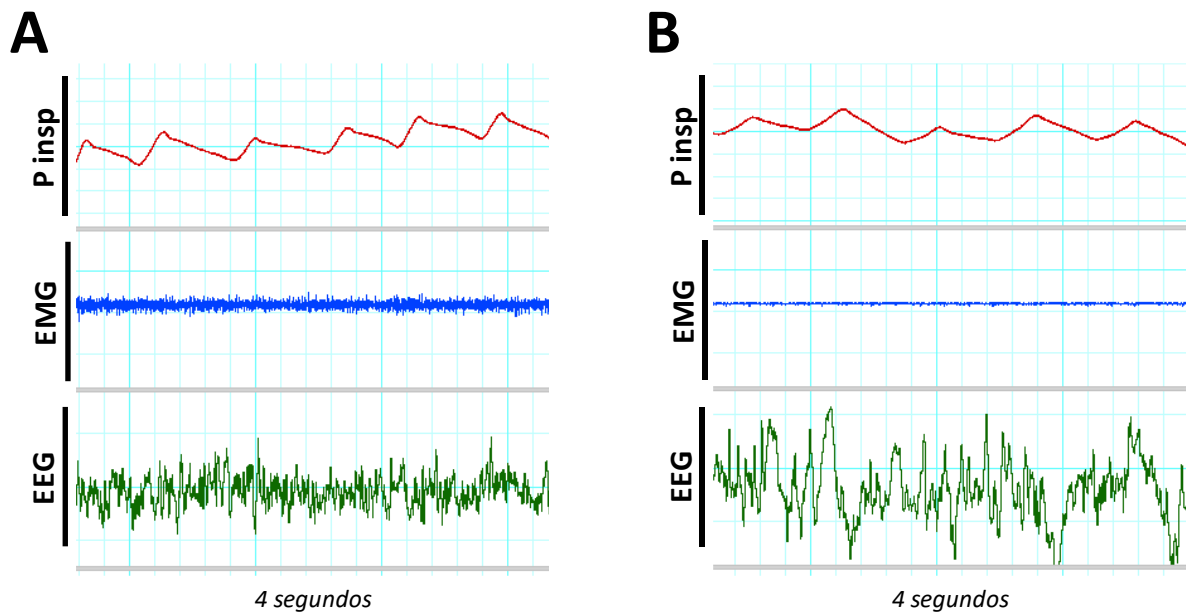


Figura 7: Trecho representativo de um dos experimentos mostrando o registro de pressão inspiratória EMG e EEG durante a vigília (A) e sono NREM (B) em normocapnia.

A Tabela 1 mostra o tempo (em porcentagem) em que os animais ficaram em vigília e sono NREM em ar ambiente e 7% de CO_2 , antes e após a microinjeção, durante a fase clara e escura do ciclo diurno dos animais. Os períodos de sono REM não foram comuns em nossos experimentos e, quando ocorreram, foram muito curtos. Portanto, os períodos durante o sono REM, ou quando o estado de sono era indeterminado, foram excluídos de nossa análise. Não houve interação nos dados dos grupos MCH intra-LC e SNAP-94847 intra-LH/PFA. Podemos observar que os animais que receberam microinjeções de MCH ou veículo intra-LH/PFA permaneceram predominante em vigília durante os 10 minutos após a microinjeção e permaneceram mais tempo em vigília durante a hipercapnia tanto na fase clara quanto escura. Além disso, tanto o grupo MCH quanto o salina permaneceram significativamente mais tempo em vigília no período de hipercapnia durante a fase escura comparado a fase clara.

Tabela 1: PORCENTAGEM DE TEMPO EM VIGÍLIA E SONO-NREM

		LH/PFA					
		SALINA			MCH		
		ar ambiente	ar ambiente após microinjeção	7% CO ₂	ar ambiente	ar ambiente após microinjeção	7% CO ₂
CLARO	vigília (%)	46,1 ± 0,1	100 * [#]	76,1 ± 0,1* [#]	48,4 ± 0,2	100 * [#]	64,7 ± 0,2 [#]
	sono (%)	53,9 ± 0,1	0 [#]	23,9 ± 0,1 [#]	51,6 ± 0,2	0 [#]	35,3 ± 0,2 [#]
ESCURO	vigília (%)	64,9 ± 0,2	100 * [#]	78,7 ± 0,2* ^{#+}	41,3 ± 0,2	100 * [#]	82,0 ± 0,1 [#]
	sono (%)	35,1 ± 0,2	0 [#]	21,3 ± 0,2 [#]	58,7 ± 0,2	0 [#]	18,0 ± 0,1 ^{#+}

		LH/PFA					
		aCSF + DMSO [5%]			SNAP - 94847		
		ar ambiente	ar ambiente após microinjeção	7% CO ₂	ar ambiente	ar ambiente após microinjeção	7% CO ₂
CLARO	vigília (%)	27,6 ± 0,1	100	75,4 ± 0,3	50,4 ± 0,2	100	74,4 ± 0,2
	sono (%)	72,4 ± 0,1	0	24,6 ± 0,3	49,6 ± 0,2	0	25,6 ± 0,2

		LC					
		SALINA			MCH		
		ar ambiente	ar ambiente após microinjeção	7% CO ₂	ar ambiente	ar ambiente após microinjeção	7% CO ₂
CLARO	vigília (%)	50,7 ± 0,3	40,9 ± 0,3	49,7 ± 0,2	37,2 ± 0,2	31,9 ± 0,2	37,7 ± 0,1
	sono (%)	49,3 ± 0,3	59,1 ± 0,3	50,3 ± 0,2	62,8 ± 0,2	68,1 ± 0,2	62,3 ± 0,1
ESCURO	vigília (%)	54,8 ± 0,1	66,3 ± 0,2	37,0 ± 0,1	53,0	68,5 ± 0,1	53,3 ± 0,1
	sono (%)	45,2 ± 0,1	33,7 ± 0,2	63,0 ± 0,1	47,0	31,5 ± 0,1	46,7 ± 0,1

Porcentagem de tempo em vigília e sono NREM em ar ambiente e 7% de CO₂ antes e após a microinjeção MCH intra-LH/PFA e intra-LC ou de SNAP-94847 intra-LH/PFA e as respectivas soluções veículos nos grupos da fase clara e escura. #*P* < 0.05, período pré-microinjeção *versus* período pós-microinjeção; **P* < 0.05, vigília *versus* sono; +*P* < 0.05, fase clara *versus* fase escura.

3.2. Histologia:

Na figura 8, vemos uma fotomicrografia de secção transversal de encéfalos de animais representativos dos grupos que foram submetidos à microinjeção bilateral de MCH no LH/PFA (A) ou unilateral no LC (B).

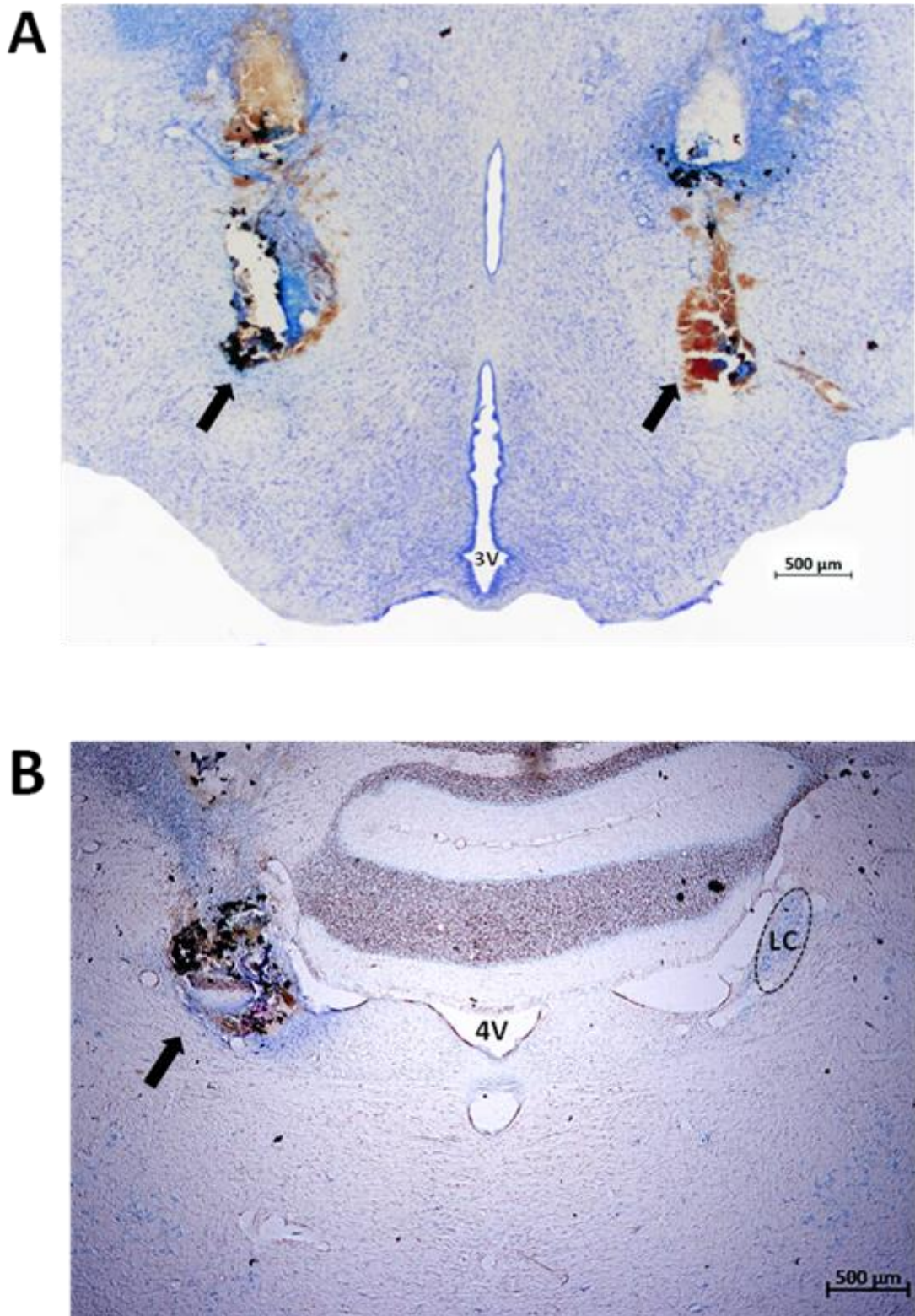


Figura 8: Localização anatômica da microinjeção. (A) Fotomicrografia de uma secção coronal do encéfalo de um rato representativo, mostrando um local típico de microinjeção no hipotálamo lateral/área perifornical (LH/PFA; seta preta). (B) Fotomicrografia de uma secção coronal do encéfalo de um rato representativo, mostrando um local típico de microinjeção no locus coeruleus (LC; seta preta). O círculo pontilhado indica o LC contralateral à região da microinjeção. 3V: terceiro ventrículo; 4V: quarto ventrículo.

3.3. Efeito da microinjeção intra-LH/PFA de MCH ou veículo resposta ventilatória à hipercapnia, em ratos durante a vigília e o sono na fase clara e escura.

Na figura 9, podemos observar os efeitos da microinjeção de MCH [0.4 mM] ou veículo no LH/PFA na resposta ventilatória à hipercapnia na fase clara. Como observado, o MCH intra-LH/PFA diminuiu a resposta ventilatória hipercápica em 24% durante a vigília ($\dot{V}E = 1923 \pm 145.1$; $n = 7$ versus 2543.4 ± 77.7 ml, $\text{kg}^{-1} \text{min}^{-1}$; $n = 05$) e 16% durante o sono ($\dot{V}E = 1914.3 \pm 93.5$; $n = 06$ versus 2272.7 ± 121.3 ml, $\text{kg}^{-1} \text{min}^{-1}$; $n = 04$) em comparação ao grupo controle ($P < 0.05$) na fase clara.

O efeito do MCH na ventilação pulmonar também foi avaliado em normocapnia, aos 10 minutos após a microinjeção, em vigília. No entanto, não foi encontrada diferença nos parâmetros ventilatórios entre o grupo tratado com MCH e o grupo controle, na fase clara.

FASE CLARA

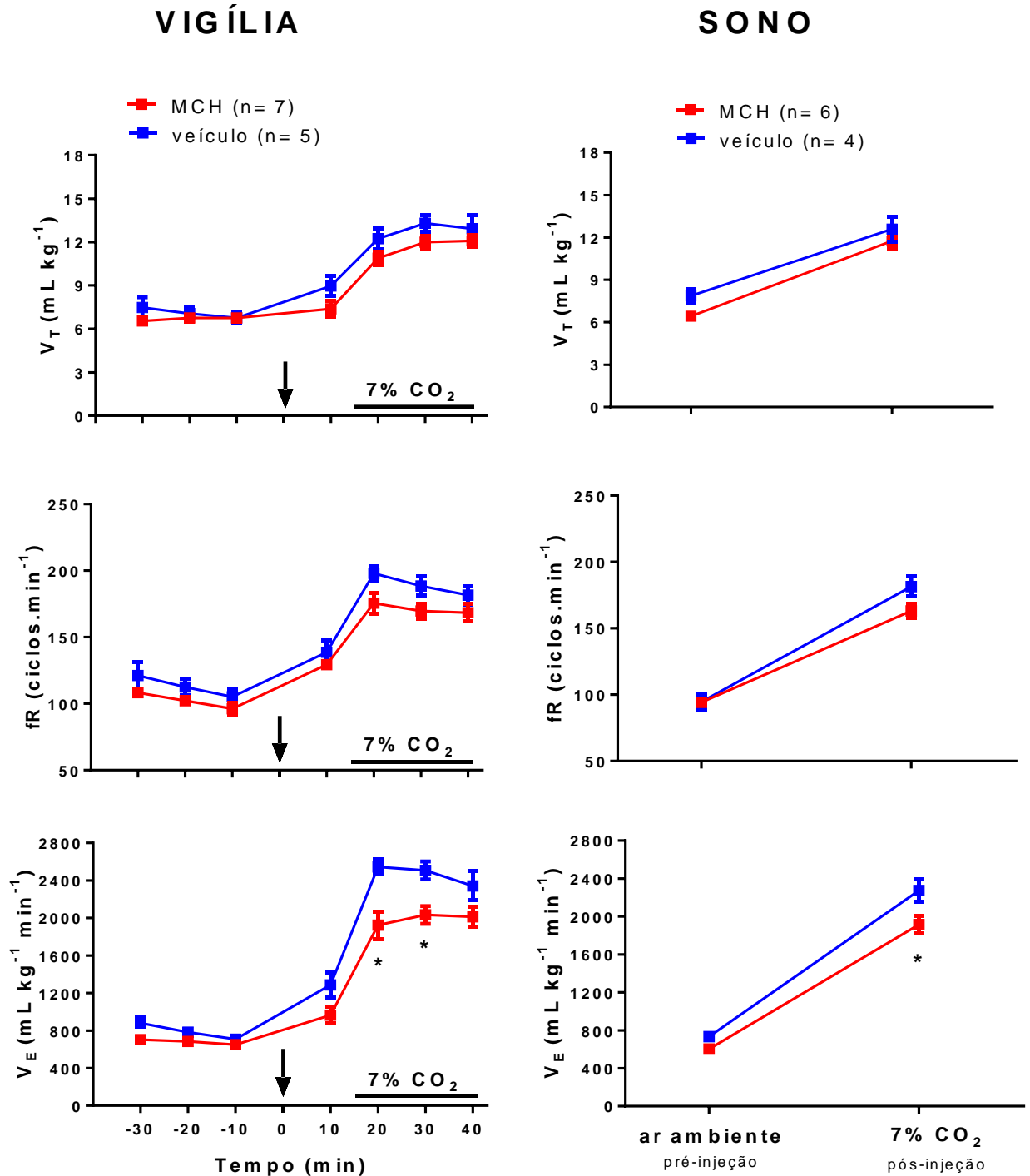


Figura 9: Efeito da microinjeção de MCH ou solução veículo intra-LH/PFA no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar (\dot{V}_E) de ratos expostos a normocapnia e hipercapnia (7% CO₂) durante a vigília (A) e o sono NREM (B) na fase clara. A seta indica o momento da microinjeção. A barra preta indica o período de hipercapnia. Os valores são expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0.05$, MCH versus salina estéril.

Na fase escura, como mostrado na figura 10, a microinjeção de MCH não alterou a ventilação basal ou a resposta ventilatória à hipercapnia durante a vigília ($\dot{V}_E = 2473.4 \pm 95.3$; $n = 6$ *versus* 2335.2 ± 188.1 ml, $\text{kg}^{-1} \text{min}^{-1}$; $n = 04$), bem como não modificou a resposta ventilatória hipercápica durante o sono ($\dot{V}_E = 2313 \pm 122.3$; $n = 3$ *versus* 2211.7 ± 186.2 ml, $\text{kg}^{-1} \text{min}^{-1}$; $n = 03$), comparado com o grupo controle.

FASE ESCURA

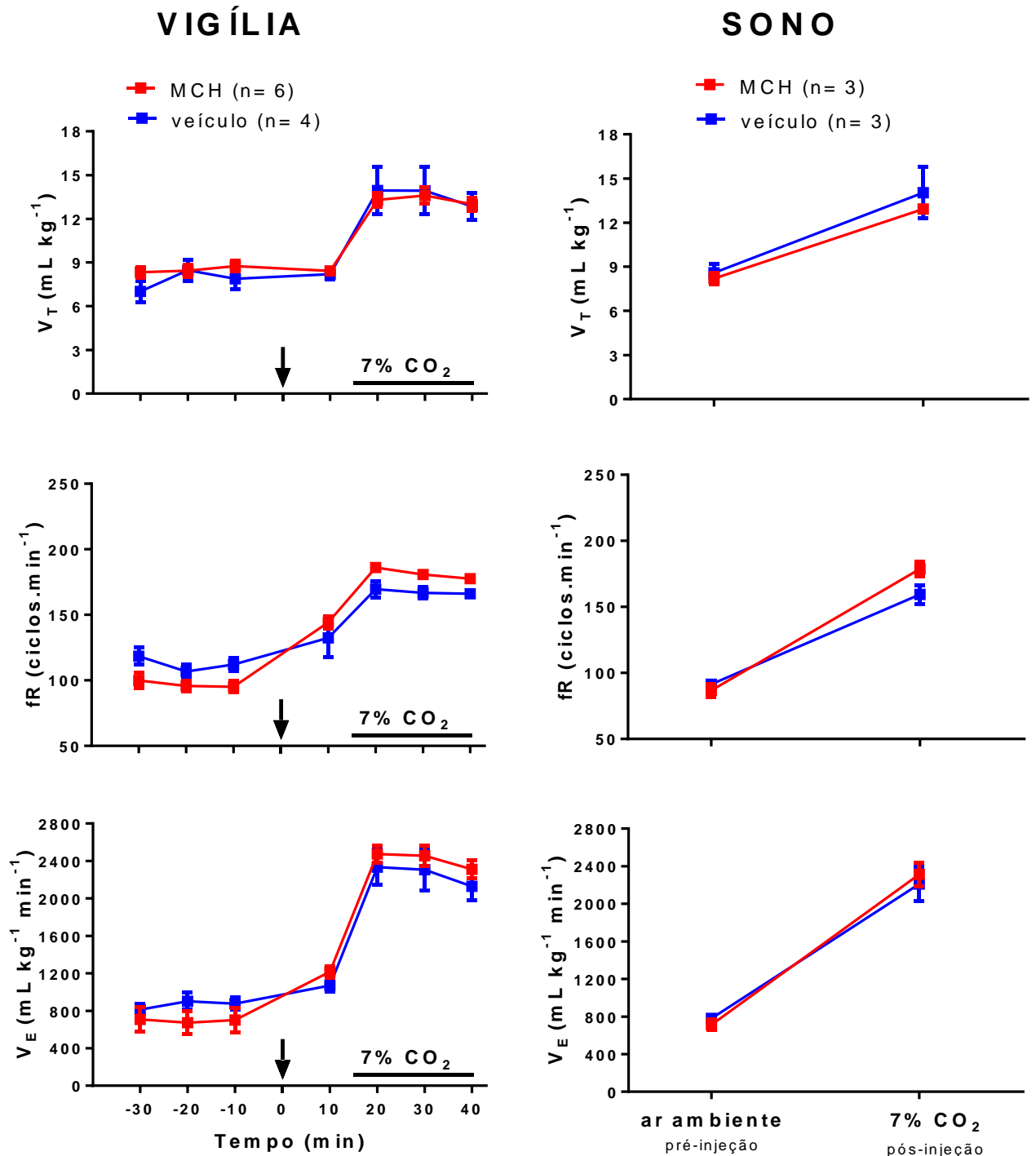


Figura 10: Efeito da microinjeção de MCH ou veículo intra-LH/PFA no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar (\dot{V}_E) de ratos expostos a normocapnia e hipercapnia (7% CO₂) durante a vigília (A) e o sono NREM (B) durante a fase escura. A seta indica o momento da microinjeção. A barra preta indica o período de hipercapnia. Os valores são expressos como média \pm S.E.M.

3.4. Efeito da microinjeção intra-LH/PFA de MCH ou veículo na respiração basal, em ratos durante a vigília e o sono na fase clara.

Na figura 11, podemos avaliar os efeitos da microinjeção de MCH [0.4 mM] ou veículo no LH/PFA em condições normocápnicas na fase clara. Podemos observar a frequência respiratória no período antes da microinjeção dos animais tratados e controle durante o sono são estatisticamente diferentes, no entanto o MCH intra-LH/PFA não alterou a ventilação basal durante a vigília ($\dot{V}_E = 750.3 \pm 16.2$; n = 3 *versus* 738.7 ± 30.9 ml, kg⁻¹ min⁻¹; n = 03) ou durante o sono ($\dot{V}_E = 595 \pm 42.9$; n = 3 *versus* 596 ± 11.3 ml, kg⁻¹ min⁻¹; n = 03) em comparação ao grupo controle na fase clara.

FASE CLARA

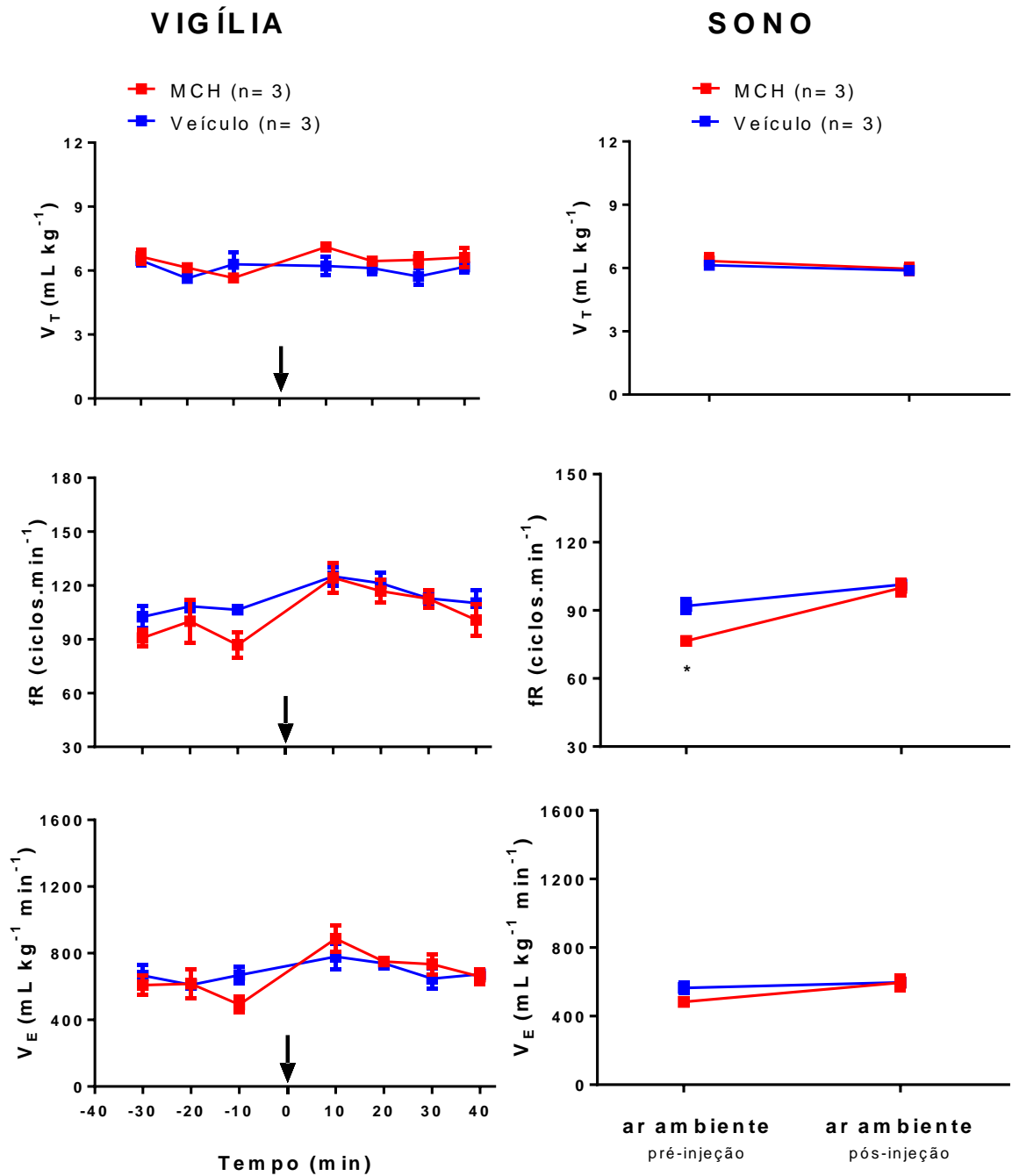


Figura 11: Efeito da microinjeção de MCH ou veículo intra-LH/PFA no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar (\dot{V}_E) de ratos expostos a normocapnia durante a vigília (A) e o sono NREM (B) durante a fase clara. A seta indica o momento da microinjeção. A barra preta indica o período de hipercapnia. Os valores são expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0.05$, MCH *versus* salina estéril.

3.5. Efeito da microinjeção intra-LH/PFA de SNAP-94847 (antagonista dos MCH1-R) ou veículo na resposta ventilatória à hipercapnia, em ratos durante a vigília e o sono na fase clara.

Na figura 12, podemos avaliar os efeitos da microinjeção de SNAP-94847 [63 mM] ou veículo no LH/PFA na resposta ventilatória à hipercapnia na fase clara. Podemos observar que o SNAP-94847 intra-LH/PFA aumentou a resposta ventilatória hipercápnica em 18% durante a vigília ($\dot{V}E = 2546.6 \pm 113.2$; $n = 6$ versus 2106.4 ± 178.5 ml, $\text{kg}^{-1} \text{min}^{-1}$; $n = 05$) ($P < 0.05$), mas não alterou a ventilação durante o sono ($\dot{V}E = 2073.5 \pm 158.9$; $n = 4$ versus 2007 ± 151.5 ml, $\text{kg}^{-1} \text{min}^{-1}$; $n = 05$) em comparação ao grupo controle na fase clara.

FASE CLARA

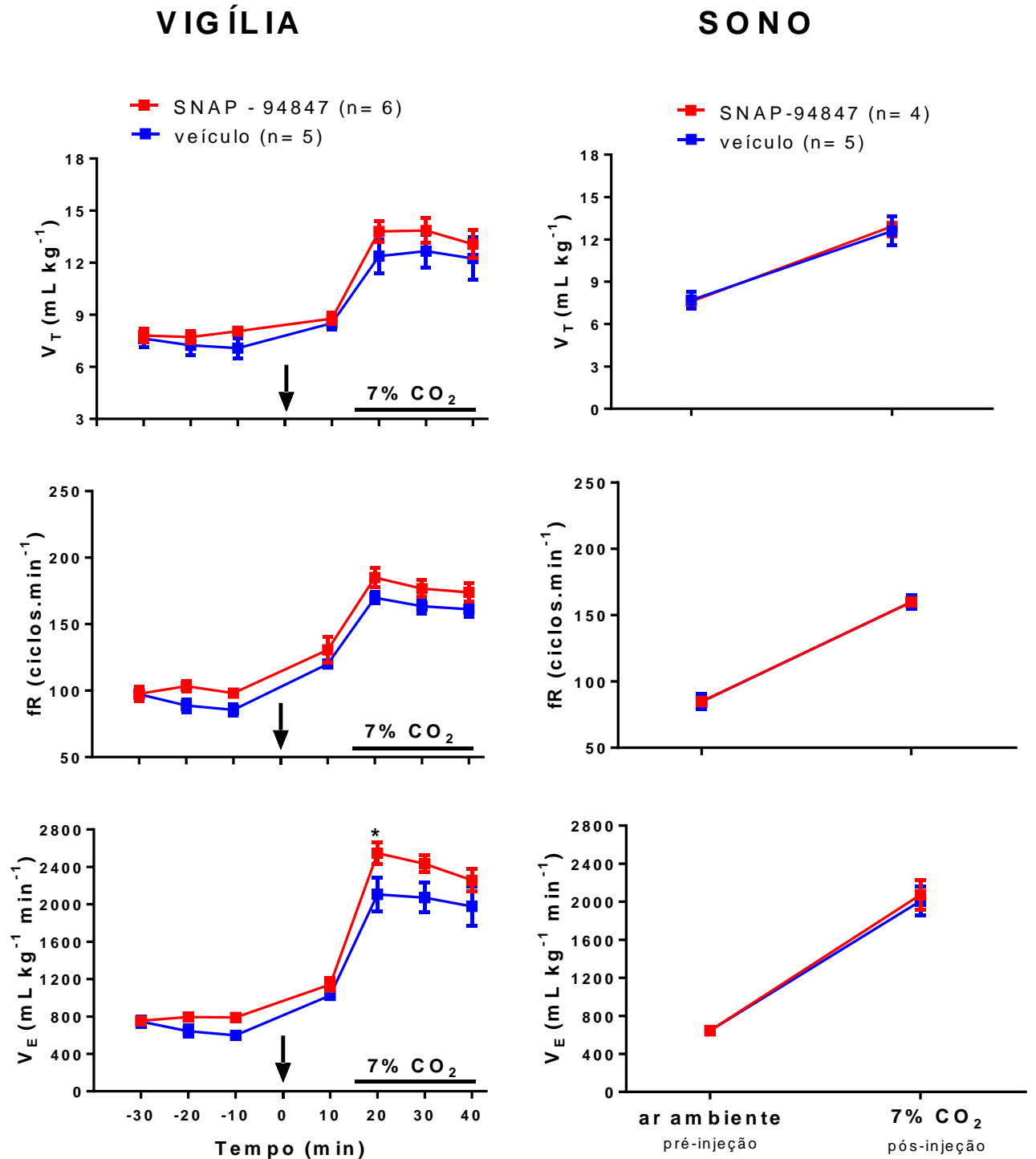


Figura 12: Efeito da microinjeção de SNAP-94847 ou solução veículo intra-LH/PFA no volume corrente (V_T),

frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de ratos expostos à hipercapnia (7% CO₂) durante a vigília (A) e o sono NREM (B) durante a fase clara. A seta indica o momento da microinjeção. A barra preta indica o período de hipercapnia. Os valores são expressos como média ± S.E.M. * $P < 0.05$, SNAP - 94847 versus veículo.

3.6. Efeito da microinjeção intra-LC de MCH ou veículo na resposta ventilatória à hipercapnia, em ratos durante a vigília e o sono na fase clara e escura.

Na figura 13, é mostrado o efeito da microinjeção de MCH [0.4 mM] ou veículo intra-LC na resposta ventilatória à hipercapnia durante a fase clara. Como podemos observar, a microinjeção de MCH não alterou a ventilação dos animais em condições normocápnicas, assim como não alterou a resposta ventilatória hipercápnica em comparação ao grupo controle durante a vigília ($\dot{V}_E = 1734.5 \pm 64.6$; n = 6 *versus* 1917.8 ± 147.9 ml, kg⁻¹ min⁻¹; n = 04) e sono ($\dot{V}_E = 1687.9 \pm 98.9$; n = 6 *versus* 1644.7 ± 164.8 ml, kg⁻¹ min⁻¹; n = 04).

FASE CLARA

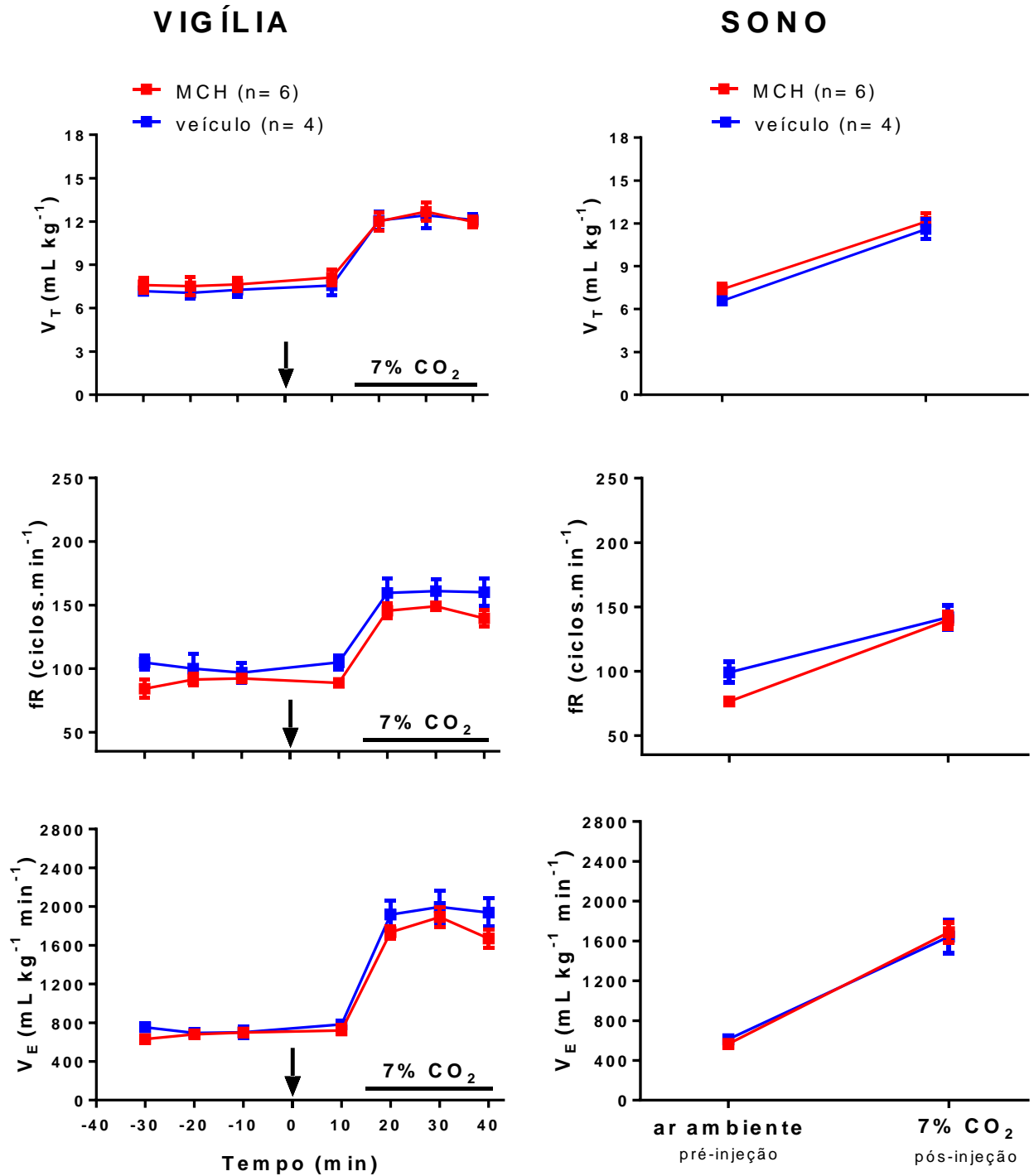
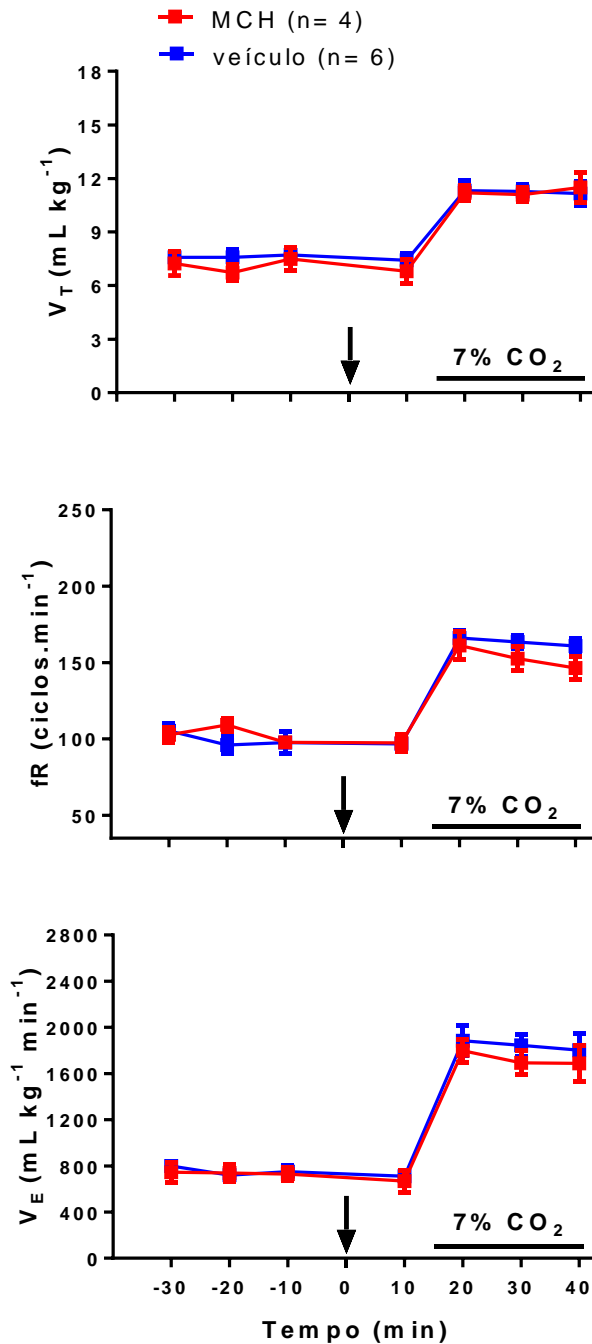


Figura 13: Efeito da microinjeção de MCH ou solução veículo intra-LC no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de ratos expostos à hipercapnia (7% CO₂) durante a vigília (A) e o sono NREM (B) durante a fase clara. A seta indica o momento da microinjeção. A barra preta indica o período de hipercapnia. Os valores são expressos como média \pm S.E.M.

Da mesma forma, como mostrado na figura 14, durante a fase escura, a microinjeção de MCH no LC não alterou a ventilação em condições de normocapnia e não alterou a resposta ventilatória ao CO₂, comparado ao grupo controle, durante a vigília ($\dot{V}E = 1798.1 \pm 101$; n = 4 *versus* 1885.2 ± 127.5 ml, kg⁻¹ min⁻¹; n = 06) ou durante o sono ($\dot{V}E = 1644.6 \pm 176.9$; n = 4 *versus* 1687.6 ± 88.9 ml, kg⁻¹ min⁻¹; n = 06).

FASE ESCURA

VIGÍLIA



SONO

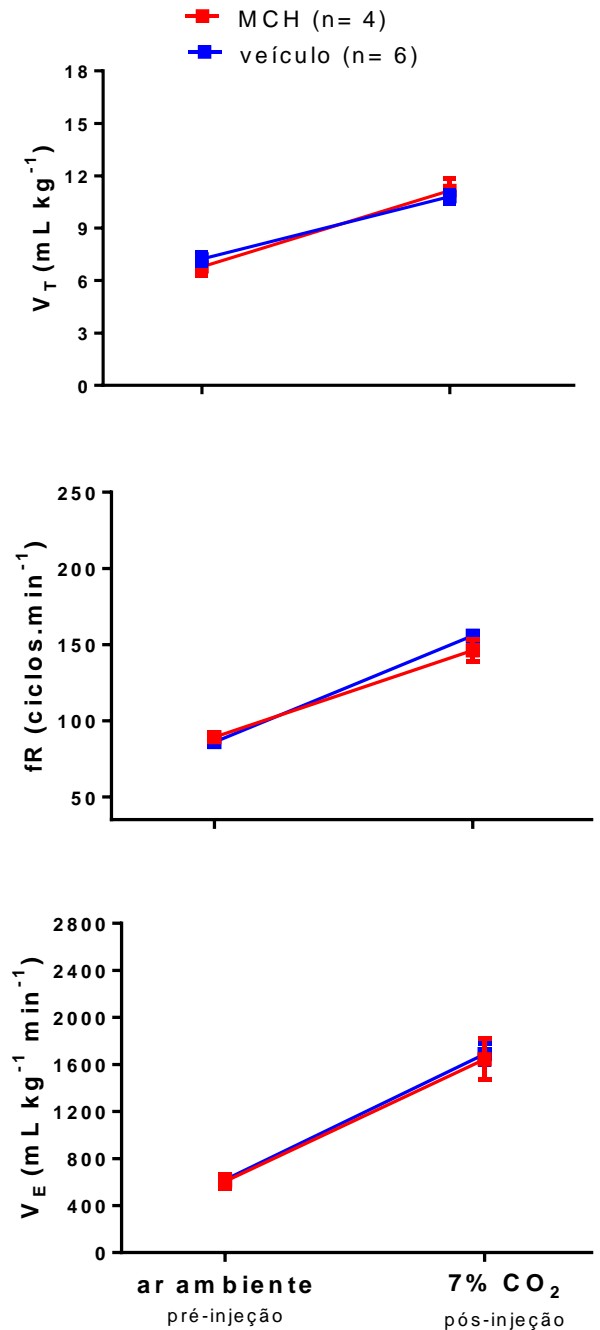


Figura 14: Efeito da microinjeção de MCH ou solução veículo intra-LC no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de ratos expostos a condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO₂) durante a vigília (A) e o sono NREM (B) durante a fase escura. A seta indica o momento da microinjeção. A barra preta indica o período de hipercapnia. Os valores são expressos como média \pm S.E.M.

3.7. Temperaturas da câmara e do ambiente:

Durante a realização de todos os protocolos experimentais a temperatura média da câmara foi de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (EPM), e a temperatura média da sala foi de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (EPM).

3.8. Temperatura corporal (T_c):

A figura 15 mostra a variação na T_c dos animais que receberam microinjeção de MCH intra-LH/PFA e do grupo controle, que receberam a solução veículo em condições de normocapnia e hipercapnia durante a fase clara (A) e escura (B). Podemos observar que os animais que receberam a microinjeção de MCH não apresentaram mudanças na T_c , comparado aos animais do grupo controle, no entanto após a microinjeção houve um aumento estatisticamente significativo da T_c dos animais do grupo controle, comparado com o período anterior à microinjeção.

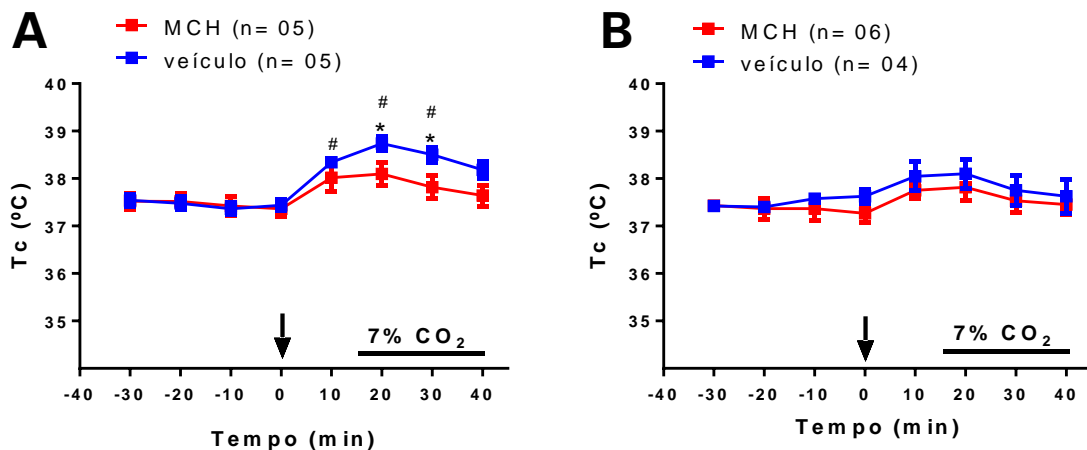


Figura 15: Efeito da microinjeção de MCH ou veículo intra-LH/PFA na temperatura corporal de ratos não-anestesiados em condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO_2) na fase clara (A) e escura (B). A seta indica o momento da microinjeção. A barra preta indica o período de hipercapnia. Os valores são expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0.05$, veículo pós-microinjeção versus veículo pré-microinjeção tempo -30, -20 e 0; # $P < 0.05$ veículo pós-microinjeção versus veículo pré-microinjeção tempo -10.

A variação na T_c dos animais que receberam microinjeção de MCH intra-LH/PFA e do grupo controle, que recebeu a solução veículo em condições de normocapnia durante a fase clara é mostrada na figura 16. Podemos notar que não houve alterações na T_c dos animais tratados com MCH comparado aos animais do grupo controle em condições normocápnicas.

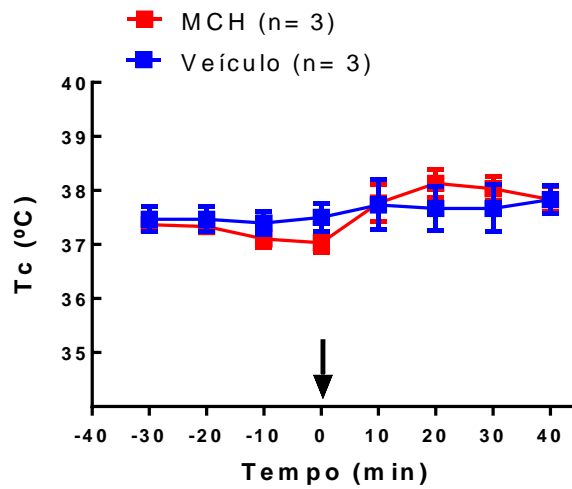


Figura 16: Efeito da microinjeção de MCH ou veículo intra-LH/PFA na temperatura corporal de ratos não-anestesiados em condições normocápnicas na fase clara. A seta indica o momento da microinjeção. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.

O mesmo foi visto para os animais que receberam microinjeção de SNAP-94847 intra-LH/PFA e do grupo controle em condições de normocapnia e hipercapnia durante a fase clara. Como pode ser observado, não houve alterações na Tc dos animais tratados *versus* animais do grupo controle.

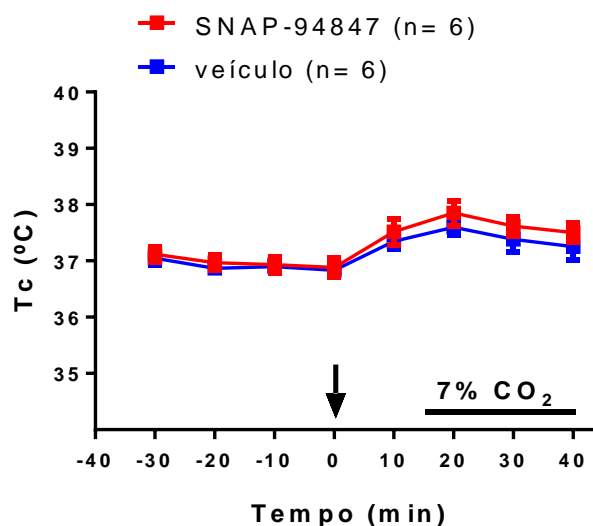


Figura 17: Efeito da microinjeção de SNAP-94847 ou veículo intra-LH/PFA na temperatura corporal de ratos não-anestesiados em condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO₂) na fase clara. A seta indica o momento da microinjeção. A barra preta indica o período de hipercapnia. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.

A figura 18 mostra a variação de Tc nos animais que receberam microinjeções de MCH ou veículo intra-LC, em condições de normocapnia e hipercapnia na fase clara (A) e escura (B). Como podemos observar, não houve alterações na Tc dos animais tratados com MCH no LC, comparado ao grupo controle.

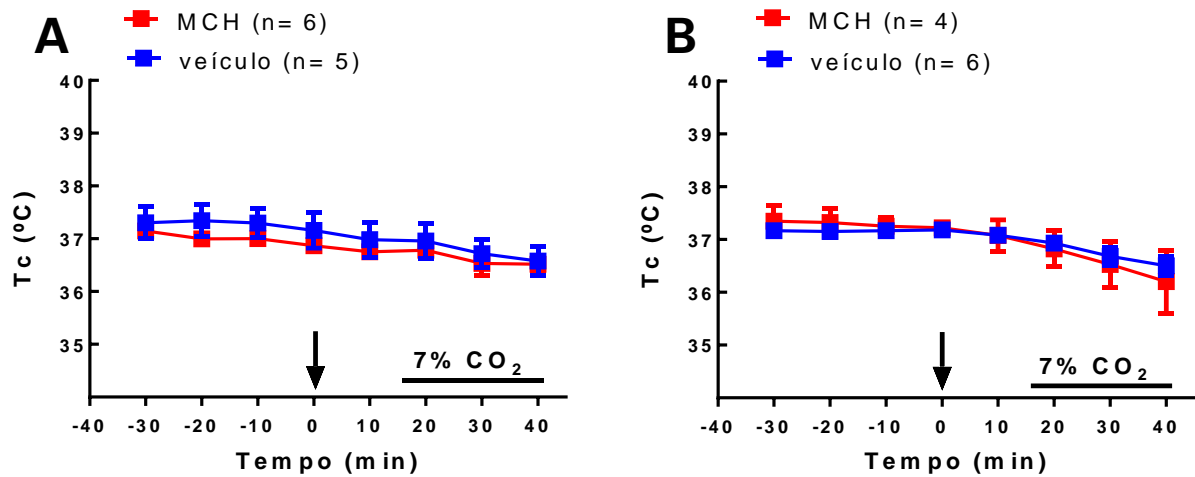


Figura 18: Efeito da microinjeção de MCH ou veículo intra-LC na temperatura corporal de ratos não-anestesiados em ar ambiente ou em hipercapnia a 7% CO₂ na fase clara (A) e escura (B). A seta indica o momento da microinjeção. A barra preta indica o período de hipercapnia. Os valores são expressos como média ± E.P.M.

4. DISCUSSÃO:

O presente estudo investigou a hipótese de que o MCH participa da modulação da resposta ventilatória hipercápnica por sua ação no LH/PFA e/ou no LC em ratos não-anestesiados e que essa participação é dependente dos ciclos sono-vigília e claro-escuro. De acordo com nossos resultados, podemos sugerir que o MCH, por meio de receptores MCH1-R no LH/PFA, exerce um efeito inibitório no quimiorreflexo central durante a fase clara (inativa), uma vez que a microinjeção bilateral de MCH intra-LH/PFA diminuiu significativamente a resposta ventilatória ao CO₂ em ratos durante a vigília e o sono na fase clara, mas não na fase escura, bem como a microinjeção bilateral de SNAP-94847 (antagonista dos MCH1-R) aumentou resposta ventilatória ao CO₂ em ratos durante a vigília na fase clara do ciclo diurno dos animais. A microinjeção de MCH intra-LC não alterou a resposta ventilatória ao CO₂, sugerindo que a participação de MCH no quimiorreflexo central não depende da interação dos neurônios MCH com os neurônios quimiossensíveis do LC.

4.1. MCH e o quimiorreflexo central:

Recentemente, LI et al. (2014), mostrou a primeira evidência do envolvimento de MCH no quimiorreflexo central. Foi visto que em ratos *knockdown* para a prepo-MCH, a resposta ventilatória hipercápnica é exacerbada em comparação com o grupo controle, sugerindo que o MCH tem um efeito inibitório no quimiorreflexo hipercápnico central, no entanto os mecanismos ainda não tinham sido investigados. Sabe-se que os neurônios MCH estabelecem conexões sinápticas com neurônios quimiossensíveis, tanto localmente no LH/PFA, quanto à distância, agindo no LC, na rafe bulbar, no núcleo do trato solitário (NTS), entre outros (SKOFITSCH et al, 1985; ADAMANTIDIS e de LECEA, 2008; DINIZ E BITTENCOURT, 2017). Assim, uma das hipóteses plausíveis é de que o papel de MCH na modulação do quimiorreflexo central seria devido a uma influência inibitória de MCH em neurônios quimiossensíveis, reduzindo a resposta ventilatória hipercápnica. Especulamos que esse mecanismo envolveria, em parte, a ativação dos MCH1-R no LH/PFA. Nossos dados corroboram com essa hipótese, uma vez que a microinjeção bilateral de MCH no LH/PFA causou uma diminuição na \dot{V}_E dos ratos em condições hipercápnicas (7% CO₂) comparado com o grupo controle, durante a vigília e o sono, mas apenas na fase clara (Figura 9) e a microinjeção do antagonista dos MCH1-R (SNAP-94847) causou um aumento na \dot{V}_E dos ratos em condições hipercápnicas (7% CO₂) durante a vigília na fase clara (Figura 12). Sugerimos que o MCH via ativação dos MCH1-R localizados no LH/PFA exerce uma modulação inibitória no quimiorreflexo central durante a fase clara, possivelmente por seu efeito nos neurônios orexinérgicos (OX), também localizados no LH/PFA e que são reconhecidos como quimiossensíveis (DENG et al., 2007; WILLIAMS et al., 2007; SUNANAGA et al., 2009).

Evidências indicam que no LH/PFA, os neurônios OX e MCH estabelecem relações sinápticas recíprocas, mas enquanto as orexinas são neuropeptídeos predominantemente excitatórios (BURDAKOV et al., 2013), os MCH são inibitórios (VAN DEN POL et al. 2004; WU et al., 2009). A interação entre os neurônios MCH e OX parece ser extremamente complexa, os neurônios MCH são densamente contatados por neurônios OX, sabe-se que as orexinas A e B exercem um efeito excitatório pós-sináptico sobre os neurônios MCH, despolarizando seu potencial de membrana e aumentando a frequência de pico (VAN DEN POL, et al 2004). Em contrapartida, foi visto em fatias hipotalâmicas de camundongo que o estímulo optogenético de neurônios OX inibiu o disparo do potencial de ação na maioria dos

neurônios MCH (APERGIS-SCHOUTE et al, 2015). Além do mais, um estudo mostrou que os neurônios OX podem excitar os neurônios MCH por meio da liberação das orexinas ao mesmo tempo que pode inibir por meio da liberação de dinorfina, um neuropeptídeo também sintetizado pelos neurônios orexinérgicos (LI E VAN DEN POL, 2006). Por outro lado, o MCH parece inibir os neurônios OX. Nesse contexto, os camundongos *knockout* para os MCH1-R (MCH1R-KO) possuem uma facilitação de sinapses glutamatérgicas nos neurônios OX e exibem uma facilitação do potencial de ação induzido pela orexina-A, o que sugere que o MCH exerce um efeito inibitório sobre a atividade dos neurônios OX (RAO et al, 2008). Com base nisso, parece-nos razoável sugerir um mecanismo, mostrado na figura 19, de que a resposta ventilatória hipercápnica diminuída, observada com a microinjeção de MCH e aumentada com a microinjeção do antagonista dos MCH1-R no LH/PFA, possa ser devido a um efeito inibitório de MCH na atividade dos neurônios OX.

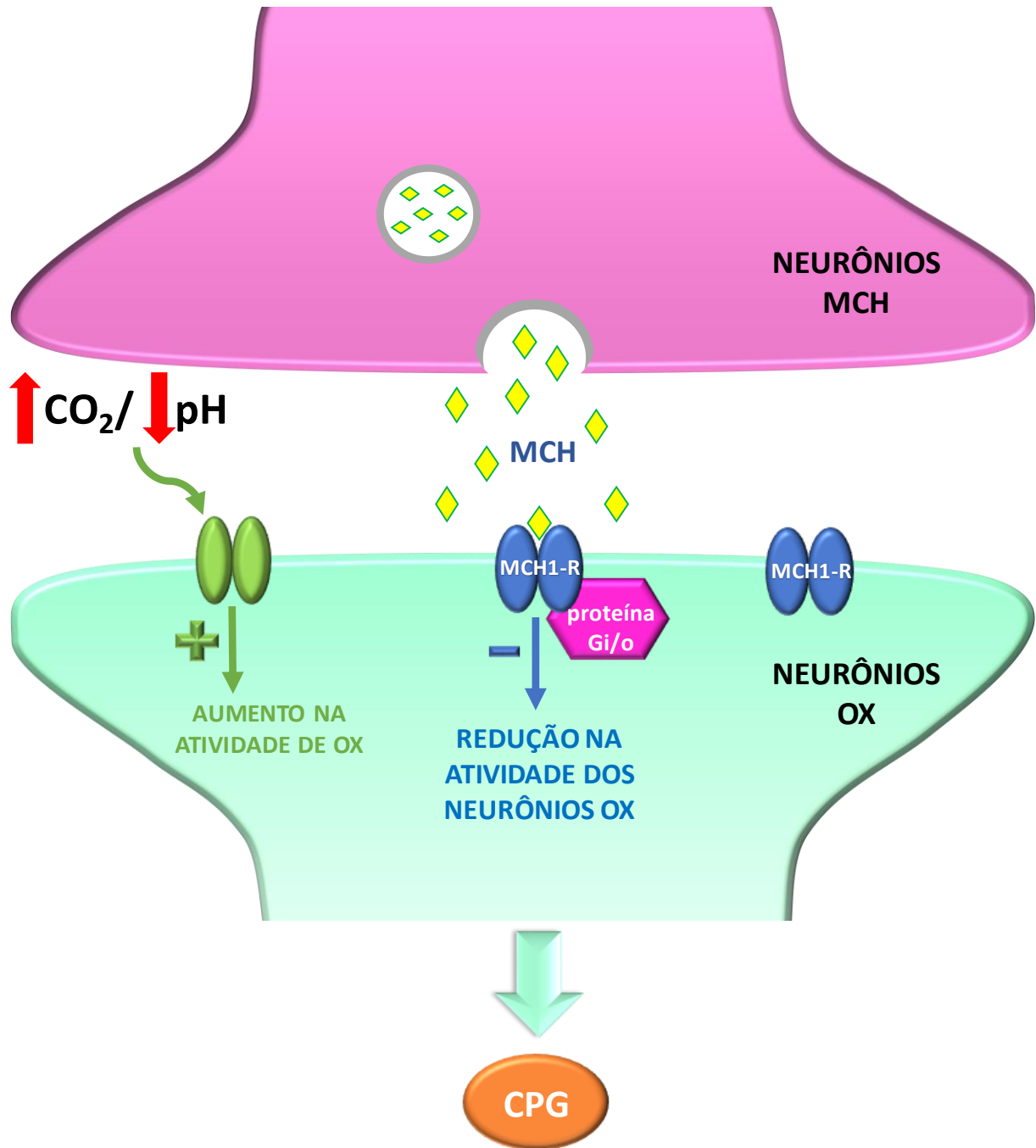


Figura 19: Ilustração esquemática de um suposto mecanismo da sinalização de MCH no LH/PFA, na modulação do quimiorreflexo hipercápnico. Os neurônios OX são quimiossensíveis às mudanças de pH e estimulam o gerador de padrão central (CPG) e/ou outros locais quimiossensíveis. Propomos um modelo no qual, durante a fase clara, estímulos inibitórios dos neurônios MCH diminuem a atividade dos neurônios OX e conseqüentemente da resposta ventilatória hipercápnica.

Podemos observar que os animais que receberam SNAP-94847 apresentaram alterações na resposta ventilatória ao CO₂ apenas durante a vigília e não durante o sono. Esse resultado nos parece intrigante, uma vez que a microinjeção de MCH alterou a resposta ventilatória ao CO₂ tanto durante a vigília quanto durante o sono na fase clara. Com isso nos questionamos

com relação a duração do efeito da droga SNAP-94847 e não encontramos informações na literatura sobre isso. No entanto, podemos observar na figura 12 que a diferença estatística no grupo tratado com o antagonista comparado com o grupo controle ocorre apenas aos 20 minutos após a microinjeção, não havendo diferença nos momentos subsequentes. Pela nossa experiência, os ratos não apresentam momentos de sono aos 20 minutos após a microinjeção, que corresponde a 10 minutos em hipercapnia. Assim, consideramos a possibilidade de o efeito da droga já estar finalizado no momento em que os animais apresentaram momentos de sono. Dessa forma, não descartamos a importância do efeito de MCH no controle da resposta ventilatória ao CO₂ tanto durante a vigília quanto durante o sono na fase clara do ciclo diurno dos animais.

Nos nossos experimentos, após a microinjeção de MCH, os animais permaneceram em normocapnia por 10 minutos antes do início da hipercapnia. Como pode ser visto na figura 9, não observamos diferenças estatisticamente significantes na ventilação do grupo tratado e controle, no entanto observamos um aumento na ventilação em ambos grupos durante esse período. Para que pudéssemos confirmar se o MCH realmente não exerce um efeito na ventilação em condições normocápnicas, realizamos experimentos em que após a microinjeção, os animais permaneceram 40 minutos em normocapnia. Podemos observar, na figura 11, que não houve alteração na ventilação dos animais do grupo tratado e controle durante a vigília e o sono na fase clara. Contudo, ao analisarmos os gráficos podemos notar que a frequência respiratória dos animais tratados e controle antes da microinjeção são estatisticamente diferentes durante o sono, todavia essa diferença não alterou a ventilação dos animais. Com isso, podemos ver que a microinjeção de MCH intra-LH/PFA em condições de normocapnia não altera a ventilação dos animais na fase clara.

Para determinar se a sinalização MCH agindo no LC também participa da modulação do quimiorreflexo central, testamos os efeitos das microinjeções de MCH intra-LC na respiração basal e na resposta ventilatória ao CO₂ em ratos não-anestesiados. Todavia, para a nossa surpresa, a microinjeção de MCH no LC não alterou ventilação dos animais em normocapnia e na resposta ventilatória ao CO₂ durante a vigília e o sono nas fases clara e escura (Figuras 13 e 14), indicando que a sinalização MCHérgica no LC não participa da modulação do quimiorreflexo central.

4.2. MCH e os ciclos sono-vigília e claro e escuro:

O MCH vem sendo apontado como promotor do sono (FERREIRA et al, 2017). Dessa forma, analisamos o tempo de sono e vigília dos animais em nossos experimentos nos diferentes tratamentos realizados (vide tabela 1). Podemos observar que os animais que receberam microinjeções de MCH ou veículo intra-LH/PFA permaneceram predominantemente em vigília nos 10 minutos após a microinjeção tanto na fase clara quanto escura, provavelmente por conta da abertura da câmara para a realização da microinjeção, esses animais também permaneceram significativamente mais tempo em vigília durante a hipercapnia tanto na fase clara quanto escura. Além disso, permaneceram significativamente mais tempo em vigília no período de hipercapnia durante a fase escura comparado a fase clara, isso se deve porque esses animais são mais ativos durante a fase escura.

A atividade dos neurônios MCH parece depender não apenas do ciclo sono-vigília, mas também das fases clara-escura. Por exemplo, evidências mostram que no aCSF de ratos (PELLURU et al, 2013) e em cortes hipotalâmicos de camundongo (GERICS et al, 2017), os níveis de MCH são maiores no período inativo (fase clara) comparado com o período ativo dos roedores (fase escura). Consistente com isso, vimos que a microinjeção de MCH no LH/PFA, diminuiu a resposta ventilatória hipercápnic em condições de hipercapnia apenas na fase clara. A atividade mais alta dos neurônios MCH na fase clara pode explicar esse resultado.

4.3. MCH e a termorregulação:

O LH/PFA e LC estão envolvidos na termorregulação (TAKAHASHI et al, 2001; RAVANELLI e BRANCO, 2008; MORRISON, 2016). Além disso, foi demonstrado que camundongos sem a expressão dos MCH1-R apresentam uma temperatura corporal basal média aumentada, principalmente durante a fase clara (AHNAOU et al, 2011). Dessa forma, também investigamos se o MCH atuando no LH/PFA ou no LC participa da modulação da temperatura corporal. No entanto, a microinjeção de SNAP-94847 intra-LH/PFA e de MCH no LH/PFA e LC não alterou a temperatura corporal em comparação com os respectivos grupos de controle, tanto na fase clara quanto escura, sugerindo que o MCH atuando no MCH1-R localizados no LH/PFA ou LC não participa do controle da temperatura corporal em ratos nas fases clara e escura. Observando o gráfico de Tc dos animais que receberam MCH intra-LH/PFA na fase clara, figura 15 (A), podemos notar que houve um aumento estatisticamente significativo na temperatura corporal dos ratos após a microinjeção de solução veículo comparado com o

período anterior à microinjeção. Isso se deve possivelmente à manipulação local ocasionada pela inserção da agulha de microinjeção que pode ter alterado a atividade da população local de neurônios que sabidamente participam da regulação da temperatura corporal (NAGANUMA et al, 2019; AHNAOU et al, 2011; MOCHIZUKI et al, 2006).

5. CONCLUSÃO:

No presente estudo, são apresentados dados inéditos sobre a participação de MCH na modulação do quimiorreflexo central. Sugerimos que a sinalização de MCH no LH/PFA, mas não no LC, exerce uma modulação inibitória do quimiorreflexo central e essa participação parece ser dependente do ciclo claro-escuro, ocorrendo exclusivamente no período inativo (fase clara) em ratos não-anestesiados.

6. REFERÊNCIAS:

- ADAMANTIDIS, A.; DE LECEA, L. Physiological arousal: a role for hypothalamic systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 10, p. 1475-1488, maio 2008. doi:10.1007/s00018-008-7521-8.
- AHNAOU, A. et al. Contribution of melanin-concentrating hormone (MCH1) receptor to thermoregulation and sleep stabilization: evidence from MCH1 (-/-) mice. **Behavioural Brain Research**, v. 218, n. 1, p. 42-50, mar. 2011. doi: 10.1016/j.bbr.2010.11.019.
- APERGIS-SCHOUTE, J., et al. Optogenetic Evidence for Inhibitory Signaling from Orexin to MCH Neurons via Local Microcircuits. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 14, p. 5435-5441, abr. 2015. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5269-14.2015.
- ASTON-JONES, G., BLOOM, F. E. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. **The Journal of Neuroscience**, v. 1, n. 8, p. 876-886, ago. 1981. doi:10.1523/JNEUROSCI.01-08-00876.1981.
- BERRIDGE, C. W., SCHMEICHEL, B. E., ESPAÑA, R. A. Noradrenergic modulation of wakefulness/arousal. *Sleep Medicine Reviews*, v. 16, n. 2, p. 187-197, abr. 2012. doi:10.1016/j.smr.2011.12.003.
- BERRIDGE, C.W., WATERHOUSE, B. D. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews*, v. 42, n. 1, p. 33-84, abr. 2003. doi:10.1016/s0165-0173(03)00143-7.
- BIANCARDI, V., BÍCEGO, K. C., ALMEIDA, M. C., GARGAGLIONI L. H. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO2 drive to breathing. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 455, p. 1119-1128, mar. 2008. doi:10.1007/s00424-007-0338-8.
- BROWN, S. N., CHITRAVANSHI, V. C., KAWABE, K., SAPRU, H. N. Microinjections of melanin-concentrating hormone into the nucleus tractus solitarius of the rat elicit depressor and

- bradycardic responses. *Neuroscience*, v. 150, n. 4, p. 796-806, dez. 2007. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.10.002.
- BURDAKOV, D., KARNANI, M. M., GONZALEZ, A. Lateral hypothalamus as a sensor regulator in respiratory and metabolic control. *Physiology & Behavior*, v. 121, p. 117-124, abr. 2013. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.03.023.
- CHUNG S., SAITO, Y., CIVELLI, O. MCH receptors/gene structure-in vivo expression. *Peptides*, v. 30 n. 11, p. 1985-1989, ago. 2009. doi:10.1016/j.peptides.2009.07.017.
- DA SILVA, E. N., HORTA-JÚNIOR, J. A. C., GARGAGLIONI, L. H., DIAS, M.B. ATP in the lateral hypothalamus/perifornical area enhances the CO₂ chemoreflex control of breathing. *Experimental Physiology*, v. 103, n. 12, p. 1679-1691, dez. 2018. doi:10.1113/EP087182.
- DELLA-ZUANA et al. Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in wistar and sprague-dawley rats. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, v. 10, p. 1289-1295, out. 2002. doi: 10.1038/sj.ijo.0802079.
- DENG, B.-S. et al. Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, v. 103, n. 5, p. 1772-1779, nov. 2007. doi:10.1152/jappphysiol.00075.2007.
- DIAS, M. B.; LI, A.; NATTIE, E. The orexin receptor 1 (OX(1)R) in the rostral medullary raphe contributes to the hypercapnic chemoreflex in wakefulness, during the active period of the diurnal cycle. *Respiratory physiology & neurobiology*, v. 170, n. 1, p. 96-102, 31 jan. 2010. doi:10.1016/j.resp.2009.12.002.
- DINIZ, G. B., BITTENCOURT, J. C. The melanin-concentrating hormone as an integrative peptide driving motivated behaviors. *Frontiers in Systems Neuroscience*, v. 11, n. 32, p. 1-26, maio 2017. doi: 10.3389/fnsys.2017.00032.
- DINIZ, G. B., BITTENCOURT, J. C. The Melanin-Concentrating Hormone (MCH) System: A Tale of Two Peptides. *Frontiers in neuroscience*, v. 13, p. 1280, nov. 2019. doi:10.3389/fnins.2019.01280.
- FERREIRA, J. G. P., BITTENCOURT, J. C., ADAMANTIDIS, A. Melanin-concentrating hormone and sleep. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 44, p. 152-158, jun. 2017. doi:10.1016/j.conb.2017.04.008.
- GARGAGLIONI, L. H., HARTZLER, L. K., PUTNAM, R. W. The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respiratory Physiology Neurobiology*, v. 173, n. 3, p. 264-273, maio 2010. doi:10.1016/j.resp.2010.04.024.
- GERICS, B., SZALAY, F., SÓTONYI, P., JANCSIK, V. Diurnal variation of the Melanin-Concentrating Hormone level in the hypothalamus. *Acta Biologica Hungarica*, v. 68, n. 1, p. 14-21, dez. 2017. DOI: 10.1556/018.68.2017.1.2.
- GUAN JL, et al. Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, v. 26, n. 12, p. 1523-1532, dez. 2002. doi:10.1038/sj.ijo.0802155.
- HASSANI, O. K., LEE, M. G., JONES, B. E. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proceedings*

of the **National Academy of Sciences**, v. 106, n. 7, p. 2418-2422, fev. 2009. doi:10.1073/pnas.0811400106.

KONADHODE, R. R. et al. Optogenetic stimulation of MCH neurons increases sleep. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 25, p. 10257-10263, jun. 2013. doi:10.1523/JNEUROSCI.1225-13.2013.

JACKY J. P. A plethysmograph for long-term measurements of ventilation in unrestrained animals. **Journal Of Applied Physiology Respiratory Environmental And Exercise Physiology**, v. 45, n. 4, p.644-647, out. 1978. doi: 10.1152/jappl.1978.45.4.644.

LEMBO, P. M. C., et al. The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. **Nature Cell Biology**, v. 1, p. 267-271, set. 1999. doi:10.1038/12978.

LI, A.; ROY, S. H.; NATTIE, E. E. An augmented CO₂ chemoreflex and overactive orexin system are linked with hypertension in young and adult spontaneously hypertensive rats. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 17, p. 4967-4980, maio 2016. doi:10.1113/JP272199.

LI, N.; LI, A.; NATTIE, E. Focal microdialysis of CO₂ in the perifornical-hypothalamic area increases ventilation during wakefulness but not NREM sleep. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 185, n. 2, p. 349-355, jan. 2013. doi:10.1016/j.resp.2012.09.007.

LI, N.; NATTIE, E.; LI, A. The role of Melanin Concentrating Hormone (MCH) in the central chemoreflex: A knockdown study by siRNA in the lateral hypothalamus in rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, ago. 2014. doi:10.1371/journal.pone.0103585.

LI, Y., VAN DEN POL, A. N. Differential target-dependent actions of coexpressed inhibitory dynorphin and excitatory hypocretin/orexin neuropeptides. **The Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 26 (50), p. 13037-13047, dez. 2006. doi:10.1523/JNEUROSCI.3380-06.2006.

MACNEIL D. J. The role of melanin-concentrating hormone and its receptors in energy homeostasis. **Frontiers in Endocrinology** (Lausanne), v. 4, p. 49, abr. 2013. doi:10.3389/fendo.2013.00049.

MARSH, D. J., et al. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 3240-1245, mar. 2002. doi:10.1073/pnas.052706899.

MESSINA, M. M.; OVERTON, J. M. Cardiovascular effects of melanin-concentrating hormone. **Regulatory. Peptides**, v. 139, p. 23-30, mar. 2007. doi:10.1016/j.regpep.2006.08.013.

MOCHIZUKI T, KLERMAN EB, SAKURAI T, SCAMMELL TE. Elevated body temperature during sleep in orexin knockout mice. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 3, p. R533-40, set. 2006. doi:10.1152/ajpregu.00887.2005.

MORRISON, S. F. Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 196, p. 14-24, abr. 2016. doi:10.1016/j.autneu.2016.02.010.

NAGANUMA, F. et al. Lateral hypothalamic neurotensin neurons promote arousal and hyperthermia. **PLoS Biology**, v. 17, n. 3, mar. 2019. doi:10.1371/journal.pbio.3000172.

- NATTIE, E., LI, A. Central chemoreceptors: locations and functions. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 1, p. 221-254, jan. 2012. doi:10.1002/cphy.c100083.
- ONO D., YAMANAKA, A. Hypothalamic regulation of the sleep/wake cycle. **Neuroscience Research**, v. 118, p. 74-81, maio 2017. doi: 10.1016/j.neures.2017.03.013.
- PAXINOS, G., WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**. 2014.
- PELLURU, D., KONADHODE, R., SHIROMANI, P. J. MCH neurons are the primary sleep-promoting group. **Sleep**, v. 1, n. 36 (12), p. 1779-1781, dez, 2013. doi:10.5665/sleep.3196.
- PEYRON, C. et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 23, p. 9996-10015, dez. 1998. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-23-09996.1998.
- RAO, Y. et al. Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 37, p. 9101-9110, set. 2008. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1766-08.2008.
- RAVANELLI, M. I., BRANCO, L. G. Role of locus coeruleus heme oxygenase-carbon monoxide-cGMP pathway during hypothermic response to restraint. **Brain Research Bulletin**, v. 75, n. 5, p. 526-32, mar. 2008. doi: 10.1016/j.brainresbull.2007.09.002.
- RODRIGUES, L. T. C. et al. Glutamate metabotropic receptors in the lateral hypothalamus/perifornical area reduce the CO₂ chemoreflex. **Respiratory Physiology Neurobiology**, v. 260, p. 122-130, fev. 2019. doi: 10.1016/j.resp.2018.11.007.
- SAILER, A.W., et al. Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 13, p. 7564-7569, jun. 2001. doi:10.1073/pnas.121170598.
- SAITO, Y., CHENG, M., LESLIE, F. M., CIVELLI, O. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 435, n. 1, p. 26-40, jun. 2001. doi: 10.1002/cne.1191.
- SAKURAI, T., MIEDA, M. & TSUJINO, N. The orexin system: roles in sleep/wake regulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1200, p. 149-161, jul. 2010. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05513.x.
- SKOFITSCH, G., JACOBOWITZ, D. M., ZAMIR, N. Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. **Brain Research Bulletin**, v. 15, p. 635-649, dez. 1985. doi: 10.1016/0361-9230(85)90213-8.
- SONG, N., et al. Acid sensing ion channel 1 in lateral hypothalamus contributes to breathing control. **PLoS One**, n. 7, n. 7, p. e39982, jul. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0039982.
- SUNANAGA, J. et al. CO₂ activates orexin-containing neurons in mice. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 166, n. 3, p. 184-186, maio 2009. doi:10.1016/j.resp.2009.03.006
- TAKAHASHI, A., et al. Hypothalamic cholinergic regulation of body temperature and water intake in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 94, n. 1-2, p. 74-83, dez. 2001. doi: 10.1016/S1566-0702(01)00347-2.

TAKASE, K., et al. Meta-Analysis of melanin-concentrating hormone signaling-deficient mice on behavioral and metabolic phenotypes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, jun. 2014. doi:10.1371/journal.pone.009996.

TORTEROLO, P. Melanin-concentrating hormone (MCH): role in rem sleep and depression. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p.475, dez. 2015. doi:10.3389/fnins.2015.00475.

TORTEROLO, P., LAGOS, P., MONTI, J. M. Melanin-concentrating hormone: a new sleep factor? **Frontiers in Neurology**, v. 18, p. 2-14, mar. 2011. doi:10.3389/fneur.2011.00014.

VAN DEN POL, A. N., ACUNA-GOYCOLEA, C., CLARK, K. R., GHOSH, P. K. Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. **Neuron**, v. 42, p. 635-652, abr. 2004. doi: 10.1016/s0896-6273(04)00251-x.

VAUGHAN, J.M., FISCHER, W.H., HOEGER, C., RIVIER, J., VALE, W. Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. **Endocrinology**, v. 125, n. 3, p. 1660-1665, set. 1989. doi:10.1210/endo-125-3-1660.

WILLIAMS, R. H. et al. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 25, p. 10685–10690, jun. 2007. doi:10.1073/pnas.0702676104.

WU, M. et al. Melanin concentrating hormone directly inhibits GnRH neurons and blocks kisspeptin activation, linking energy balance to reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n.40, p. 17217-17222, out. 2009. doi: 10.1073/pnas.0908200106.

Ye, H., et al. Melanin-concentrating hormone (MCH) and MCH-R1 in the locus coeruleus may be involved in the regulation of depressive-like behavior. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 12, p. 1128-1137, out. 2018. doi:10.1093/ijnp/pyy088.

(a) YOON, Y. S., LEE H. S. Projections from melanin-concentrating hormone (MCH) neurons to the dorsal raphe or the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. **Brain Research**, v. 1490, p. 72-82, jan. 2013. doi: 10.1016/j.brainres.2012.08.022.

(b) YOON, Y. S., LEE H. S. Projection patterns of lateral hypothalamic, cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons to the dorsal raphe and/or the locus coeruleus in the rat. **Brain Research**, v. 1494, p. 56-69, fev. 2013. doi:10.1016/j.brainres.2012.11.042.

ANEXO - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO ANIMAL (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Participação do Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) no Hipotálamo Lateral/Área perifornical (LH/PFA) e Locus Coeruleus (LC) na resposta ventilatória à hipercapnia em ratos durante o sono e vigília", Protocolo nº 1104-CEUA, sob a responsabilidade de **Mirela Barros Dias**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 1/8/2018	Término: 20/12/2019
Espécie/linhagem:	Rato Wistar	
Nº de animais:	96	
Peso:	250-300g	Idade: 60 dias
Sexo:	macho	
Origem	Biotério Central da Unesp-Câmpus de Botucatu/SP	

Botucatu, 15 de junho de 2018.

Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Instituto de Biociências da Unesp - Câmpus de Botucatu
Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, 250 - Distrito de Rubião Júnior - CEP 18618-689 Botucatu/SP
Tel 14 3880 0851 mail: secda@ibb.unesp.br

