



unesp

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



ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DO HORMÔNIO CONCENTRADOR DE MELANINA (MCH) NA ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL DO RATO AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL E ENVELHECIMENTO

CARLA DE MORAES MACHADO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

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

BOTUCATU – SP

2015



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DO HORMÔNIO
CONCENTRADOR DE MELANINA (MCH) NA ÁREA
HIPOTALÂMICA LATERAL DO RATO AO LONGO DO
DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL E ENVELHECIMENTO**

CARLA DE MORAES MACHADO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior
Prof. Titular Jackson Cioni Bittencourt

BOTUCATU – SP

2015

CARLA DE MORAES MACHADO

ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DO HORMÔNIO CONCENTRADOR DE
MELANINA (MCH) NA ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL DO RATO AO LONGO DO
DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL E ENVELHECIMENTO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Orientador: Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Comissão examinadora:

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior
Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UFSCAR

Prof^a. Dr^a. Luciana Pinato
Faculdade de Filosofia e Ciências – UNESP/Marília

Botucatu, 26 de fevereiro de 2015.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carlos e Sineide, e a minha irmã, Gabriela.
A Robert Hans de Moraes Santos (*In Memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Sineide, e à minha irmã, Gabriela, por todo o apoio em mais uma etapa cumprida de um sonho que, *a priori*, era só meu, mas se tornou parte do de vocês. À minha segunda família, Shirley, Thiago e Marina, por fazerem parte de todos os momentos importantes e me apoiarem em todos eles.

Ao Professor Doutor José de Anchieta de Castro e Horta Júnior, por ter acreditado no meu potencial para desenvolver um projeto de pesquisa envolvendo Neurociências, pelo aprendizado durante toda a preparação dessa dissertação, que contribuiu de forma brilhante para o meu crescimento profissional.

Ao Professor Titular Jackson Cioni Bittencourt, pela receptividade, disponibilidade e todo suporte em seu laboratório, pela confiança depositada no trabalho, contribuindo diretamente para o seu enriquecimento.

À Professora Doutora Raquel Fantin Domeniconi, por sua generosidade e incentivo desde o início dessa nova etapa, e por continuar contribuindo de forma significativa para a minha formação.

Às Professoras Doutoradas Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro e Mirela Barros Dias, pelas ricas sugestões para esse trabalho durante o Exame de Qualificação.

Aos Professores Doutores Luciana Pinato e Luiz Claudio Takase, pelas contribuições para a discussão e o aprimoramento dessa dissertação.

Aos meus irmãos de Botucatu, Juliana (Balsa), Cristiane (Dofa), Ana Carolina (Passa), André (Qualy) e Amanda (Para), por todos os momentos que enfrentamos juntos, fortalecendo ainda mais os laços de amizade que formamos e por sempre acreditarem em mim.

À Marina, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório e pelo sinergismo.

Aos colegas do Laboratório de Neuromorfologia, Nicole, André e Rian, pelos bons momentos compartilhados durante todo o trabalho.

Aos novos colegas do Laboratório de Neuroanatomia Química (ICB/USP), Renata, Daniella, Giovanne, Jéssica, Érica, e à Professora Doutora Luciane Valéria Sita pela recepção sempre cordial e toda atenção oferecida.

À funcionária Joelcimar Martins da Silva (Jô) por todo aprendizado durante os experimentos e pelos bons momentos compartilhados em sua execução.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, pelo atendimento solícito na condução dessa dissertação.

Aos alunos, funcionários e docentes do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências de Botucatu, pela convivência harmoniosa no ambiente de trabalho e fora dele.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa (2013/08618-3) e auxílio Jovem Pesquisador (2008/02771-6) para a execução do presente trabalho.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida”
Carl Sagan

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
JUSTIFICATIVA	16
OBJETIVOS	16
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	16
MATERIAIS E MÉTODOS	17
Animais	17
Preparo do material biológico	18
Protocolo de imuno-histoquímica para o MCH	20
Estudo Citoarquitetônico pelo método de Nissl	21
Hibridização <i>in situ</i>	21
Forma de análise dos resultados	22
Estudo estereológico dos neurônios MCH-ir da área hipotalâmica lateral	23
Mapeamento e reconstrução tridimensional dos neurônios MCH-ir	25
Densitometria óptica	25
Apresentação das ilustrações científicas	27
RESULTADOS	27
Estudo citoarquitetônico do hipotálamo e da LHA	27
Imuno-histoquímica para MCH	27
Estudo estereológico dos neurônios MCH-ir da área hipotalâmica lateral	32
Reconstrução tridimensional da área hipotalâmica lateral	34
Hibridização <i>in situ</i>	44
Densitometria óptica	48
DISCUSSÃO	51
Imuno-histoquímica e hibridização <i>in situ</i>	51
Estimativa do número de neurônios MCH-ir na LHA e a expressão de MCH quantificada por densitometria óptica	52
Reconstrução tridimensional	55
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICES – Protocolos	61
APÊNDICE A – Protocolo de acasalamento programado de ratos	62
APÊNDICE B – Protocolo padrão de imuno-histoquímica – MCH	66
APÊNDICE C – Protocolo de hibridização <i>in situ</i> para ppMCH	68
APÊNDICE D – Protocolo de estereologia – contagem de células utilizando a ferramenta optical fractionator” do sistema de estereologia “Stereo Investigator” (MBF Bioscience)	72
APÊNDICE E – Protocolo para análise densitométrica para RNAm após hibridização <i>in situ</i>	74
APÊNDICE F – Instruções para manipulação de pdf 3D interativo criado a partir do modelo de reconstrução tridimensional	76
APÊNDICE G – Análise estatística dos resultados	78

LISTA DE ABREVIATURAS

3V – terceiro ventrículo	MPA – área pré-óptica medial
ACTH – hormônio adrenocorticotrópico	MPOM – região medial do núcleo pré-óptico medial
AgRP – peptídeo relacionado à proteína agouti	ML – região lateral do núcleo mamilar medial
AHA – parte anterior da área hipotalâmica anterior	MM – região medial do núcleo mamilar medial
AHC – parte central da área hipotalâmica anterior	MRe3V – recesso mamilar do 3V
Arc – núcleo arqueado	mt – trato mamilotalâmico
cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar	NEI – neuropeptídeo ácido glutâmico isoleucina
CART – transcrito regulado pela anfetamina e cocaína	NEI-ir – células imunorreativas ao neuropeptídeo ácido glutâmico isoleucina
cp - pedúnculo cerebral	NGE – neuropeptídeo glicina, ácido glutâmico
CRF – fator liberador de corticotropina	NPY – neuropeptídeo Y
DAB – 3,3' diaminobenzidina tetrahidroclorato	opt – trato óptico
DMC – núcleo dorsomedial compacto	PaMP – região medial do núcleo paraventricular parvocelular
DMD – núcleo dorsomedial dorsal	PaLM – região lateral do núcleo paraventricular magnocelular
DMV – núcleo dorsomedial ventral	Pef – núcleo perifornicial
DOI – densidade óptica integrada	POMC – peptídeo da pró-opiomelanocortina
f – fórnix	ppMCH – pré-pró-hormônio concentrador de melanina
Hcrt/OX – hipocretina/orexina	RNA _m – ácido ribonucleico mensageiro
Hcrt/OX-ir – células imunorreativas à hipocretina/orexina	RNA _t – ácido ribonucleico transportador
ic – cápsula interna	Rch – núcleo retroquiasmático
LA – núcleo látero-anterior do hipotálamo	rpm – rotações por minuto
LHA – área hipotalâmica lateral	SNC – sistema nervoso central
LM – núcleo mamilar lateral	SO – núcleo supra-óptico
LPO – área pré-óptica lateral	SuMM – núcleo supramamilar medial
M – molar	STMPM – núcleo STM póstero-medial
MCH – hormônio concentrador de melanina	VMHC – núcleo ventromedial central
MCH-ir – células imunorreativas ao hormônio concentrador de melanina	VMHDM – núcleo ventromedial dorsomedial
MCLH – núcleo magnocelular lateral do hipotálamo	VMHVL – núcleo ventromedial ventrolateral
MGOP – peptídeo resultante de leitura alternativa do gene MCH	ZIrm – zona incerta rostromedial

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema da divisão do hipotálamo em três zonas longitudinais e quatro regiões transversais.....	11
Figura 2: Esquema da estrutura primária do MCH e origem genética do pré-pró-hormônio concentrador de melanina (pp-MCH)	13
Figura 3: Esquema adaptado de Nahon (1989) que mostra a localização dos neurônios imuno-reativos ao MCH e suas projeções axonais para as diversas áreas do neuro-eixo.	14
Figura 4: Fotomicrografia de lavado vaginal com presença de espermatozoides, corados com eosina, hematoxilina e Orange G (Apêndice A), caracterizando o dia 0 de gestação.....	19
Figura 5: Fotografia do períneo em rato fêmea (A) e macho (B) da linhagem <i>Sprague-Dawley</i> de 10 dias de idade.....	19
Figura 6: Imagem da janela de observação tecidual do programa <i>Stereo Investigator</i> , obtida em tempo real através de câmera digital acoplada ao microscópio óptico.....	24
Figura 7: Esquema de uma janela de contagem do programa <i>Stereo Investigator</i>	24
Figura 8: Representação do filtro de densidade óptica neutra utilizado para captura de imagens de referência para calibração de densidade óptica no programa ImageJ.	26
Figura 9: Citoarquitetura do hipotálamo e distribuição dos neurônios MCH-ir nas regiões mamilar (A), tuberal (B), anterior (C) e pré-óptica (D) do hipotálamo do rato.	28
Figura 10: Fotomicrografias da região mamilar da LHA após imuno-histoquímica para MCH em animais de 14 (A), 28 (B), 50 (C), 90 (D), 210 (E), 540 (F) e 750 (G) dias.....	29
Figura 11: Fotomicrografias da região tuberal da LHA após imuno-histoquímica para MCH em animais de 14 (A), 28 (B), 50 (C), 90 (D), 210 (E), 540 (F) e 750 (G) dias.	30
Figura 12: Fotomicrografias da região anterior da LHA após imuno-histoquímica para MCH em animais de 14 (A), 28 (B), 50 (C), 90 (D), 210 (E), 540 (F) e 750 (G) dias.....	31
Figura 13: Média do número de neurônios MCH-ir na LHA total estimados por método estereológico, para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias.	32
Figura 14: Média da área LHA total para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias.....	33
Figura 15: Média do volume da LHA total para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias.	33
Figura 16: Média de densidade neuronal (neurônios/mm ³) da LHA para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias.	33
Figura 17: Reconstrução tridimensional do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios MCH-ir: grupos de 14, 28 e 50 dias.	35
Figura 18: Reconstrução tridimensional do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios MCH-ir: grupos de 90, 210, 540 e 750 dias.	36
Figura 19: Esquemas de mapeamento dos neurônios MCH-ir em animal de 14 dias.	37
Figura 20: Esquemas de mapeamento dos neurônios MCH-ir em animal de 28 dias.	38
Figura 21: Esquemas de mapeamento dos neurônios MCH-ir em animal de 50 dias.	39
Figura 22: Esquemas de mapeamento dos neurônios MCH-ir em animal de 90 dias.	40
Figura 23: Esquemas de mapeamento dos neurônios imuno-reativos ao MCH em animal de 210 dias.	41
Figura 24: Esquemas de mapeamento dos neurônios imuno-reativos ao MCH em animal de 540 dias.	42
Figura 25: Esquemas de mapeamento dos neurônios imuno-reativos ao MCH em animal de 750 dias.	43
Figura 26: Distância média (μm) entre as células MCH-ir da LHA total e das regiões adjacentes a ela para os grupos de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias.....	44
Figura 27: Hibridização <i>in situ</i> para RNAm do ppMCH nas regiões da área hipotalâmica lateral: mamilar (A), tuberal (B), anterior (C).	44
Figura 28: Hibridização <i>in situ</i> para o ppMCH na região mamilar da LHA.	45
Figura 29: Hibridização <i>in situ</i> para o ppMCH na região tuberal da LHA.....	46
Figura 30: Hibridização <i>in situ</i> para o ppMCH na região anterior da LHA.....	47
Figura 31: Média da densidade óptica integrada (DOI) na LHA total para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5 por grupo).....	48
Figura 32: Média da densidade óptica média dos grãos de prata precipitados na LHA total para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5 por grupo).....	49
Figura 33: Média da área marcada na LHA total para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5 por grupo).	50
Figura 34: Média da densidade óptica integrada (DOI) nas regiões mamilar (LHAm), tuberal (LHAt) e mediana da DOI na LHA anterior (LHAa) para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5 por grupo).	50
Figura 35: Média da densidade óptica média nas regiões mamilar (LHAm), tuberal (LHAt) e mediana para a LHA anterior (LHAa) para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5 por grupo).	51
Figura 36: Médiana da área marcada nas regiões mamilar (LHAm), tuberal (LHAt) e anterior (LHAa) para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5 por grupo).....	51

RESUMO

Alterações na Expressão do Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) na Área Hipotalâmica Lateral do Rato ao longo do Desenvolvimento Pós-natal e Envelhecimento

O hormônio concentrador de melanina (MCH) do rato é um nonadecapeptídeo presente em neurônios localizados, principalmente, na área hipotalâmica lateral (LHA) que se projetam para diversas regiões do neuro-eixo. O MCH está envolvido em diversas funções, tais como: reprodução, certos aspectos do comportamento motivado, atividade locomotora, percepção sensorial, controle de temperatura, memória, aprendizagem, ansiedade, ciclo sono-vigília e comportamento alimentar. Nesse, o MCH atua como neuropeptídeo orexígeno. Durante o envelhecimento, ocorre a diminuição no consumo de energia associada à idade. Nesse trabalho, analisamos em diferentes faixas etárias, as variações da expressão do MCH na área hipotalâmica lateral, empregando métodos esterológicos (para estimar o número de neurônios MCH-ir, área, volume e densidade neuronal), reconstrução tridimensional (para estudo da distribuição dos neurônios MCH-ir) e densitometria óptica de tecido hibridizado para reconhecimento do RNAm do ppMCH (para mensuração da área hibridizada, densidade óptica média e densidade óptica integrada [DOI]) na LHA e em suas regiões. Foram utilizados 35 ratos *Sprague-Dawley* machos, divididos em 7 grupos experimentais de diferentes idades: 14 (lactente), 28 (pré-púbere), 50 (púbere), 90 (adulto jovem), 210 (adulto maduro), 540 (adulto senescente) e 750 (adulto senil) dias pós-natais. Os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca, seus encéfalos coletados e processados para análise da expressão do MCH na área hipotalâmica lateral, segundo protocolos de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*. A LHA apresentou um aumento significativo no número de neurônios apenas entre os grupos de 14 e 28 dias e sua área e volume foram significativamente menores apenas no grupo de 14 dias em relação a todos os grupos, com exceção do grupo de 750 dias. No entanto, com relação a densidade neuronal não foram observadas diferenças significantes entre os grupos. O padrão de distribuição dos neurônios MCH-ir não mostrou diferenças qualitativas na LHA e em regiões adjacentes entre os grupos. Os neurônios MCH-ir no hipotálamo apresentaram-se em igual proporção dentro e fora da LHA como um todo, porém, analisando sua distribuição nas regiões mamilar, tuberal e anterior, notou-se a maior concentração dos neurônios MCH-ir na região tuberal, na qual a maior quantidade está dentro da LHA, seguida das regiões anterior e mamilar onde a maior quantidade de neurônios MCH-ir está fora da LHA. A mensuração da DOI indicou um aumento da expressão do MCH entre o período pré-púbere e adulto jovem e posterior diminuição da expressão com o envelhecimento, com diferenças significativas entre o adulto jovem e adultos senescente e senil, dados também corroborados pela mensuração da densidade óptica média e área de tecido hibridizado. Esse mesmo padrão de expressão do MCH foi verificado em todas as regiões da LHA. Dessa forma, concluímos que não há alteração no número de neurônios MCH-ir da LHA após a lactação, embora haja uma diminuição significativa na expressão do RNAm do ppMCH com o processo de envelhecimento.

Palavras-chaves: Hibridização *in situ*, envelhecimento, desenvolvimento pós-natal, área hipotalâmica lateral, imuno-histoquímica, hormônio concentrador de melanina, densitometria óptica, estereologia, reconstrução tridimensional

ABSTRACT

Melanin-Concentrating Hormone (MCH) Expression in the Lateral Hypothalamic Area of the Rat During the Postnatal Development and Aging

The Melanin-Concentrating Hormone (MCH) is a nonadecapeptide located mainly in neurons in the lateral hypothalamic area (LHA), which innervate several regions of neuraxis. MCH is involved in many functions as reproduction, aspects of motivated behaviors, motor activity, sensorial information, temperature control, memory, learning, anxiety, sleep-wake cycle and feeding behavior in which the MCH plays an orexigenic role. The energy consumption in aging is reduced as well as, the expression of MCH presents alterations associated with age. Therefore, we analyzed the variations in the expression of MCH at different ages in the lateral hypothalamic area, using stereology (to estimate the number of MCH-ir neurons, area, volume and neuronal density), 3D reconstruction (to study the distribution of MCH-ir neurons) and optical density after *in situ* hybridization protocol for ppMCH RNAm (to measure the hybridized area, the mean optical density and the integrated optical density [IOD]) in the LHA and its three regions. In this study, 35 animals were divided in 7 experimental groups of 14 (neonate), 28 (prepubescent), 50 (pubescent), 90 (young adult), 210 (middle aged adult), 540 (senescent adult) and 750 (elderly adult) postnatal days. All the animals were perfused via the ascending aorta, the brains were collected and processed by immunohistochemistry and *in situ* hybridization protocols to analyze the expression of MCH in the lateral hypothalamic area. LHA neurons number increased only between groups of 14 and 28 days, and its area and volume significantly smaller in 14-days group when in respect to all other groups but the 750-days one. However, there weren't differences in neuronal density among groups. MCH-ir neurons distribution in LHA and contiguous regions was similar among all groups as well. Hypothalamic MCH-ir neurons has shown uniform rates in and out of LHA, but after analyzing its distribution in mamillary, tuberal and anterior regions, it has been observed a higher concentration of MCH-ir neurons in tuberal region, where there are more neurons inside LHA, when compared to anterior and mamillary regions which have a greater number of them out of it. The IOD measurement revealed an increased MCH expression between prepubescent and young adult groups followed by its decreasing during aging, especially among young adult and senescent and elderly adult animals. These data are also corroborated by mean optical density measurement and labeled area. This MCH expression pattern was observed in all LHA regions. Therefore, we conclude that the number of MCH-ir neurons in LHA doesn't modify after suckling, even though the RNAm expression of ppMCH decreases during aging.

Keywords: *in situ* hybridization, aging, postnatal development, lateral hypothalamic area, immunohistochemistry, melanin-concentrating hormone, optical density, stereology, 3D reconstruction

INTRODUÇÃO

O hipotálamo é um centro integrativo essencial para a sobrevivência. Sua diversidade de funções regulatórias se reflete em sua estrutura, neuroquímica e conexões, visto que quase todas as importantes regiões do sistema nervoso central (SNC) se comunicam com esse centro (SQUIRE, 2008). Ele ocupa a região ventral e medial do diencéfalo, próximo às paredes do terceiro ventrículo, ventralmente à zona incerta, medialmente à cápsula interna e ao subtálamo, rostralmente à substância periaquedutal e à área tegmental ventral do mesencéfalo (SIMERLY e GEORGE, 2004).

O hipotálamo pode ser dividido em 12 compartimentos a partir de dois critérios: o primeiro, estabelecido por LE GROS CLARK (1938), que o divide em quatro regiões rostro-caudais (pré-óptica, anterior, tuberal e mamilar) e o segundo, postulado por CROSBY e WOODBURNE (1940), que identifica três zonas longitudinais (periventricular, medial e lateral - Figura 1). A zona periventricular contém a maior parte dos neurônios neuroendócrinos, a zona medial consiste em grupos celulares bem definidos que recebem, principalmente, aferências de diferentes regiões do sistema límbico e a zona lateral é composta de neurônios dispersos entre as fibras do feixe prosencefálico medial (SAWCHENKO, 1998). Em especial, a zona lateral pode ser subdividida em duas áreas: a área pré-óptica lateral e a área hipotalâmica lateral (SWANSON, 1987; SIMERLY e GEORGE, 2004).

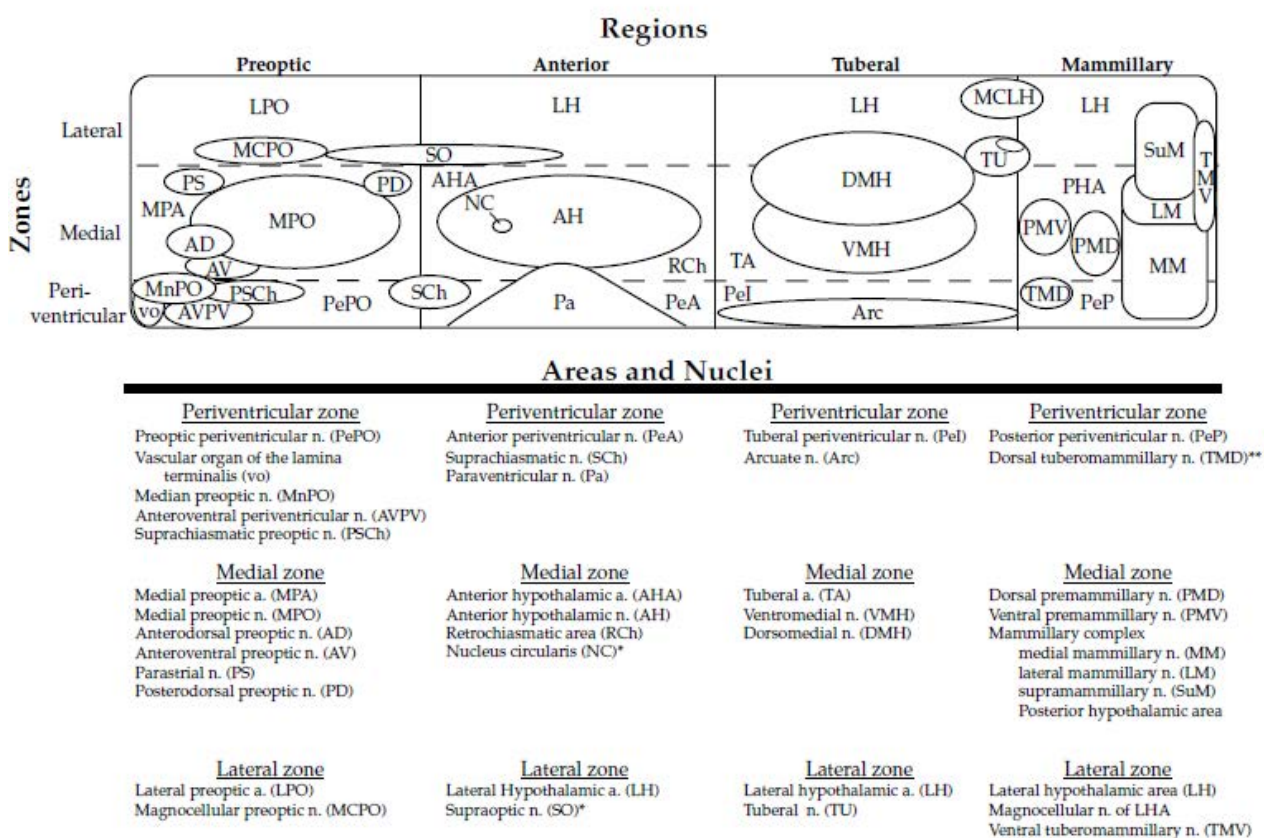


Figura 1: Esquema da divisão do hipotálamo em três zonas longitudinais e quatro regiões transversais, com a identificação dos seus núcleos e áreas (SIMERLY e GEORGE, 2004).

A área hipotalâmica lateral (LHA) pode ser dividida em três regiões (anterior, tuberal e mamilar), com padrões de conexões diferentes e complexos associados ao feixe prosencefálico medial que a atravessa (SAPER et al., 1979; BERTHOUD, 2002). Além disso, a LHA está relacionada ao processamento de informações sensitivas, modulação de respostas motoras somáticas e, especialmente, com a expressão de comportamentos motivados associados à ingestão alimentar (BERNARDIS e BELLINGER, 1996), ingestão hídrica, reprodução, modulação autônoma, ciclo sono-vigília (SZYMUSIAK et al., 1989; KRILOWICZ et al., 1994), controle neuroendócrino (BERNARDIS e BELLINGER, 1993; LARSEN et al., 1994), termorregulação (SATINOFF e SHAN, 1971; ZHANG et al., 1997) e ativação cortical (SAPER, 1985; SAPER et al., 1986)

A diversidade de funções está apoiada por uma grande variedade de neurotransmissores e neuromoduladores. Estudos anteriores demonstraram a presença de diversos neuropeptídeos na LHA, dentre eles a hipocretina/orexina (Hcr/Ox), que apresenta importante papel na manutenção da vigília e no controle da ingestão alimentar (BROBERGER et al., 1998; BROBERGER, 2005), o neuropeptídeo ácido glutâmico isoleucina (NEI), associado ao comportamento de *grooming* e locomoção (NAHON et al., 1989), o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) relacionado com manutenção do peso corporal, ingestão alimentar, estresse e recompensa (KOYLU et al., 1997; KUHAR et al., 2002; ZHANG et al.) e o hormônio concentrador de melanina (MCH), um oligopeptídeo de expressão predominantemente hipotalâmica, associado à regulação de respostas comportamentais que garantem a homeostase do indivíduo, sua sobrevivência e, portanto, a manutenção da espécie (BITTENCOURT et al., 1992; NAHON e ABBA, 2006; BITTENCOURT, 2011).

A distribuição de fibras e terminais imunorreativos ao MCH, associada à distribuição de seu receptor (MCH-1R), sugere sua capacidade de influenciar a organização de comportamentos motivados, através da influência no alerta, comportamento exploratório, regulação autonômica, alimentação, aprendizado e memória (BITTENCOURT et al., 1992; HERVIEU et al., 2000; SAITO et al., 2001). O MCH pode ser encontrado em vários órgãos, como pulmão, tireóide, baço, trato gastrointestinal e, em destaque, no cérebro, que é responsável pela expressão de 98% do peptídeo (NAHON et al., 1993).

O isolamento do MCH do rato foi realizado por Nahon et al. (1989) e Vaughan et al. (1989). Segundo esses trabalhos, o MCH do rato possui estrutura cíclica, composta por 19 aminoácidos, diferenciando do MCH do salmão, descrito previamente por Kawauchi et al. (1983), em dois aminoácidos da porção amino-terminal e quatro substituições. O MCH do rato ocupa a porção carboxi-terminal de um polipeptídeo precursor (pré-pró-hormônio concentrador de melanina – ppMCH; Figura 2) composto por 165 aminoácidos, o qual também codifica outro neuropeptídeo de conformação não-cíclica (neuropeptídeo ácido glutâmico isoleucina; NEI), e um outro potencial peptídeo (neuropeptídeo glicina ácido glutâmico; NGE) (NAHON et al., 1989). Posteriormente, foi descoberto um quarto peptídeo da família do MCH, o MGOP (MCH *gene overprinted polypeptide*), um transcrito alternativo do gene do MCH (TOUMANIANTZ et al., 1996; TOUMANIANTZ et al., 2000; ALLAEYS et al., 2004).

produzida pelo tecido adiposo branco está envolvida na sinalização ao sistema nervoso central sobre o *status* energético do indivíduo, através da mediação de neurônios imunorreativos ao neuropeptídeo Y (NPY), ao peptídeo relacionado à proteína agouti (AgRP), aos peptídeos da pro-opiomelanocortina (POMC) e ao transcrito regulado pela anfetamina e cocaína (CART) do núcleo arqueado. Esses grupos neuronais, por sua vez, projetam-se para células contendo MCH ou Hcrt/Ox da LHA que modulam os comportamentos necessários para a manutenção do equilíbrio energético, dentre os quais inclui-se o comportamento de busca por água e alimentos. Assim, o MCH mostra-se como via final da ação da leptina sobre o neuro-eixo, informando-o das necessidades energéticas do indivíduo (ELIAS et al., 1998; ELIAS et al., 1999).

Com o processo de envelhecimento, mesmo em indivíduos saudáveis, ocorre perda de gordura e peso corporais, possivelmente relacionados a um balanço energético negativo (relação entre ingestão energética e gasto energético), pois grupos etários mais velhos apresentam substancial redução em sua capacidade de manter um balanço energético constante (ROBERTS, 2000; AKIMOTO e MIYASAKA, 2010).

A análise da expressão gênica de peptídeos relacionados ao comportamento alimentar tem sido cada vez mais frequente nos estudos relacionados ao envelhecimento (PETERVARI et al., 2011; FADEL et al., 2013). Assim, o envelhecimento parece estar relacionado com a diminuição de expressão de genes hipotalâmicos de neuropeptídeos, como o POMC, o CART e o MCH, o que sugere uma diminuição no consumo energético com o envelhecimento (KAPPELER et al., 2003).

Outro aspecto diretamente influenciado pelo processo de envelhecimento e o MCH é o sono, mais especificamente, a sua duração. Indivíduos jovens apresentam maior tempo de sono, tanto no período de sono de ondas lentas quanto no tempo de sono REM, comparados com idades mais avançadas. Durante o período de sono REM, neurônios MCH-ir estão fortemente ativados e micro-injeções intraventriculares de MCH na fase ativa de ratos provocam aumento do tempo de sono REM em 200%, sugerindo, assim, papel importante do MCH na modulação e manutenção do sono (VERRET et al., 2003; PEYRON et al., 2009; TORTEROLO et al., 2011). Em camundongos, Konadhode et al. (2013) observaram aumento de sono REM e de sono não-REM após estimulação de neurônios MCH-ir através de optogenética.

Recentemente, as alterações no padrão de expressão do MCH associadas ao envelhecimento também têm sido relacionadas à doença de Parkinson, patologia que acomete mais frequentemente pessoas idosas. A progressão dessa enfermidade e seu estadiamento clínico estão associados à diminuição de neurônios imunorreativos a hipocretina/orexina (Hcrt/Ox) e ao MCH na área hipotalâmica lateral (THANNICKAL et al., 2007). A perda seletiva dos neurônios Hcrt/Ox-ir pode ser causa da narcolepsia, ocorrência comum na doença de Parkinson, que também pode provocar insônia noturna, distúrbios de sono REM, alucinações e depressão.

Outra doença neurodegenerativa frequente em indivíduos idosos é a doença de Alzheimer. Schmidt et al. (2013) identificaram aumento nos níveis de MCH no líquido cérebro-espinhal de pacientes com doença de Alzheimer. Esse aumento poderia ser causado pela liberação desse neuropeptídeo gerada pela apoptose ou necrose de células MCH-ir no hipotálamo lateral.

Dessa forma, é possível identificar diversas alterações em processos fisiológicos e patológicos associados ao envelhecimento que podem ser relacionadas a alterações na expressão de MCH.

JUSTIFICATIVA

A expressão do MCH está relacionada a processos fisiológicos que garantem a homeostase e apresentam mudanças associadas com a idade. Dentre esses processos, já foi descrita previamente a associação entre o envelhecimento e a diminuição no consumo de energia; e a diminuição do tempo de sono, tanto no período de sono de ondas lentas quanto no período de sono REM. Além disso, recentemente, foi descrita uma significativa perda de neurônios Hcrt/Ox-ir e MCH-ir na área hipotalâmica lateral em pacientes com doença de Parkinson e aumento nos níveis de MCH no líquido cérebro-espinhal de pacientes com doença de Alzheimer, patologias com maior incidência em indivíduos idosos (THANNICKAL et al., 2007; SCHMIDT et al., 2013). Portanto, é interessante estudar com detalhe a distribuição e a quantidade de MCH nos neurônios da área hipotalâmica lateral durante o desenvolvimento pós-natal e processo de envelhecimento.

OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho visaram a estudar, durante o desenvolvimento pós-natal e processo de envelhecimento, as variações da expressão do MCH na área hipotalâmica lateral de ratos, e assim, aumentar o conhecimento atual sobre a expressão do MCH, a quantidade e distribuição de neurônios MCH-ir em função da idade

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para estudar as variações da expressão do MCH na LHA durante o desenvolvimento pós-natal e processo de envelhecimento, foram constituídos 7 grupos experimentais, com 5 animais cada, em idades pós-natais (14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias) representativas de diferentes faixas etárias em ratos (QUINN, 2005; ANDREOLLO et al., 2012). Todos os animais foram eutanasiados por perfusão transcardíaca, fixados e seus encéfalos coletados. Cada encéfalo teve a região do hipotálamo seccionada em 5 séries de cortes obtidos em micrótomo de congelamento.

Em todos os casos experimentais, uma série de cortes foi destinada à realização de protocolo de imuno-histoquímica para o MCH e outra série destinada à realização de hibridização *in situ* para o RNAm do ppMCH. Para referência citoarquitetônica, todas as séries foram contra-coradas com tionina. As demais séries foram armazenadas para possível repetição dos protocolos, caso fosse necessário.

Para a contagem dos neurônios MCH-ir na LHA, foi realizada a estimativa do número de neurônios por meio de estereologia, utilizando o programa de computador Stereo Investigator (MicroBrightField, MBF Bioscience, versão 10).

O estudo da distribuição dos neurônios MCH-ir foi realizado através do mapeamento e da elaboração de um modelo de reconstrução tridimensional do hipotálamo com a área hipotalâmica lateral e suas principais referências citoarquitetônicas, utilizando o programa de computador Neurolucida (MicroBrightField, MBF Bioscience, versão 10).

A fim de comparar a quantidade de RNAm para o ppMCH na LHA entre os grupos etários, foi

realizada análise semi-quantitativa, por meio da densidade óptica média e integrada, dos grãos de prata depositados sobre os neurônios após a realização do protocolo de hibridização *in situ* com sonda marcada com radioisótopo ^{35}S .

Os dados quantitativos obtidos na análise estereológica e densitométrica foram analisados quanto sua significância estatística ($p < 0,05$).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Todos os experimentos propostos nesse projeto necessitaram da utilização de animais de experimentação, não existindo método alternativo. Tratamos de tomar o maior cuidado possível no planejamento, preparação e execução dos experimentos para incrementar ao máximo as possibilidades de êxito, o que supõe uma redução do número de animais utilizados. Esse preceito foi seguido na elaboração dos protocolos experimentais, aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (Protocolo CEUA/IBB N^o. 488).

Utilizaram-se ratos albinos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Sprague-Dawley* como modelo experimental, criados no Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Essa espécie é representativa dos mamíferos roedores e já foi utilizada para o mapeamento do MCH no sistema nervoso central (BITTENCOURT et al., 1992) e estudos ontogenéticos desse neuropeptídeo com as técnicas de imuno-histoquímica e hibridização *in situ* (BRISCHOUX et al., 2001; STEININGER et al., 2004). Os animais foram alojados em gaiolas (33x17x18cm) com livre acesso à água e ração, em biotério com temperatura controlada (21 a 24°C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7h).

Os animais foram divididos em sete grupos experimentais com cinco animais cada ($n = 5$), que foram eutanasiados por perfusão transcardíaca em idades representativas do desenvolvimento pós-natal e processo de envelhecimento: lactente (14 dias), pré-púbere (28 dias), púbere (50 dias), adulto jovem (90 dias), adulto maduro (210 dias), adulto senescente (540) e adulto senil (750 dias) (QUINN, 2005; ANDREOLLO et al., 2012).

Para a obtenção dos animais de 14 e 28 dias, foi realizado o acasalamento de ratos da linhagem *Sprague-Dawley* (Apêndice A). Inicialmente, os casais de animais permaneceram no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências de Botucatu, até atingirem idade reprodutiva. Após esse período, uma fêmea foi introduzida na caixa de um macho para acasalamento durante a noite. Na manhã seguinte, a fêmea foi retirada para coleta de lavado vaginal e preparo de lâmina corada com eosina, hematoxilina e Orange G, com objetivo de verificar a presença de espermatozoides. Esse procedimento foi realizado durante 6 dias consecutivos, ultrapassando a duração do ciclo estral de ratos da linhagem *Sprague-Dawley*, a fim de que o acasalamento obtivesse êxito. A presença de espermatozoides no lavado vaginal foi considerada o dia 0 de gestação (Figura 4) e, após a confirmação da prenhez, cada fêmea foi transferida para uma caixa individual.

A gestação das fêmeas foi acompanhada diariamente até seu último dia (21^o ou 22^o dia). O dia em que foi detectada a presença da prole, foi considerado dia 0 pós-natal.

Nos dias pós-natais 14 e 28, datas correspondentes aos grupos experimentais, foi realizado um processo de sexagem dos animais através da observação da distância anogenital (Figura 5), a fim de selecionar para o estudo, exclusivamente, animais machos. Os machos selecionados foram pesados e imediatamente conduzidos ao procedimento de perfusão transcardíaca e preparo de material biológico, evitando que houvesse restrição alimentar aos animais lactentes (14 dias) ou estresse pela separação materna.

Preparo do material biológico

A intervenção para a eutanásia dos animais foi realizada sob anestesia profunda. Antes de se iniciar qualquer procedimento ou imobilização do animal, sempre foi comprovada a ausência do reflexo de retirada do membro como sinal de anestesia eficaz. Como anestésico, utilizamos uma dose letal de solução de hidrato de cloral (400mg/kg) por via intraperitoneal. Os animais de todos os grupos foram perfundidos com solução salina 0,9% (30ml/minuto), seguida de solução fixadora de formaldeído a 4%, recém-preparado a partir paraformaldeído, em tampão fosfato 0,1M pH7,4, durante 30 minutos. O fluxo de passagem das soluções foi reduzido e adaptado para os grupos de 14 dias (10ml/min) e 28 dias (18 ml/min), para que a fixação dos tecidos fosse eficaz da mesma forma que nos animais de faixa etária mais avançada.

Após a perfusão, os animais ficaram em repouso por cerca de 30 minutos para aprimorar a fixação do tecido. Foi realizada craniotomia dorsal e os encéfalos foram retirados da caixa craniana, divididos em dois blocos por uma secção coronal ao nível dos colículos superiores com o auxílio de uma matriz para encéfalos (Insight Ltda.) e pós-fixados na mesma solução fixadora durante uma noite a 4°C. Posteriormente, os blocos foram transferidos para solução de tampão fosfato 0,1M com 30% de sacarose para crioproteção até o momento da microtomia.

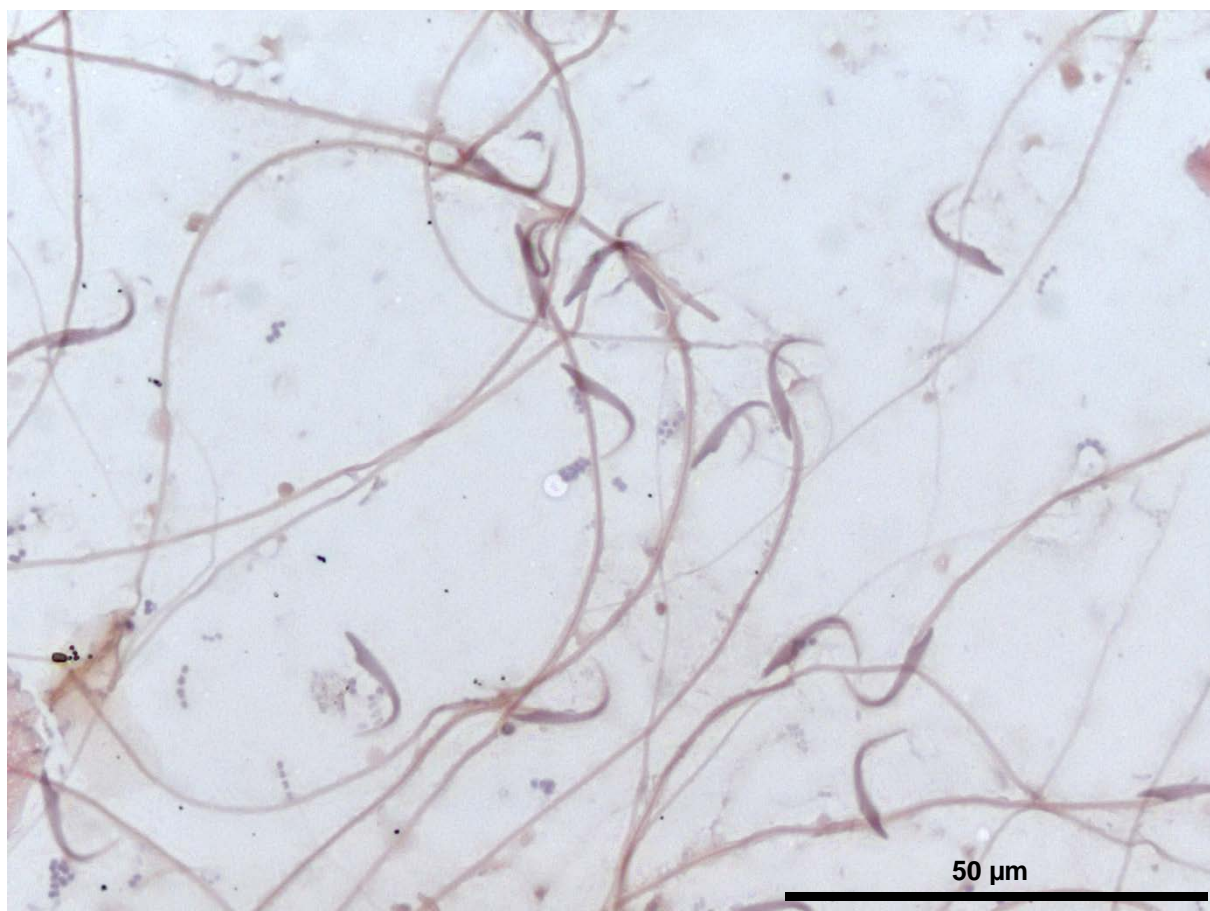


Figura 4: Fotomicrografia de lavado vaginal com presença de espermatozoides, corados com eosina, hematoxilina e Orange G (Apêndice A), caracterizando o dia 0 de gestação.

Os blocos foram congelados e cortados no plano coronal em secções de 30µm de espessura com um micrótomo de deslizamento (Leica SM2010R) equipado com platina congeladora (BFS-30MP, Physiotemp Inc.). Os cortes foram recolhidos, sequencialmente, em uma série de 5 frascos preenchidos com solução anti-congelante (30% de etilenoglicol e 20% de glicerol em 1XPBS 0,1M), de maneira que o intervalo entre os cortes consecutivos em cada frasco foi de 150µm. As séries de cortes foram armazenadas a -20°C.

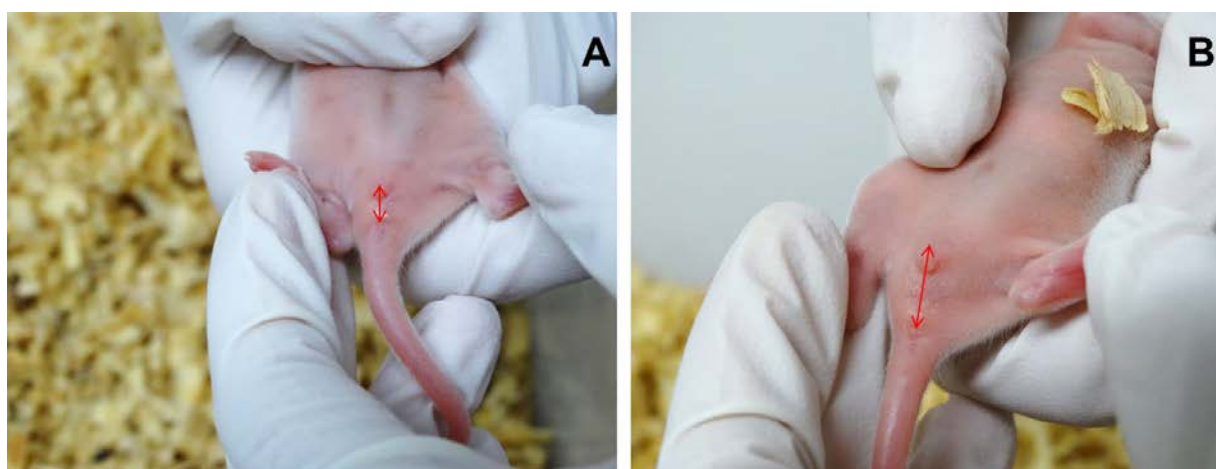


Figura 5: Fotografia do períneo em rato fêmea (A) e macho (B) da linhagem *Sprague-Dawley* de 10 dias de idade. A seta indica a distância anogenital que é utilizada como critério para sexagem.

Desde a perfusão até o armazenamento das séries de cortes, todo o cuidado foi tomado para evitar a contaminação dos tecidos por RNAses para a posterior realização do protocolo de hibridização *in situ*. As soluções foram preparadas com água purificada tratada com dietilpirocarbonato a 0,1% (DEPC) e autoclavadas. O material utilizado para todas as etapas descritas, que antecede o protocolo de hibridização *in situ*, foi higienizado e autoclavado ou descontaminado com solução Rnase AWAY® (Invitrogen, #10328-011) para que qualquer contaminação prévia fosse evitada.

Todas as substâncias tóxicas foram manipuladas em uma capela extratora de gases, na qual foram preparados os fixadores, perfundidos os animais, realizadas as reações imuno-histoquímicas com DAB e manipuladas substâncias para desidratação e montagem das lâminas para microscopia óptica.

Protocolo de imuno-histoquímica para o MCH

Esse protocolo foi utilizado para identificar de forma permanente as células MCH-ir na área hipotalâmica lateral, para posterior contagem por estereologia. O protocolo de imuno-histoquímica para o MCH foi padronizado após o teste de três diferentes protocolos para a técnica, seguido de testes de diluição para diferentes concentrações de anticorpo primário anti-MCH, utilizando o protocolo de maior êxito. Para as provas de diluição, foram utilizadas secções histológicas de animais de 90 dias, idade representativa de um animal adulto jovem. As concentrações do anticorpo primário testadas foram: 1:1000, 1:3000, 1:6000, 1:10000, 1:30000 e 1:70000. O mesmo protocolo, com melhor relação entre o sinal (imunorreatividade) e a marcação inespecífica (marcação de fundo), foi utilizado em todos os grupos experimentais (Apêndice B).

Após a determinação do protocolo, a concentração ideal para o anticorpo primário anti-MCH foi selecionada por testes de diluição, ficando definida a concentração de 1:6000 como a que promovia a melhor relação entre sinal e fundo.

Inicialmente, os cortes histológicos foram lavados em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, passando à inibição da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 3% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Posteriormente, os cortes foram lavados em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e TBS-Tx 0,05M pH 7,6 (Trisma Base, NaCl 0,85% e Triton-x 0,25%) e incubados em solução para bloqueio da marcação inespecífica contendo soro normal de cabra (Vector Laboratories) a 2% em TBS-Tx. Finalizando a primeira etapa do protocolo, os cortes foram incubados em solução de anticorpo primário anti-MCH do rato, produzido em coelho, na concentração de 1:6000 e TBS-Tx por 48h, em temperatura de 4°C e sob constante agitação. O anticorpo primário foi gentilmente cedido pelo Dr. Wylie W. Vale e Dr. Joan Vaughan (Salk Institute, La Jolla, CA, USA), do mesmo lote (PBL #234) previamente testado quanto à especificidade por meio de testes de adsorção do anticorpo com concentrações microMolares crescentes do peptídeo sintético e co-localização com a marcação obtida com hibridização *in situ* (BITTENCOURT et al., 1992).

Após 48 horas de incubação, os cortes foram lavados em TBS-Tx 0,05M pH 7,6 e incubados em anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho (Vector Laboratories), produzido em cabra, na concentração de 1:200 (BA-1000 Vector) por 2 horas em temperatura ambiente, lavados em TBS-Tx e incubados em complexo avidina-biotina peroxidase (Vectastain Elite ABC Kit, PK-6100), diluído em TBS-Tx a 1:200, por 2 horas em temperatura ambiente. Esse método baseia-se na grande afinidade

que a molécula de avidina tem pela molécula de biotina, com constante de dissociação na ordem de 10^{-15} (HSU et al., 1981).

Em seguida, os cortes foram lavados em TBS-Tx e em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 para retirada do complexo ABC. Finalmente, a peroxidase unida ao complexo ABC foi evidenciada pela reação de peróxido de hidrogênio, utilizando como cromógeno o 3,3' diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB), reforçado com níquel amônio sulfato (DAB-Ni), que gera um produto de reação estável na cor negra (HSU e SOBAN, 1982).

Após o processo de imuno-histoquímica, os cortes foram transferidos para uma solução de gelatina 0,4%, em tampão Tris-HCl 0,05M, e montados em lâminas de vidro sequencialmente, de caudal para rostral. As séries foram contra-coradas com tionina pelo método de Nissl, para referência citoarquitetônica e as lâminas foram cobertas com lamínulas, utilizando Permont® (Fisher Scientific) como meio de montagem.

Estudo Citoarquitetônico pelo método de Nissl

A coloração de Nissl tem por objetivo evidenciar estruturas basófilas do tecido nervoso, especialmente o retículo endoplasmático rugoso, presente em grande quantidade nos corpos celulares de neurônios. Dessa forma, esse protocolo é utilizado com frequência para referência citoarquitetônica (KADAR et al., 2009).

Primeiramente, os cortes foram montados em lâminas de vidro, a partir de uma solução de gelatina 0,4% em tampão Tris-HCl 0,05M, sequencialmente de caudal para rostral. Após a imersão em formol 10% por 30 minutos, o protocolo para a coloração de Nissl consistiu em realizar a desidratação dos cortes por meio de banhos de álcool etílico de concentração crescente (de 95% a 100%), dissolução dos lipídeos com dois banhos de xilol, reidratação dos cortes por meio de banhos de álcool etílico de concentração decrescente (de 100% a 50%), coloração com solução de tionina a 0,25% (Fisher #T-409) com 1,2% de ácido acético glacial e 0,144% de NaOH seguida de mergulhos em água deionizada. Em seguida, foi realizada uma nova desidratação com álcoois etílicos (50% a 100%), imersão em três banhos de xilol e cobertura das lâminas com lamínula, utilizando Permont® como meio de montagem (PAXINOS e WATSON, 2005).

Hibridização *in situ*

Utilizamos a técnica de hibridização *in situ* para mapeamento e quantificação do RNAm do ppMCH na área hipotalâmica lateral, seguindo o protocolo estabelecido no Laboratório de Neuroanatomia Química, Departamento de Anatomia/ICB-USP (RONDINI et al., 2007; SITA et al., 2007; ELIAS et al., 2008; RONDINI et al., 2010), onde foram realizados esses experimentos sob orientação do Prof. Titular Jackson Cioni Bittencourt (Apêndice C). A hibridização *in situ* possibilita realizar medidas semi-quantitativas de alterações na expressão gênica de regiões específicas do sistema nervoso central, em diversas condições fisiológicas e comportamentais.

As sondas foram produzidas por transcrição *in vitro* utilizando o cDNA do ppMCH (gentilmente cedido pelo Dr. Paul Sawchenko), 35 S-UTP, Δ NTP, RNasin, RNA polimerase específica de acordo com o mapa do plasmídeo e tampão de transcrição, incubados à 37°C por 1 hora. Os NTPs não incorporados foram removidos em micro colunas de resina (Probe Quant G-50), por meio

de centrifugação a 3500rpm por 2 minutos, na temperatura de 4°C. Posteriormente, duas amostras, contendo 1µl da sonda em cada, foram preparadas para realizar a contagem de incorporação do radioisótopo ³⁵S em aparelho de cintilação. Essa etapa é fundamental para determinar a quantidade de sonda a ser adicionada na solução de ribossonda durante a hibridização e permite que as secções de todos os grupos experimentais sejam hibridizadas com sondas de igual teor de ³⁵S.

Foram utilizadas as ribossondas marcadas em tampão de hibridização contendo 0,01% DNA de esperma de salmão, 0,01% RNAt de levedura, 0,05% RNA total de levedura, 10mM DTT, 10% sulfato dextrana, 0,3M NaCl, 1Mm EDTA, pH 8,0 e 1x solução de Denhardt (Sigma), SDS 10%, N-tiosulfato 10%, em 50% formamida.

Os cortes histológicos de encéfalo foram montados em lâminas *RNase-free*, com carga eletrostática (Fisher Superfrost Plus®), sequencialmente, da região caudal para rostral da LHA, utilizando 1XPBS *RNase-free* com 4 gotas de formalina para neutralização de possíveis contaminações por RNases.

Então, o material foi imerso em solução fixadora de formaldeído a 4% em 1XPBS, para preservação da morfologia do tecido nervoso, e em seguida, pré-tratados em solução de Proteinase K (0,5µg/ml), a fim de realizar digestão proteica e facilitar a penetração da sonda. Posteriormente, o material foi acetilado em 0,1M trietanolamina (TEA-HCl) pH 8,0 e anidrido acético em temperatura ambiente, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico e deslipidificados em xilol.

As lâminas foram colocadas em uma placa preparada com papel de filtro umedecido com 4XSSC para evitar o ressecamento do material e da solução de hibridização. A ribossonda, em tampão de hibridização, foi aplicada sobre as lâminas (100µl/lâmina) que foram cobertas com lamínulas flexíveis estéreis e levadas para a estufa de hibridização a 57°C por aproximadamente 18 horas .

Posteriormente, as lamínulas foram removidas espontaneamente em 2XSSC e o excesso de ribossonda no tecido foi lavado com solução de RNase A (20µg/mL, preparada com tampão contendo 5M NaCl, 1M de Tris-HCl pH8.0, 0,5M EDTA pH 8,0) em temperatura ambiente. Os cortes foram submetidos a banhos de estringência crescente (50°C em 2xSSC + 1mM de DTT, 55°C em 0,2xSSC + 1mM de DTT e 60°C em 0,2xSSC + 1mM de DTT) e desidratados em álcool etílico a 70% + 20XSSC.

Após a secagem, as lâminas foram transferidas para cassetes e colocadas em contato com filme auto-radiográfico (Kodak – Biomax MR), permanecendo por 2 dias. Transcorrido o tempo de exposição, os filmes auto-radiográficos foram revelados em solução reveladora Kodak®, lavados em água e imersos em solução fixadora Kodak®, sendo possível verificar se o processo de hibridização obteve êxito. Em seguida, as lâminas foram imersas em emulsão fotográfica (NBT - II Kodak) e estocadas em freezer -30°C.

Passados 12 dias, as lâminas foram reveladas com revelador e fixador Kodak®, processadas segundo método de coloração de Nissl para obtenção de referência citoarquitetônica, desidratadas e cobertas com lamínula utilizando-se DPX como meio de montagem.

Forma de análise dos resultados

Os resultados foram observados em microscópio óptico utilizando as técnicas de microscopia de campo claro. A quantidade de neurônios que apresentaram imunorreatividade ao anticorpo anti-

MCH, sua distribuição, assim como a área e o volume da LHA foram analisados por meio de estereologia e reconstrução tridimensional. Para a contagem e mapeamento dos neurônios MCH-ir na área hipotalâmica lateral, foi realizada estereologia em 5 animais de todos os grupos etários e a reconstrução tridimensional de um animal representativo de cada grupo etário. A quantidade relativa de RNAm para o ppMCH entre os grupos experimentais (n=5), evidenciada pelo protocolo de hibridização *in situ*, foi estimada por densitometria óptica.

Estudo estereológico dos neurônios MCH-ir da área hipotalâmica lateral

O número de neurônios MCH-ir da LHA foi estimado utilizando princípios estereológicos de amostragem sistemática e aleatória (GUNDERSEN e JENSEN, 1987; GUNDERSEN et al., 1988; WEST e GUNDERSEN, 1990; WEST et al., 1991; KULESZA et al., 2002). A técnica de estereologia é um método que determina parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de secções bidimensionais. Para sua execução, foi utilizado o programa Stereo Investigator (MBF Bioscience, MicroBrightfield, Inc., Colchester, VT, USA) e empregado o protocolo de fracionador óptico, que se baseia nos princípios de dissector e fracionador óptico (GUNDERSEN et al., 1988). Para essa análise, foi selecionada uma série de cortes (1 em cada 5 cortes seriados = intervalo de secção) destinados ao protocolo de imuno-histoquímica do MCH em cada caso experimental. As estimativas foram realizadas bilateralmente (Apêndice D).

Em cada secção, sobre as imagens transmitidas ao programa por uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio óptico, os limites da LHA esquerda e direita foram delineados a partir do centro do fórnix (Figura 6), seguindo ventrolateralmente em direção a superfície ventral do hipotálamo até a capsula interna, que foi contornada até a altura do núcleo subtalâmico para então dirigir-se horizontalmente em direção medial, para encontrar com a linha reta que une o trato mamilotalâmico ao fórnix (PANKSEPP, 1979; KESSLER et al., 2011). Os neurônios MCH-ir foram selecionados a partir de uma janela de contagem quadrada (70 μm de lado = fração de área, Figura 7), constituída por duas linhas de inclusão (verdes) e três linhas de exclusão (vermelhas). A espessura média de cada secção foi determinada a partir de vários pontos de observação com objetiva de imersão a óleo e aumento de 100x (NA=1,45), selecionando o topo e base do tecido.

Para os cálculos estereológicos, foram determinadas como zonas de segurança no eixo Z (fração de dissecção) no mínimo 2 μm superiores e inferiores de cada secção, assim o dissector foi fixado no centro do tecido com altura de 5 μm , evitando qualquer viés gerado pela compressão do tecido após os protocolos de imuno-histoquímica e coloração de Nissl. Somente foram contados os neurônios que estavam em foco, entre as zonas de segurança, e que não tocassem as linhas de exclusão da janela de contagem (Figura 7).

A precisão das estimativas da contagem neuronal, em cada série de cortes (caso experimental), foi avaliada usando como parâmetro o coeficiente de erro de Gundersen ($m=1$) (GUNDERSEN e JENSEN, 1987; SLOMIANKA e WEST, 2005). A amostragem foi considerada apropriada com coeficiente de erro menor que 0,10 (WEST e GUNDERSEN, 1990; LIM et al., 2014). A área e o volume da LHA foram estimados pelo método de planimetria a partir da delimitação da área de interesse e aplicação do método de Cavalieri. A área total da LHA é o resultado da soma das áreas da LHA em cada corte em que ela se apresenta. Os resultados, descritos em média e desvio-

padrão, foram comparados e analisados estatisticamente quanto à sua significância através de ANOVA ($p < 0,05$), com pós-teste de Tukey.

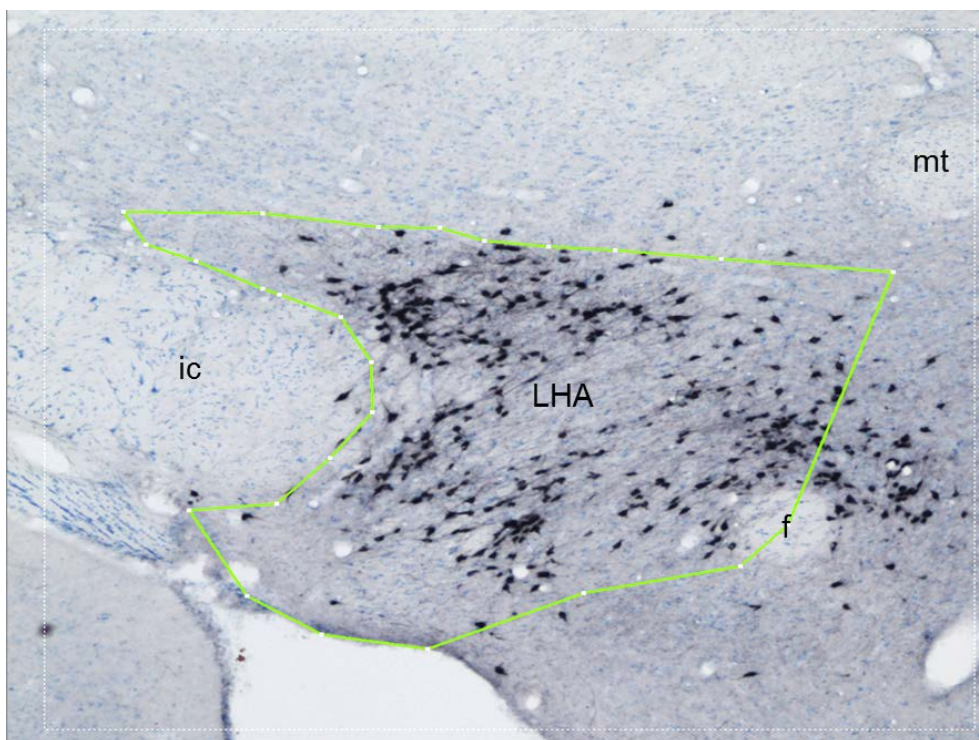


Figura 6: Imagem da janela de observação tecidual do programa *Stereo Investigator*, obtida em tempo real através de câmera digital acoplada ao microscópio óptico. A LHA foi delimitada utilizando referências citoarquitetônicas: cápsula interna (ic), fórnice (f) e trato mamilotalâmico (mt).

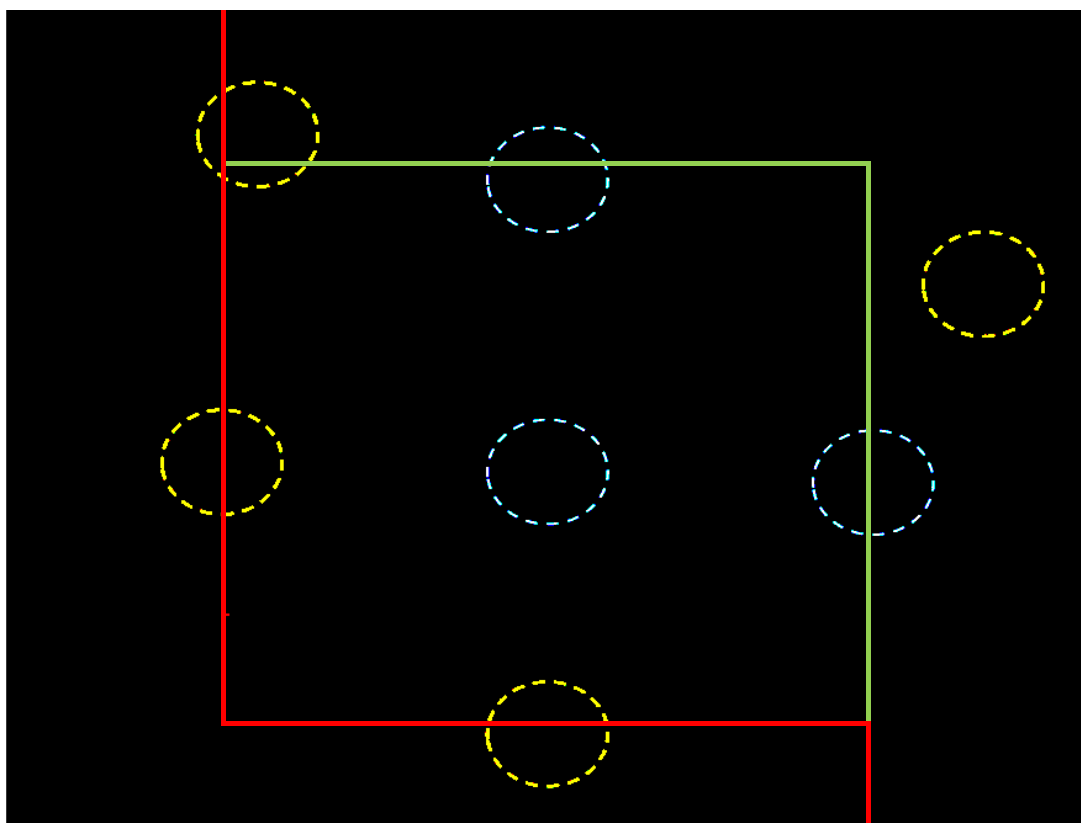


Figura 7: Esquema de uma janela de contagem do programa *Stereo Investigator*. Linhas de inclusão (verdes) e linhas de exclusão (vermelhas). Os círculos tracejados em azul representam corpos celulares de neurônios que seriam contados durante a análise estereológica e os círculos tracejados em amarelo representam corpos de neurônios que seriam excluídos durante a contagem.

Mapeamento e reconstrução tridimensional dos neurônios MCH-ir

Os neurônios MCH-ir do hipotálamo de um caso de cada grupo experimental foram representados em figuras esquemáticas, em duas dimensões, e em modelos tridimensionais, com ênfase nos neurônios MCH-ir dentro e fora da LHA, para estabelecer uma relação entre os diferentes grupamentos MCH-ir do hipotálamo durante o processo de envelhecimento.

A reconstrução tridimensional foi realizada com auxílio do sistema Neurolucida (versão 10, MBF Bioscience, MicroBrightfield, Inc.) com a finalidade de facilitar a compreensão da distribuição dos neurônios MCH-ir, pois, dessa forma, é possível obter uma visualização integrada nos 3 planos do espaço. O sistema é composto por um programa de computador conectado a um microscópio óptico motorizado, equipado com câmera de vídeo. Para esse protocolo, utilizamos, em cada caso experimental, uma série de cortes submetida à imuno-histoquímica para MCH e contra-corada pelo método de Nissl.

As etapas para realização dos modelos 3D incluíram a calibração do programa inserindo informações sobre o intervalo de avaliação e número de secções utilizadas na reconstrução, definição dos contornos que limitam as estruturas de referência citoarquitetônica, identificação dos neurônios MCH-ir pertencentes à LHA e a outras regiões adjacentes em cada secção, e alinhamento individual de cada nova secção com respeito a sua antecessora imediata.

Em cada secção foram delineados: o contorno externo do encéfalo na região do hipotálamo de ambos antímeros; a marca de lateralidade realizada pela passagem de uma agulha gengival 31G no bloco de tecido antes da microtomia; o sistema ventricular representado pelo aqueduto cerebral e III ventrículo, com seus recessos; os tratos ópticos e núcleos importantes do hipotálamo medial (núcleos ventromedial, dorsomedial e paraventricular do hipotálamo de ambos lados); e as referências citoarquitetônicas que limitam a área hipotalâmica lateral como o fórnice, o trato mamilotalâmico e a cápsula interna.

Além desses contornos, também foi delineado o limite da LHA segundo os mesmos critérios utilizados nas análises de densitometria óptica e estereologia. Imagens dos contornos, marcadores e do modelo tridimensional foram capturadas para confecção de pranchas e o modelo também foi representado em forma de PDF interativo 3D (vide instruções no Apêndice F).

A partir dos modelos tridimensionais reconstruídos, foram obtidos de cada animal dados quantitativos a respeito da quantidade e da distância entre os neurônios MCH-ir dentro da LHA (MCH-LHA) e dos neurônios MCH-ir que estão em grupamentos adjacentes (MCH-OUT), demonstrando o nível de compactação dessas células na região de interesse e fora dela.

Densitometria óptica

As séries de cortes submetidas ao protocolo de hibridização *in situ* foram analisadas através da quantificação relativa do RNAm para o ppMCH por meio das medidas de densidade óptica média e integrada dos grãos de prata da emulsão fotográfica, precipitados pela radioatividade da sonda marcada com radioisótopo ³⁵S. Além dessas duas medidas semi-quantitativas, foi também analisada a área marcada por esses grãos, visto que a unidade de densidade óptica integrada (DOI) é o produto entre a densidade óptica média e área marcada.

Primeiramente, o microscópio óptico (Axioplan2, Carl Zeiss), equipado com câmera digital (axioCam HRc, Zeiss), foi ajustado para obter a condição ótima de iluminação com a objetiva de aumento de 10X (NA=0,25), utilizada para captura de todas as imagens. Nesse momento, centralizou-se o feixe de luz no CCD da câmera digital e fixou-se a intensidade de iluminação observando-se o histograma de brilho RGB da imagem, a fim de distribuí-lo ao longo do espectro dinâmico da câmera digital. Todos os parâmetros de iluminação do campo, abertura dos diafragmas, jogos de filtros e tempo de exposição da câmera foram controlados manualmente para evitar que houvesse variação desses parâmetros em uma mesma sessão de captura de imagens.

Em cada sessão de captura, inicialmente foram adquiridas 11 imagens de referência para calibração de densidade óptica, representativas de densidades entre 0,04 e 1,0 (Figura 8), a partir de um filtro escalonado de densidade óptica neutra (Edmund Industrial Optics, #32-599). A seguir, foram capturadas imagens de todos os campos de observação da LHA, nos dois antímeros, em todas as secções de uma série de cortes (Apêndice E).

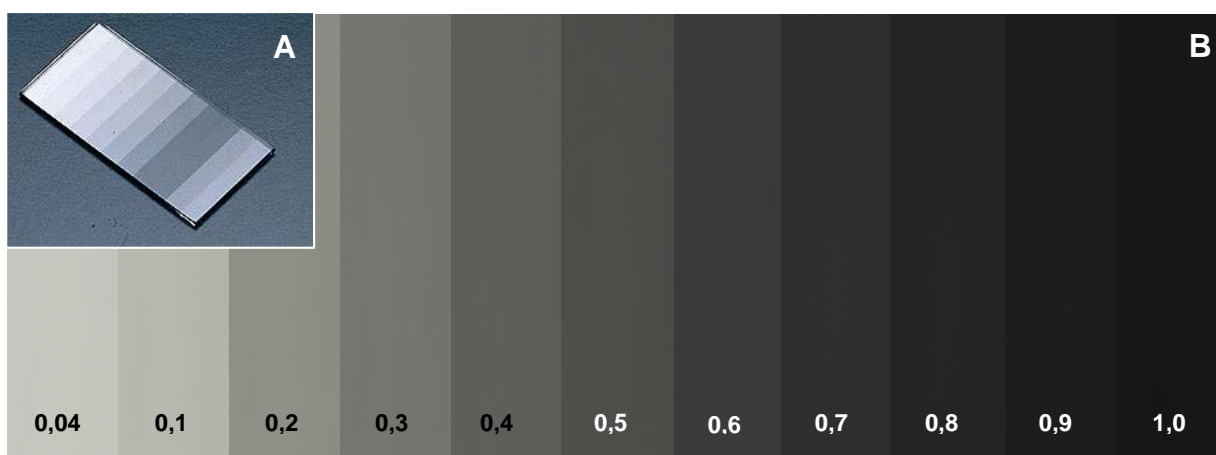


Figura 8: Representação do filtro de densidade óptica neutra utilizado para captura de imagens de referência para calibração de densidade óptica no programa ImageJ. Em A, filtro de densidade óptica. Em B, imagem representativa do escalonamento de densidades ópticas do filtro. Os valores indicam a densidade óptica de cada faixa do filtro.

Utilizando o programa PhotoShop® CS2 (version 9.0; Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA), as imagens da LHA capturadas ao microscópio foram unidas, como um mosaico, para a confecção de imagens panorâmicas de toda a LHA bilateralmente. Em cada lado, a LHA foi delimitada utilizando os mesmos critérios citoarquitetônicos descritos anteriormente (Figura 6), recortada e colada em nova figura com fundo branco contendo somente as LHA de ambos lados. Nessa etapa, eventualmente, foram removidos pequenos artefatos sobre o tecido que pudessem ser confundidos com o sinal da hidridização.

O programa ImageJ (version 1.47, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012) foi utilizado para realizar a quantificação comparativa da densidade óptica das secções do tecido entre os diversos grupos experimentais, o que reflete a quantidade do RNAm do ppMCH. Para análise de cada conjunto de imagens capturadas em uma mesma sessão, inicialmente foi realizada a calibração da densidade óptica utilizando as imagens de referência com escala crescente de níveis de cinza. Os resultados, descritos em média e desvio-padrão, foram comparados e analisados estatisticamente quanto à sua significância através de ANOVA ($p < 0,05$), com pós-teste de Tukey, após comprovada a normalidade e homocedasticidade

dos dados. E os resultados, descritos em mediana e máximo, foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para dados não paramétricos ($p < 0,05$).

Apresentação das ilustrações científicas

Toda a iconografia científica foi digitalizada. As imagens foram trabalhadas com o programa PhotoShop® CS2 (version 9.0; Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA), ajustando o brilho, contraste e balanço de cores de acordo com o preconizado (SAPER, 1999; SCHENK et al., 1999) para preparação de imagens digitais para publicação científica e organizadas em figuras com o programa CorelDRAW® graphics suite X3 (Corel Corporation, Ottawa, Canada). As barras de calibração das fotomicrografias foram confeccionadas fotografando uma lâmina com escala micrométrica calibrada (Leica, Leitz Wetzlar), cuja menor divisão é de 100µm, com os mesmos equipamentos e aumentos do material histológico em questão. A nomenclatura e as abreviaturas utilizadas na descrição dos resultados foram baseadas no atlas estereotáxico do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2005).

RESULTADOS

Estudo citoarquitetônico do hipotálamo e da LHA

Finalizada a padronização da imuno-histoquímica para o MCH como descrito na seção de Materiais e Métodos, os cortes histológicos foram submetidos ao método de coloração de Nissl, para estudo citoarquitetônico do hipotálamo, identificando suas 04 regiões no sentido rostro-caudal (pré-óptica, anterior, tuberal e mamilar) e delimitação de seus principais núcleos (Figura 9). Além disso, foi realizado estudo citoarquitetônico da LHA identificando seus limites e sua divisão em 03 regiões no sentido ântero-posterior: anterior, tuberal e mamilar. As referências citoarquitetônicas observadas que permitiram essa divisão da LHA foram os núcleos bem evidentes do hipotálamo tuberal: núcleo dorsomedial, núcleo ventromedial e núcleo arqueado. Posteriormente a esses núcleos, na parte mamilar do hipotálamo, foi evidente o complexo mamilar. Anteriormente àqueles núcleos, no hipotálamo anterior, é evidente o núcleo paraventricular. Nesse estudo, também observamos a organização e distribuição dos neurônios MCH-ir na LHA (Figura 9).

Imuno-histoquímica para MCH

Com o objetivo de estudar o número e a distribuição dos MCH-ir na área hipotalâmica lateral, foi realizado o protocolo de imuno-histoquímica para o neuropeptídeo em todos os animais ($n=5$) de todos os grupos experimentais (14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias).

Todos os grupos experimentais apresentaram imunorreatividade para o MCH nas três regiões da área hipotalâmica lateral (Figuras 10, 11 e 12). Assim, essas observações ratificam a necessidade de se realizar a contagem dos neurônios MCH-ir nos diferentes grupos e analisar quantitativamente as possíveis variações nas diferentes faixas etárias, assim como verificar alterações no seu padrão de distribuição por meio de mapeamento e reconstrução tridimensional.

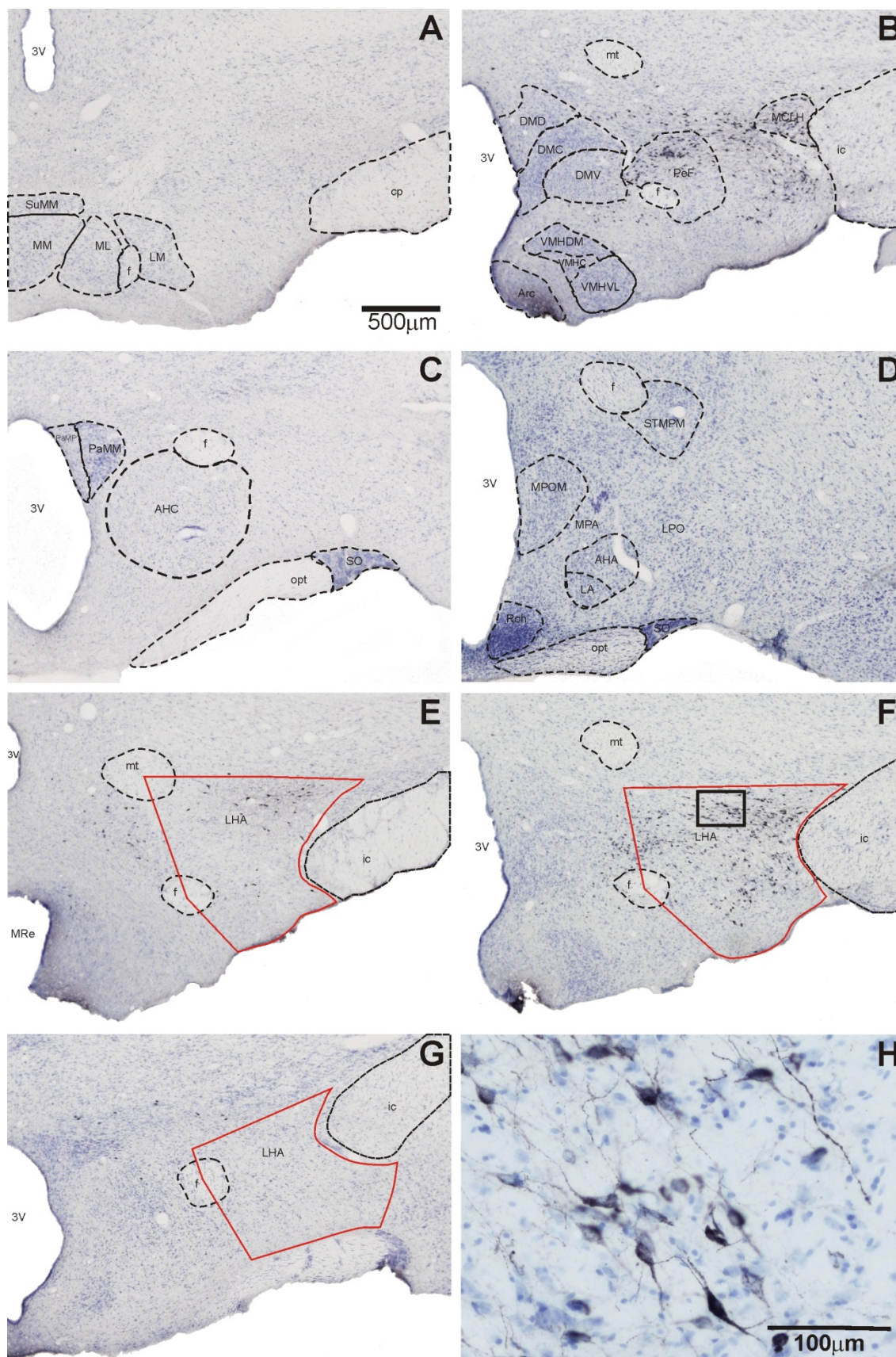


Figura 9: Citoarquitetura do hipotálamo e distribuição dos neurônios MCH-ir nas regiões mamilar (A), tuberal (B), anterior (C) e pré-óptica (D) do hipotálamo do rato. As linhas tracejadas indicam os limites citoarquitetônicos de estruturas representativas de cada região (núcleos e feixes de fibras nervosas). Os somas dos neurônios MCH-ir estão marcados com DAB-níquel, em negro. Em E, F e G, fotomicrografias da LHA delimitada pela linha vermelha nas regiões mamilar, tuberal e anterior respectivamente. Em H, detalhe em maior aumento da área delimitada pelo retângulo em F. A barra de calibração em A é válida para as imagens de B a G. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

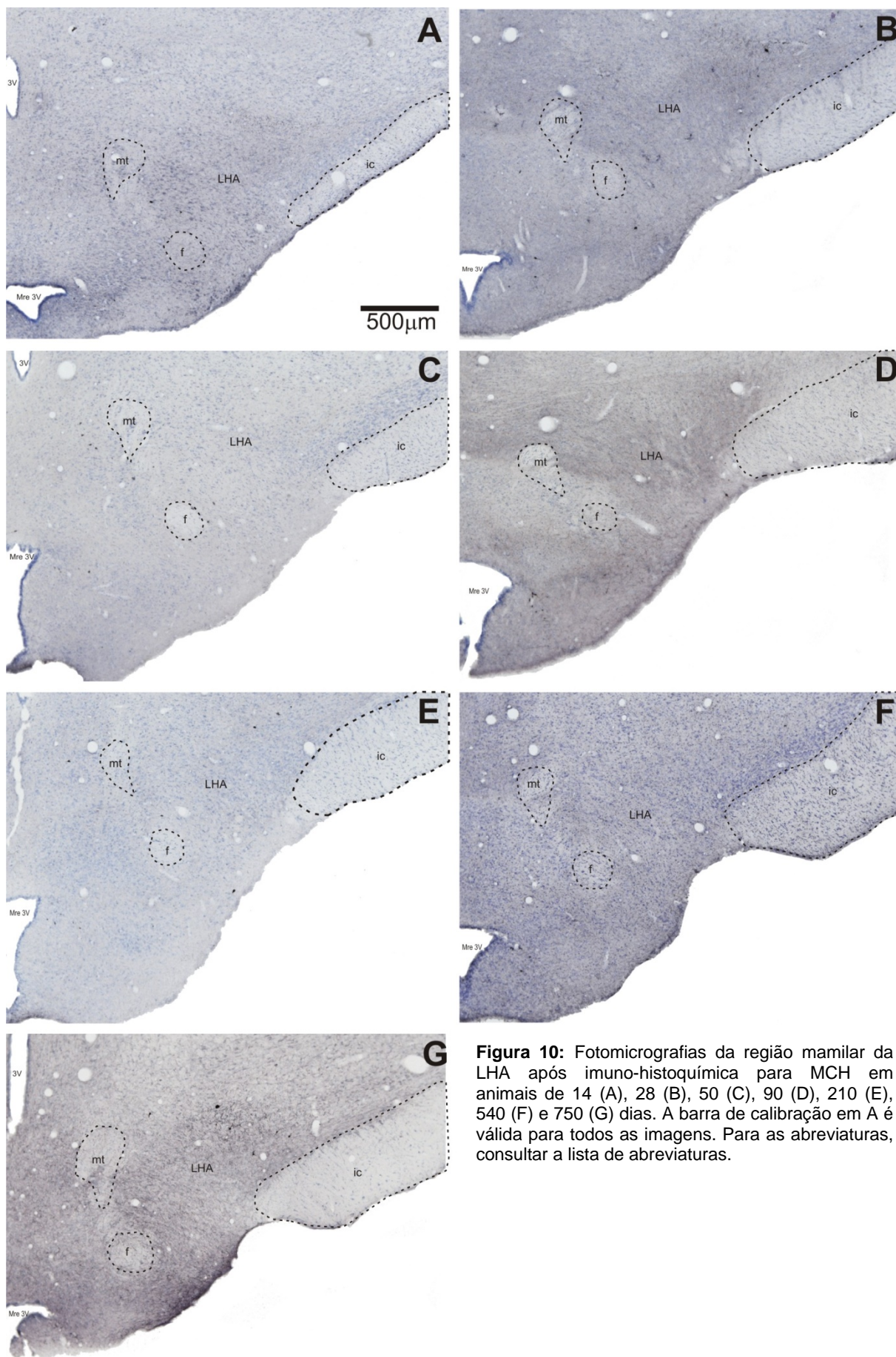


Figura 10: Fotomicrografias da região mamilar da LHA após imuno-histoquímica para MCH em animais de 14 (A), 28 (B), 50 (C), 90 (D), 210 (E), 540 (F) e 750 (G) dias. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens. Para as abreviaturas, consultar a lista de abreviaturas.

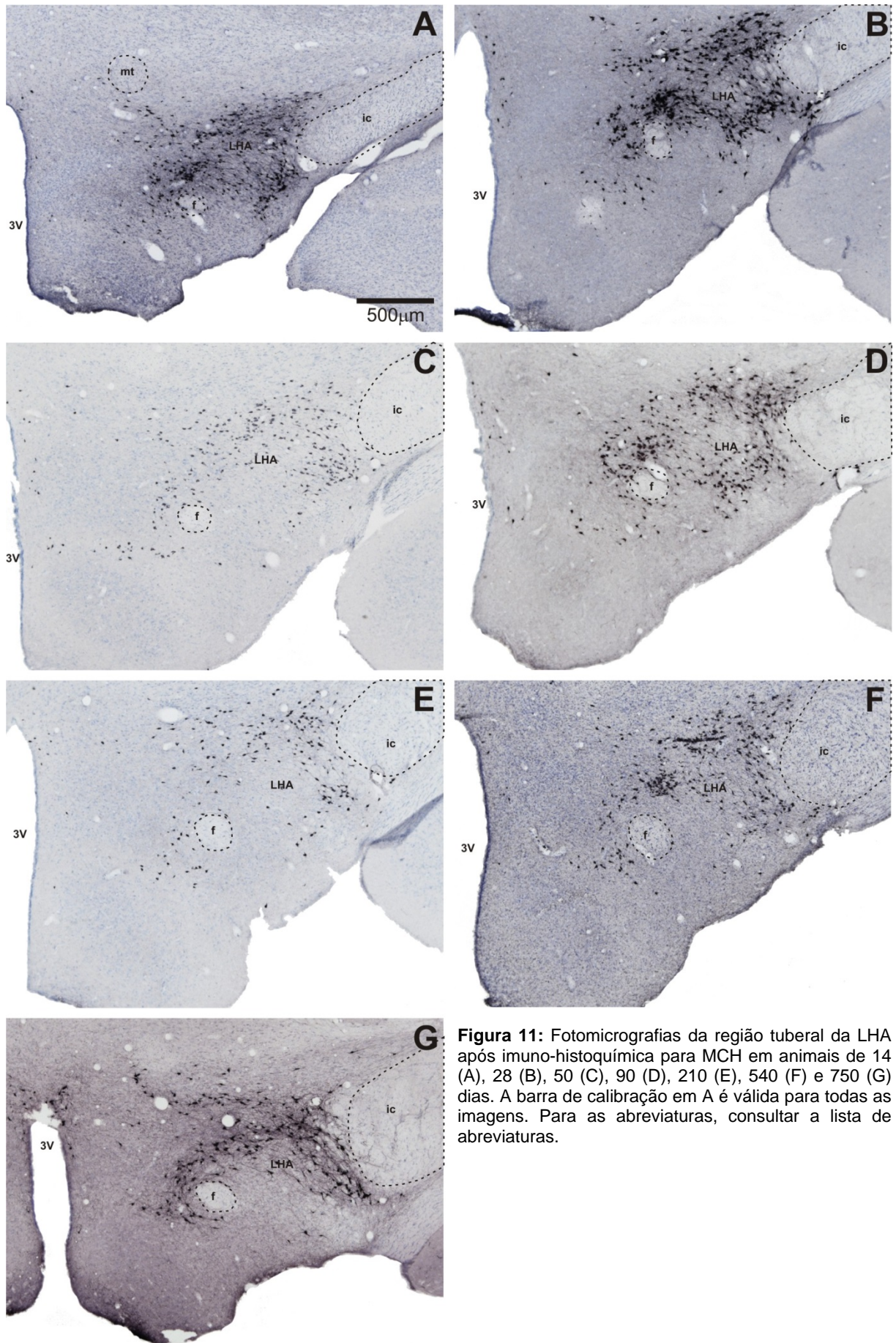


Figura 11: Fotomicrografias da região tuberal da LHA após imuno-histoquímica para MCH em animais de 14 (A), 28 (B), 50 (C), 90 (D), 210 (E), 540 (F) e 750 (G) dias. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens. Para as abreviaturas, consultar a lista de abreviaturas.

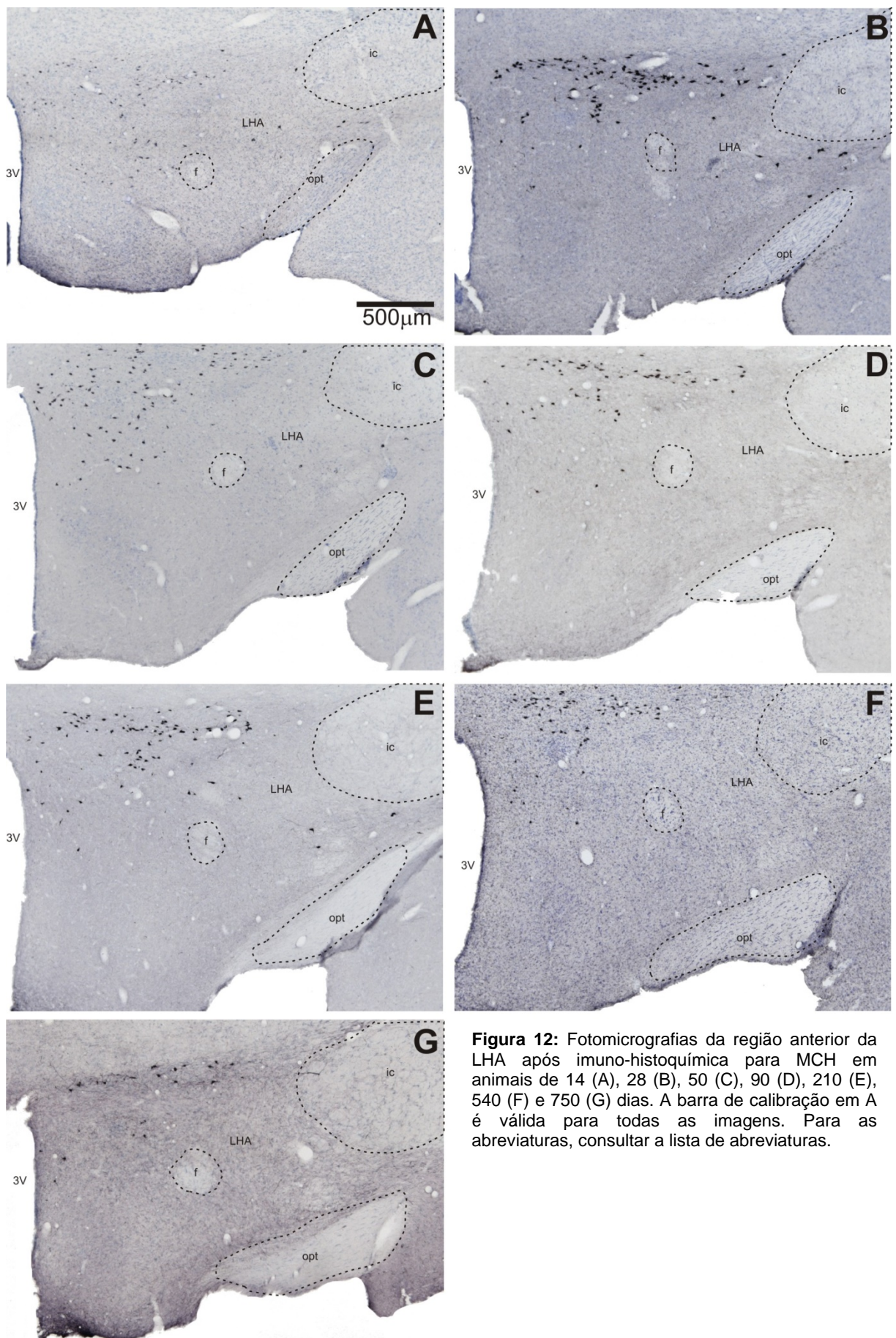


Figura 12: Fotomicrografias da região anterior da LHA após imuno-histoquímica para MCH em animais de 14 (A), 28 (B), 50 (C), 90 (D), 210 (E), 540 (F) e 750 (G) dias. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens. Para as abreviaturas, consultar a lista de abreviaturas.

Estudo estereológico dos neurônios MCH-ir da área hipotalâmica lateral

Todos os grupos experimentais foram analisados para a estimativa do número de neurônios MCH-ir na LHA bilateralmente, com 5 animais em cada grupo (exceto o grupo de 750 dias, n=4). Em cada animal, foi empregado o protocolo delineado para a análise estereológica. Em todas as estimativas o coeficiente de erro de Gundersen ($m=1$) esteve entre 0,04 e 0,08.

Considerando todos os grupos em conjunto, a LHA possui em média 30.490,51 ($\pm 7.208,53$) neurônios. O grupo de 14 dias (24.635 ± 5.307) apresentou a menor estimativa de número de neurônios MCH-ir na LHA em média e o grupo de 28 dias (37.934 ± 5.573) apresentou a maior estimativa, com diferença estatisticamente significativa entre estes grupos. Os demais grupos experimentais não apresentaram diferença significativa quanto ao número total de neurônios MCH-ir na LHA (Figura 13 e Apêndice G1), embora o número de neurônios apresente pequena variação entre os grupos de 50 (29.730 ± 6.093), 90 (33.947 ± 5.217), 210 (28.697 ± 5.856), 540 dias (33.612 ± 4.419) e 750 dias (27.891 ± 6.888).

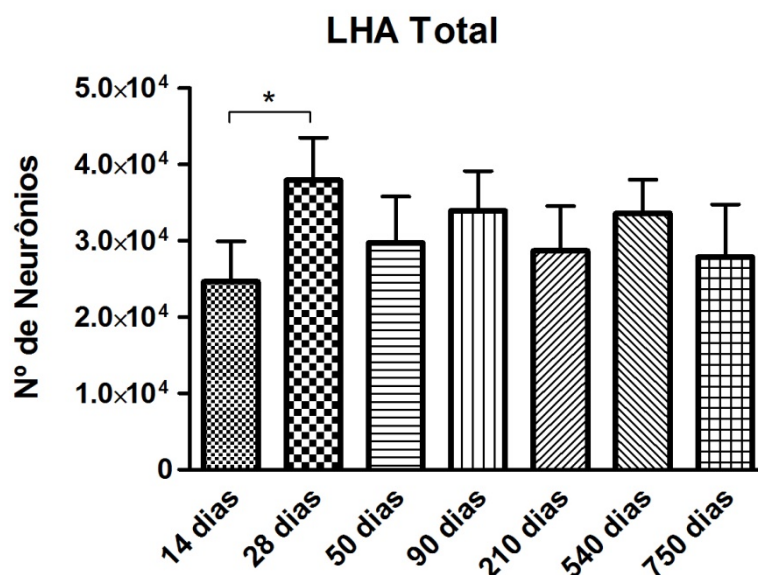


Figura 13: Média do número de neurônios MCH-ir na LHA total estimados por método estereológico, para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias. As barras de erro indicam o desvio-padrão (*= $p < 0,05$).

Também foram comparados através da estereologia, os valores da área e do volume da LHA total para todos os grupos. Considerando todos os grupos em conjunto, a LHA possui a área de $27.089.245,71 \mu\text{m}^2$ ($\pm 5.414.154,46$) e o volume de $4.063.387.142,86 \mu\text{m}^3$ ($\pm 812.122.131,58$). O grupo de 14 dias apresentou a menor média de área e volume da LHA entre todos os grupos, com diferenças estatisticamente significativas com os grupos de 28, 50, 90, 210 e 540 dias. No entanto, com o grupo de 750 dias não houve diferença significativa (Figuras 14 e 15 e Apêndices G2 e G3).

A estimativa do número de neurônios e do volume da LHA permitiu calcular a densidade neuronal da LHA. Considerando todos os grupos em conjunto, a LHA possui em média 7.607,51 ($\pm 1.735,66$) neurônios/ mm^3 . Embora a média de densidade neuronal varie entre 9.025,28 neurônios/ mm^3 para o grupo de 28 dias e 6.300,67 neurônios/ mm^3 para o grupo de 210 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Figura 16 e Apêndice G4).

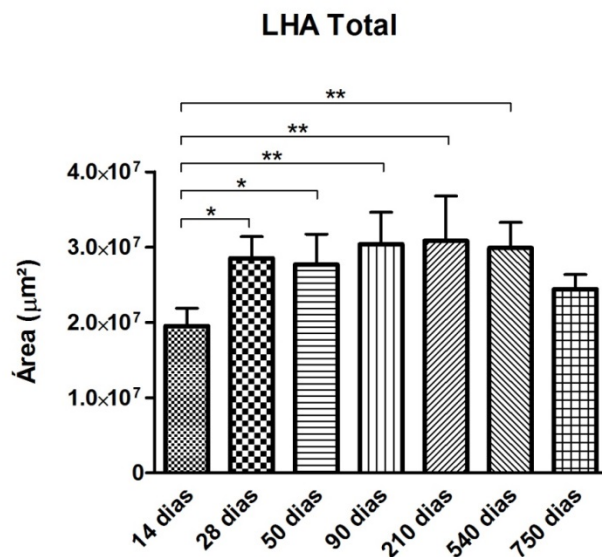


Figura 14: Média da área LHA total para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias. As barras de erro indicam o desvio-padrão (*= p<0,05, **=p<0,01).

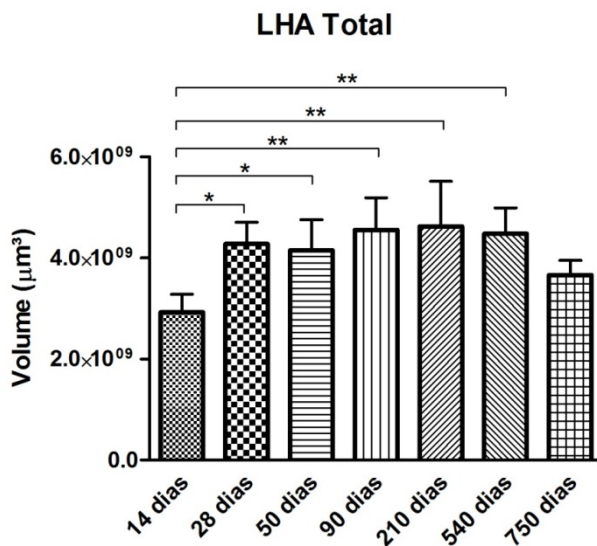


Figura 15: Média do volume da LHA total para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias. As barras de erro indicam o desvio-padrão (*= p<0,05, **=p<0,01).

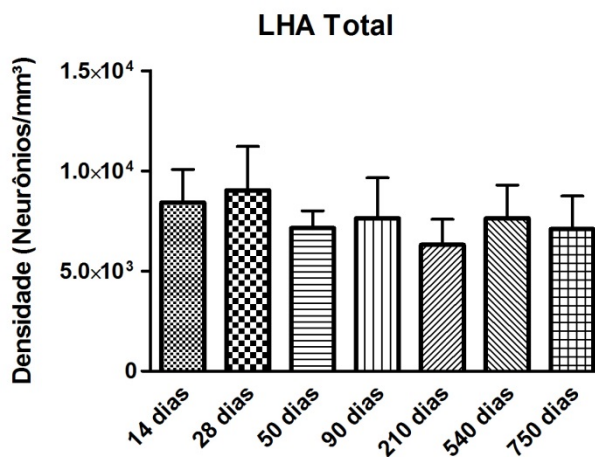


Figura 16: Média de densidade neuronal (neurônios/mm³) da LHA para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias. As barras de erro indicam o desvio-padrão

Reconstrução tridimensional da área hipotalâmica lateral

Para estudo da distribuição dos neurônios MCH-ir foi realizada a reconstrução tridimensional da LHA (Figuras 17 e 18) e o mapeamento (Figuras 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25) em todos os grupos experimentais. Para a comparação entre os grupos, foram reconstruídas partes equivalentes do hipotálamo em todos os casos, a partir de secções de um animal de cada grupo, de forma que o início e o fim de cada modelo 3D estivessem em níveis interaurais semelhantes, de acordo com a observação da citoarquitetura da região de interesse.

O padrão de distribuição dos neurônios MCH-ir não mostrou diferenças qualitativas na LHA e em regiões adjacentes entre os grupos. Os neurônios MCH-ir no hipotálamo encontraram-se em igual proporção dentro e fora da LHA como um todo (Tabela 1). A distância média entre as células MCH-ir na LHA foi de 37,87 μ m (\pm 2,94) (grupo 14: 38,1 μ m; grupo 28: 33,1 μ m; grupo 50: 36,7 μ m; grupo 90: 36,5 μ m; grupo 210: 39,9 μ m; grupo 540: 42,5 μ m; grupo 750: 38,3 μ m), sendo menor do que a distância média entre as células MCH-ir fora da LHA que foi de 49,54 μ m (\pm 3,88) (grupo 14: 47,5 μ m; grupo 28: 46,6; grupo 50: 49,4 μ m; grupo 90: 48,7 μ m; grupo 210:55,4 μ m; grupo 540:54,2 μ m; grupo 750: 45,0 μ m) indicando maior compactação das células MCH-érgicas dentro da LHA com pouca variação entre os grupos analisados (Figura 26).

Dentro da LHA, a distribuição neuronal é heterogênea, com grande quantidade de neurônios MCH-ir localizados nas regiões perifornical, magnocelular e dorsal da LHA, deixando a região central da LHA com menor quantidade de neurônios. O aparecimento dos neurônios MCH-ir ao longo da extensão rostro-caudal da LHA iniciou-se nas secções mais rostrais do hipotálamo mamilar e seguiu até os cortes mais caudais do núcleo paraventricular do hipotálamo.

Observou-se a presença de neurônios MCH-ir em todas as regiões da LHA (MCH-LHA) e regiões adjacentes (MCH-OUT) com padrão de distribuição semelhante entre todos os grupos. A região tuberal sempre apresentou o maior número de neurônios MCH-ir, localizados dentro da LHA (Tabela 1), seguida das regiões anterior e mamilar onde a maior quantidade de neurônios MCH-ir está fora da LHA.

Distribuição percentual do número de neurônios MCH-ir

Grupos	MCH – LHA				MCH – OUT			
	Total	LHAm	LHAt	LHAa	Total	LHAm	LHAt	LHAa
14 dias	51,05	0,67	38,28	12,11	48,95	1,16	29,93	17,86
28 dias	48,34	3,07	40,01	5,26	51,66	10,89	21,22	19,54
50 dias	49,79	4,19	45,34	0,27	50,21	7,04	36,05	7,12
90 dias	52,78	3,33	44,56	4,89	47,22	9,49	24,41	13,32
210 dias	53,99	1,60	51,16	1,23	46,01	6,02	31,94	8,05
540 dias	52,17	6,48	43,65	2,04	47,83	8,45	24,76	14,62
750 dias	45,25	0,95	43,08	1,22	54,75	2,31	37,38	15,06

Tabela1: Distribuição percentual do número de neurônios MCH-ir identificados na reconstrução tridimensional da LHA total e nas regiões mamilar (LHAm), tuberal (LHAt) e anterior (LHAa) para os grupos de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias. Foram identificadas as células MCH-ir pertencentes à LHA (MCH-LHA) e as que estão em regiões adjacentes (MCH-OUT). Todos os grupos apresentaram maior número de células dentro da LHA na região tuberal e maior número de células fora da LHA nas regiões mamilar e anterior.

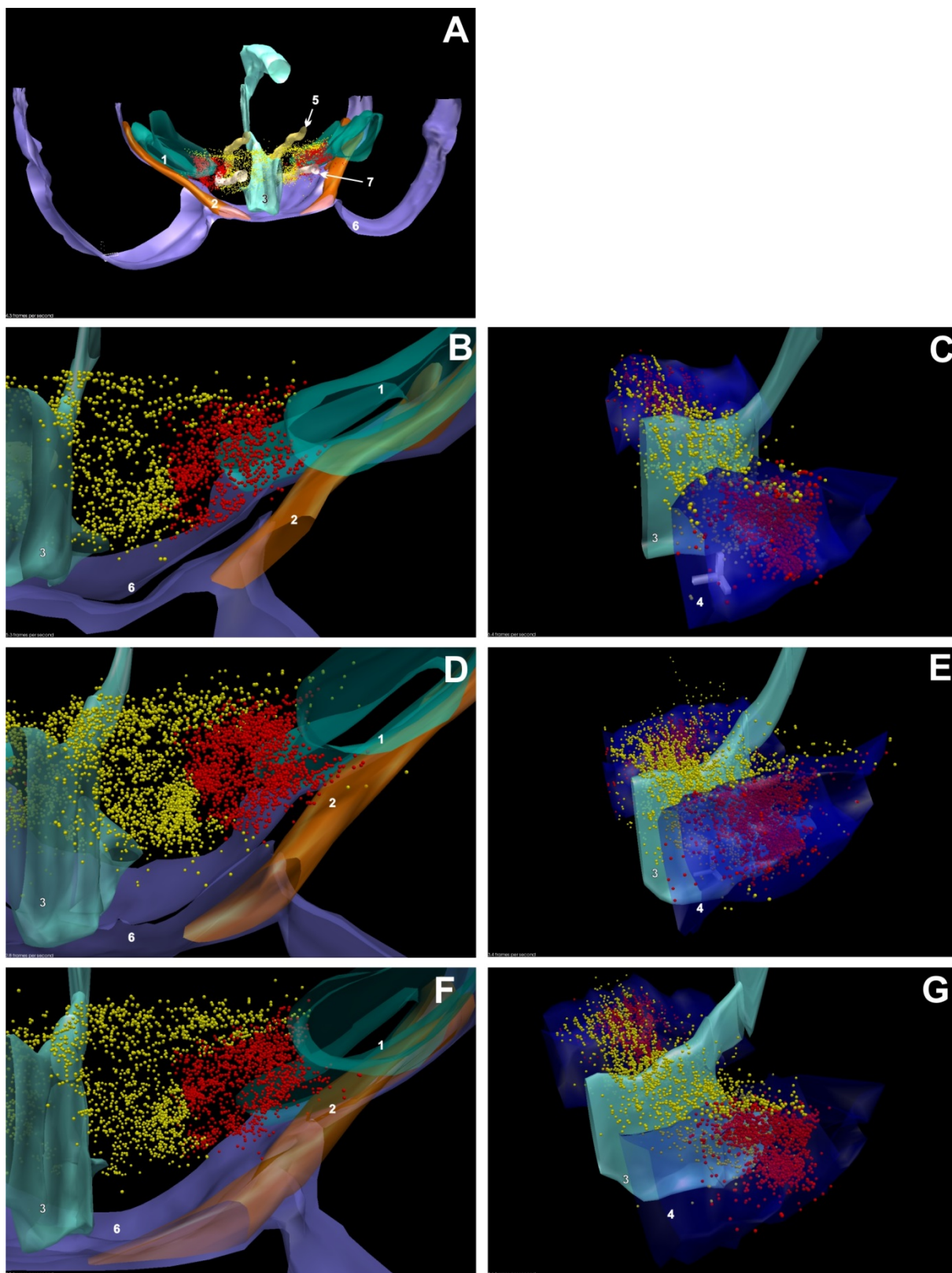


Figura 17: Reconstrução tridimensional do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios MCH-ir: grupos de 14, 28 e 50 dias. Em A, visão panorâmica com referências citoarquitetônicas e as células MCH-ir representadas pelas esferas amarelas (fora da LHA) e vermelhas (dentro da LHA). Em B e C, detalhe frontal e lateral da LHA no grupo de 14 dias. Em D e E, detalhe frontal e lateral da LHA no grupo de 28 dias. Em F e G, detalhe frontal e lateral da LHA no grupo de 50 dias. 1, cápsula interna; 2, trato óptico; 3, III ventrículo; 4, LHA; 5, trato mamilotalâmico; 6, superfície do encéfalo; 7, fórnix.

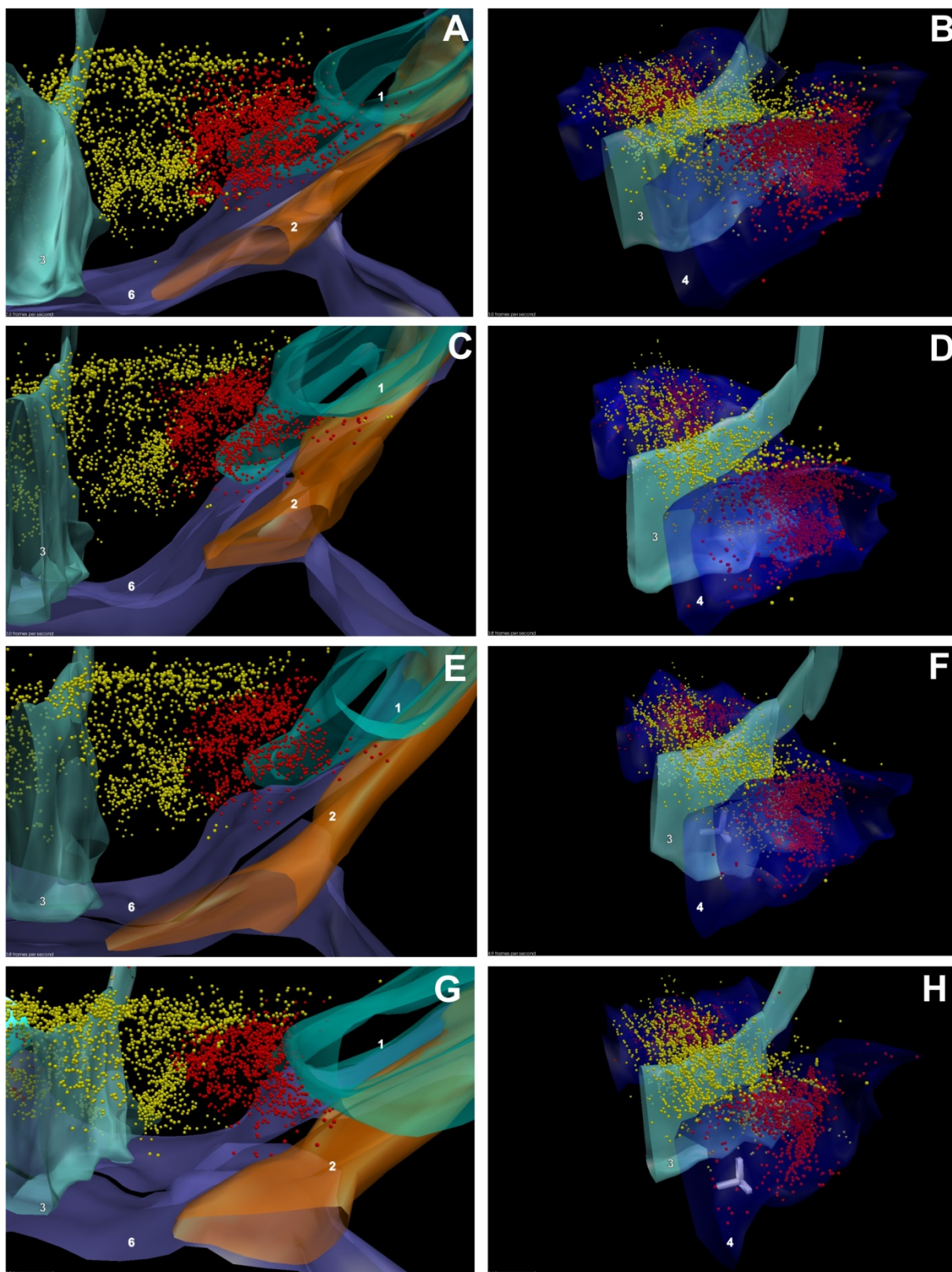


Figura 18: Reconstrução tridimensional do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios MCH-ir: grupos de 90, 210, 540 e 750 dias. As células MCH-ir estão representadas pelas esferas amarelas (fora da LHA) e vermelhas (dentro da LHA). Em A e B, detalhe frontal e lateral da LHA no grupo de 90 dias. Em C e D, detalhe frontal e lateral da LHA no grupo de 210 dias. Em E e F, detalhe frontal e lateral da LHA no grupo de 540 dias. Em G e H, detalhe frontal e lateral da LHA no grupo de 750 dias. 1, cápsula interna; 2, trato óptico; 3, III ventrículo; 4, LHA; 5, trato mamilotalâmico; 6, superfície do encéfalo; 7, fórnix.

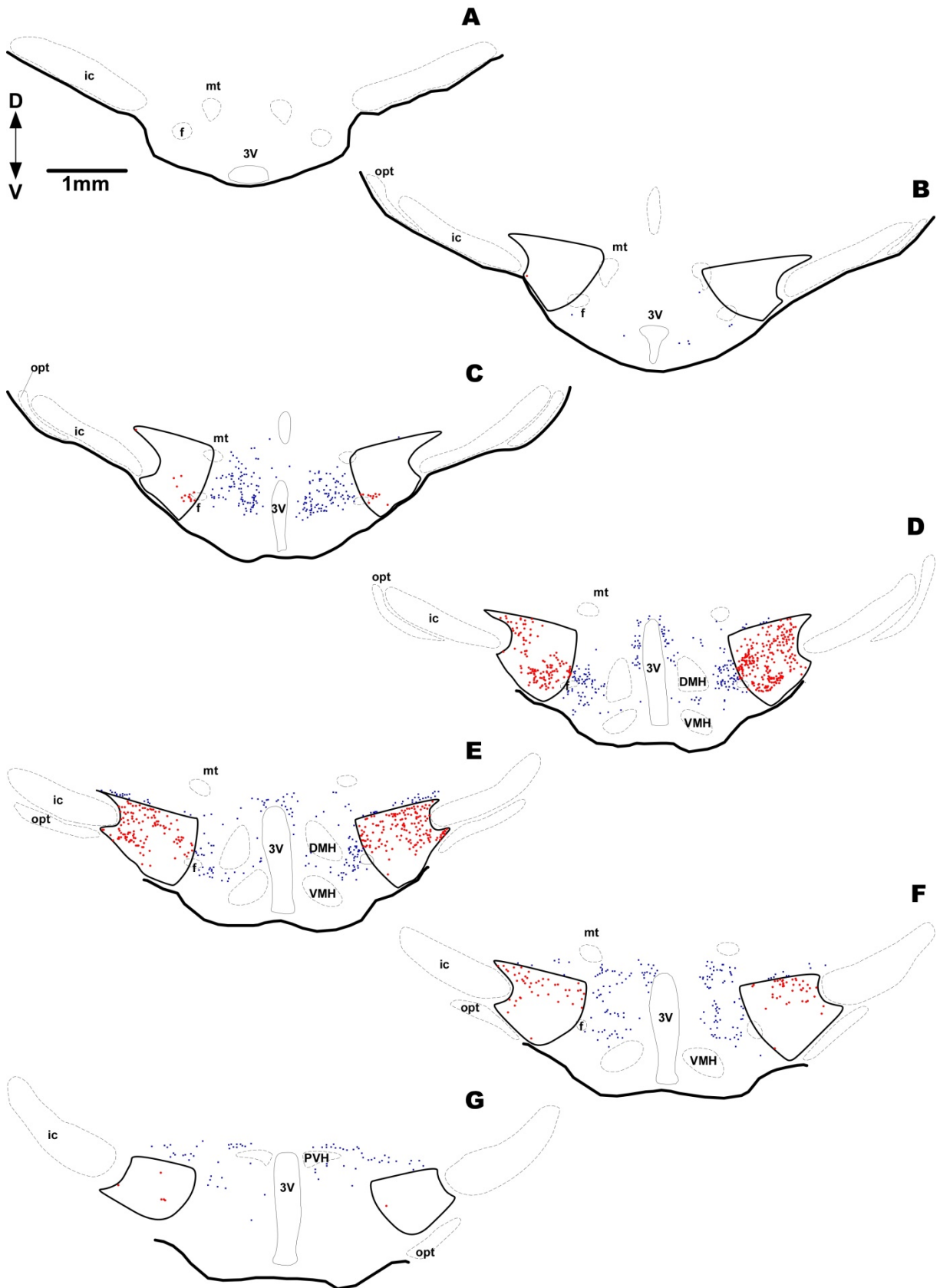


Figura 19: Esquemas de mapeamento dos neurônios MCH-ir em animal de 14 dias. Os esquemas representam seções coronais do hipotálamo orientados de caudal (A) para rostral (G). O intervalo entre as seções é de 300µm. A barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas. Símbolos: ● = neurônios MCH-ir da LHA; ■ = neurônios MCH-ir de regiões adjacentes.

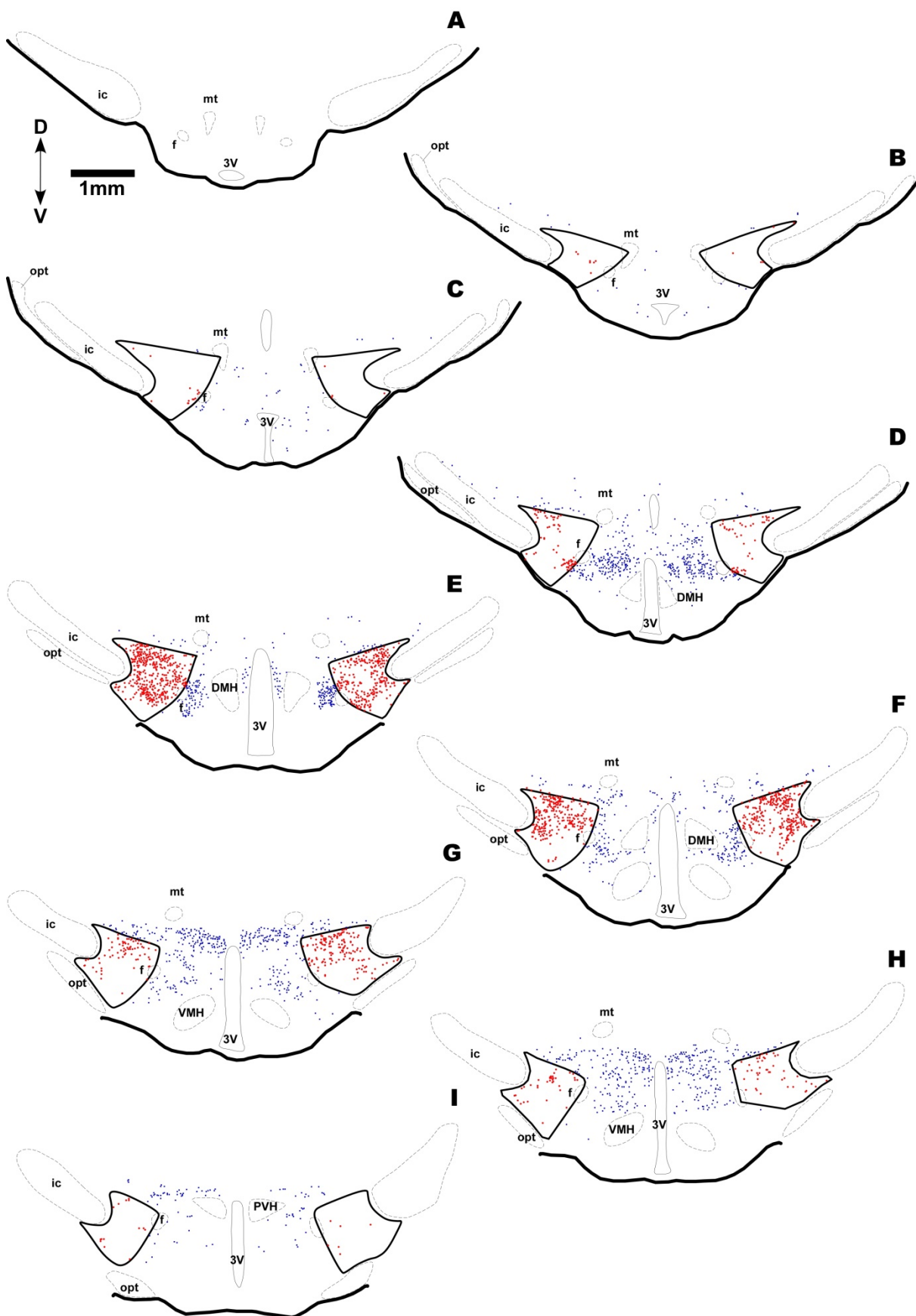


Figura 20: Esquemas de mapeamento dos neurônios MCH-ir em animal de 28 dias. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientados de caudal (A) para rostral (I). O intervalo entre as secções é de 300µm. A barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas. Símbolos: ● = neurônios MCH-ir da LHA; ■ = neurônios MCH-ir de regiões adjacentes.

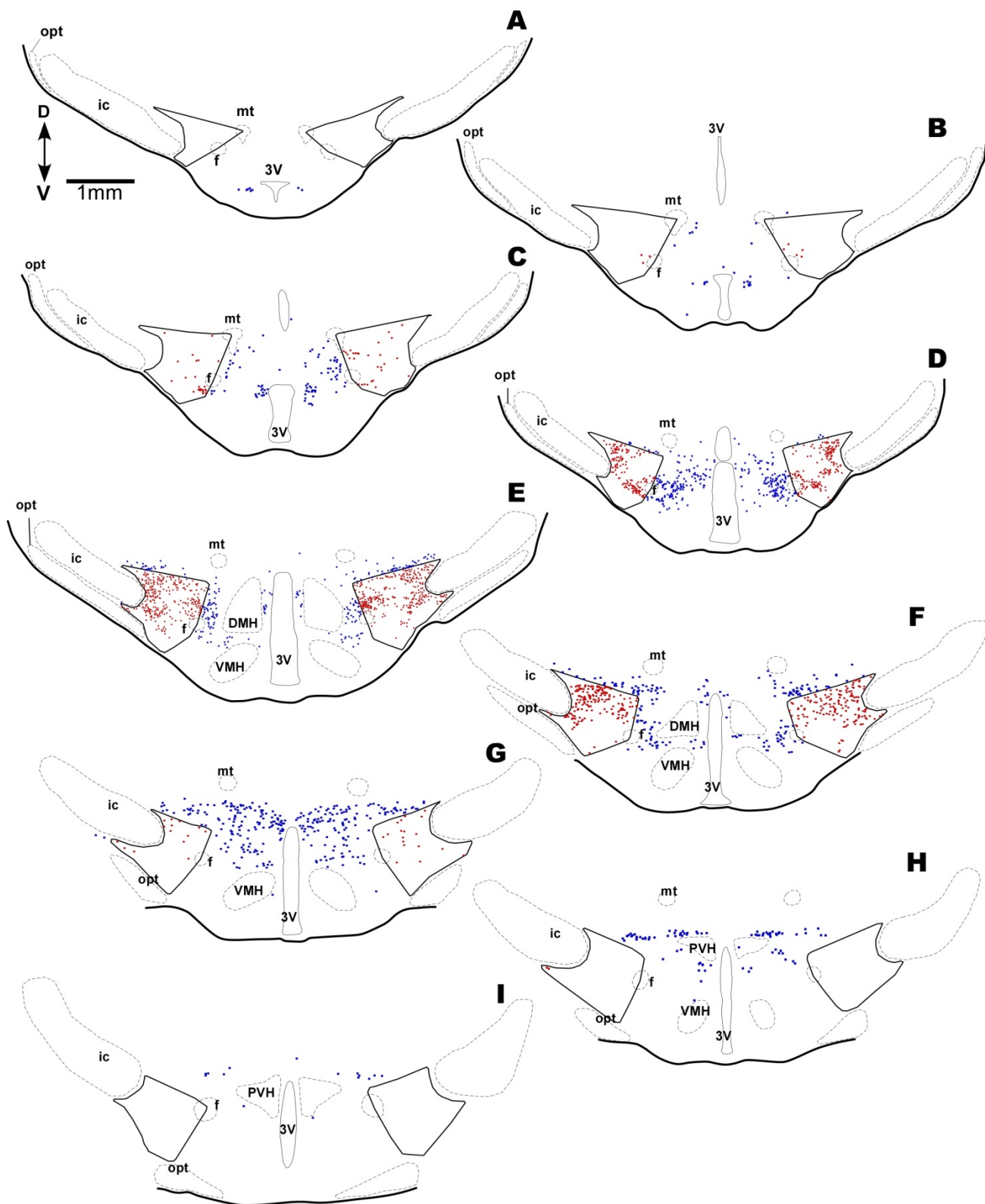


Figura 21: Esquemas de mapeamento dos neurônios MCH-ir em animal de 50 dias. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientados de caudal (A) para rostral (I). O intervalo entre as secções é de 300µm. A barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas. Símbolos: ● = neurônios MCH-ir da LHA; ■ = neurônios MCH-ir de regiões adjacentes.

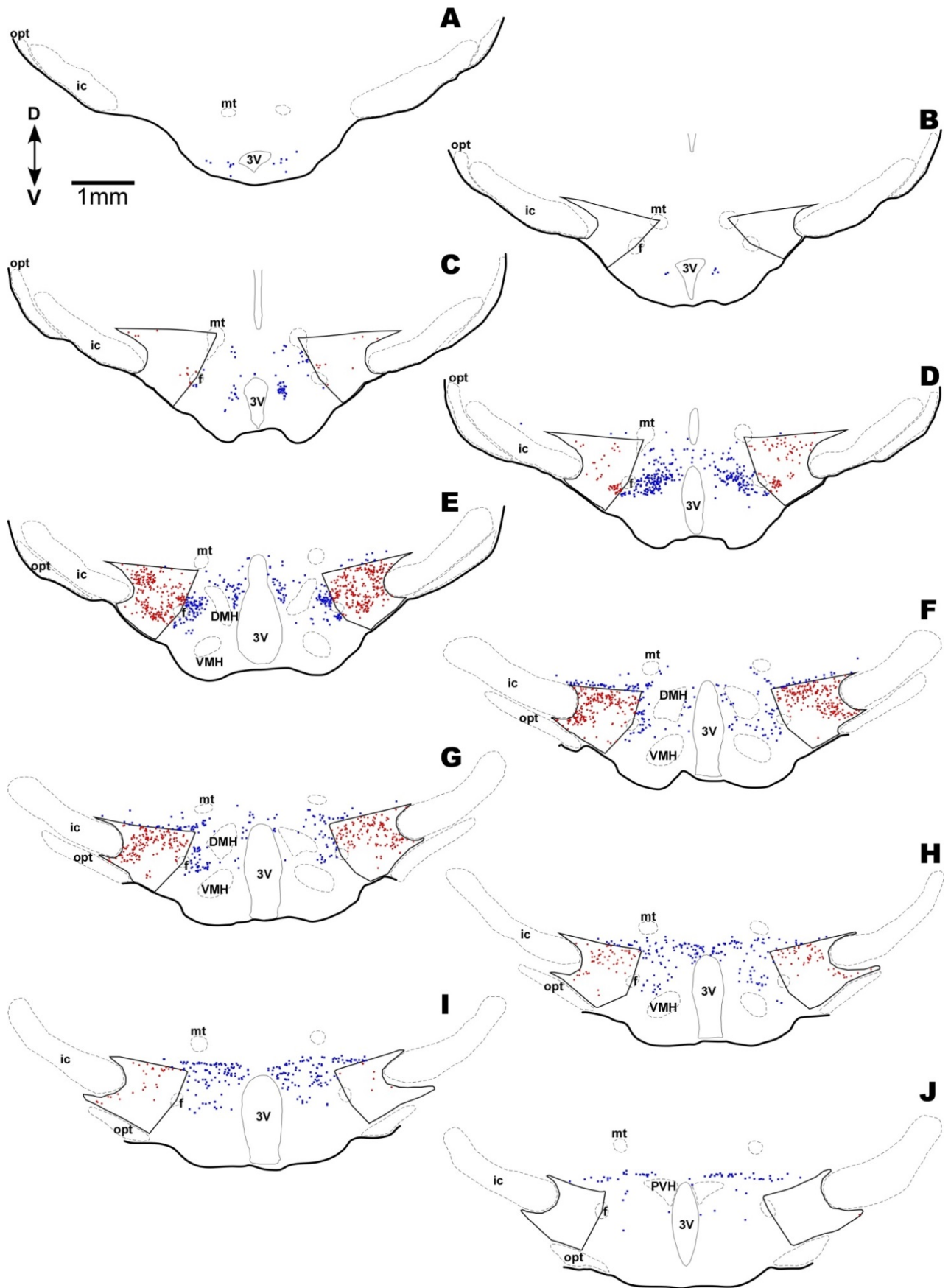


Figura 22: Esquemas de mapeamento dos neurônios MCH-ir em animal de 90 dias. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientados de caudal (A) para rostral (J). O intervalo entre as secções é de 300µm. A barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas. Símbolos: ● = neurônios MCH-ir da LHA; ■ = neurônios MCH-ir de regiões adjacentes.

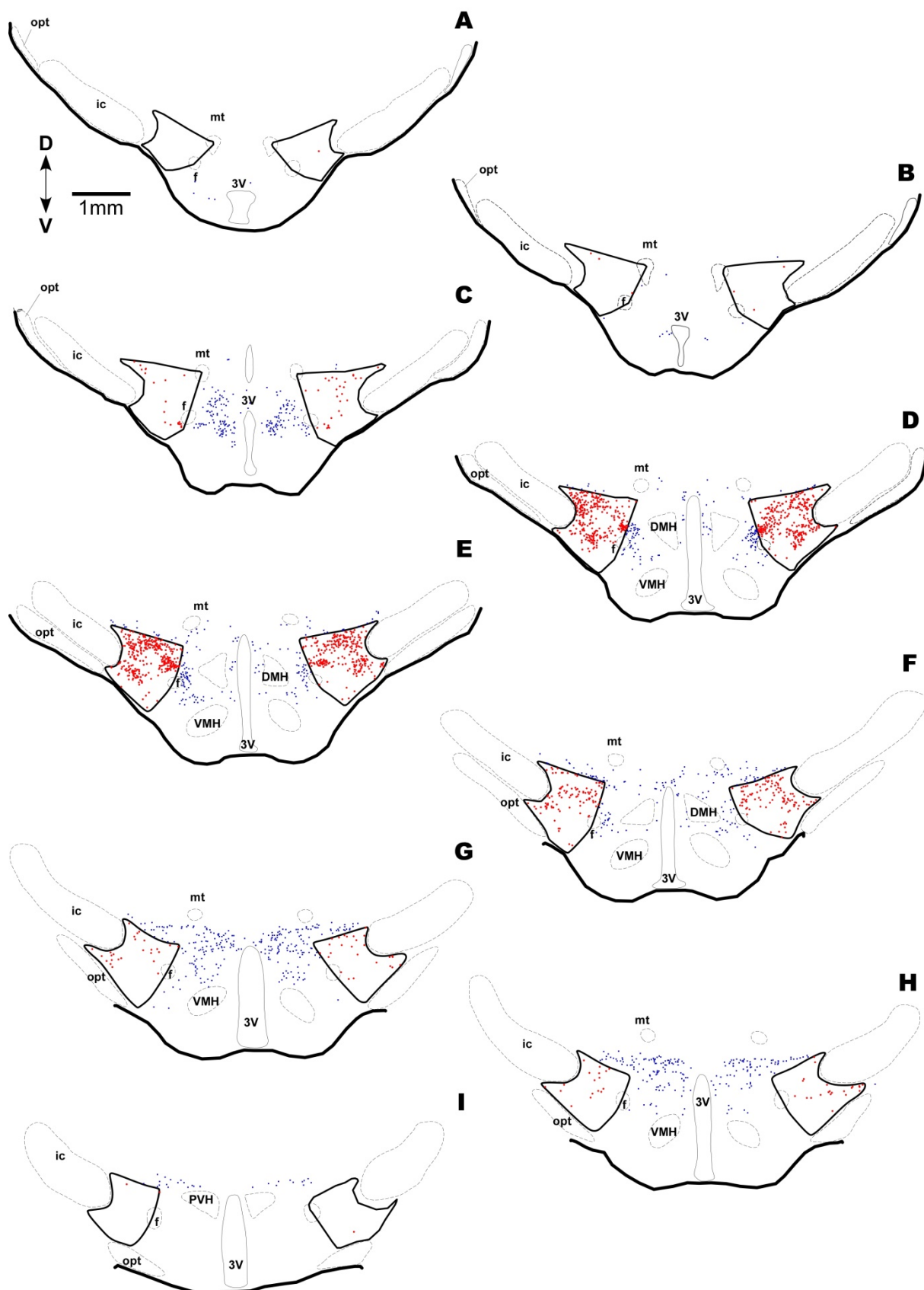


Figura 23: Esquemas de mapeamento dos neurônios imunorreativos ao MCH em animal de 210 dias. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientados de caudal (A) para rostral (I). O intervalo entre as secções é de 300µm. A barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas. Símbolos: ● = neurônios MCH-ir da LHA; ■ = neurônios MCH-ir de regiões adjacentes.

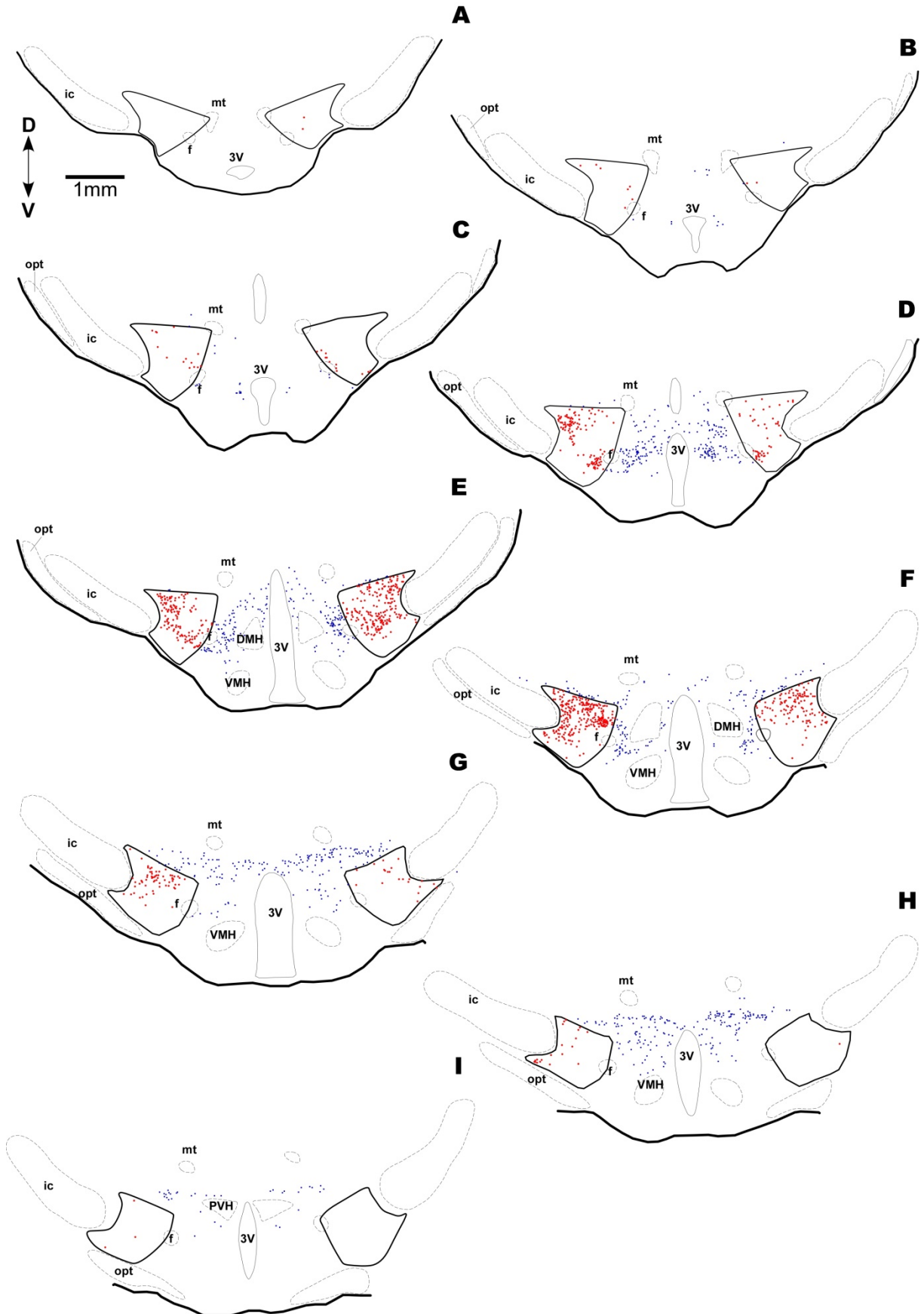


Figura 24: Esquemas de mapeamento dos neurônios imunorreativos ao MCH em animal de 540 dias. Os esquemas representam seções coronais do hipotálamo orientados de caudal (A) para rostral (I). O intervalo entre as seções é de 300µm. A barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas. Símbolos: ● = neurônios MCH-ir da LHA; ■ = neurônios MCH-ir de regiões adjacentes.

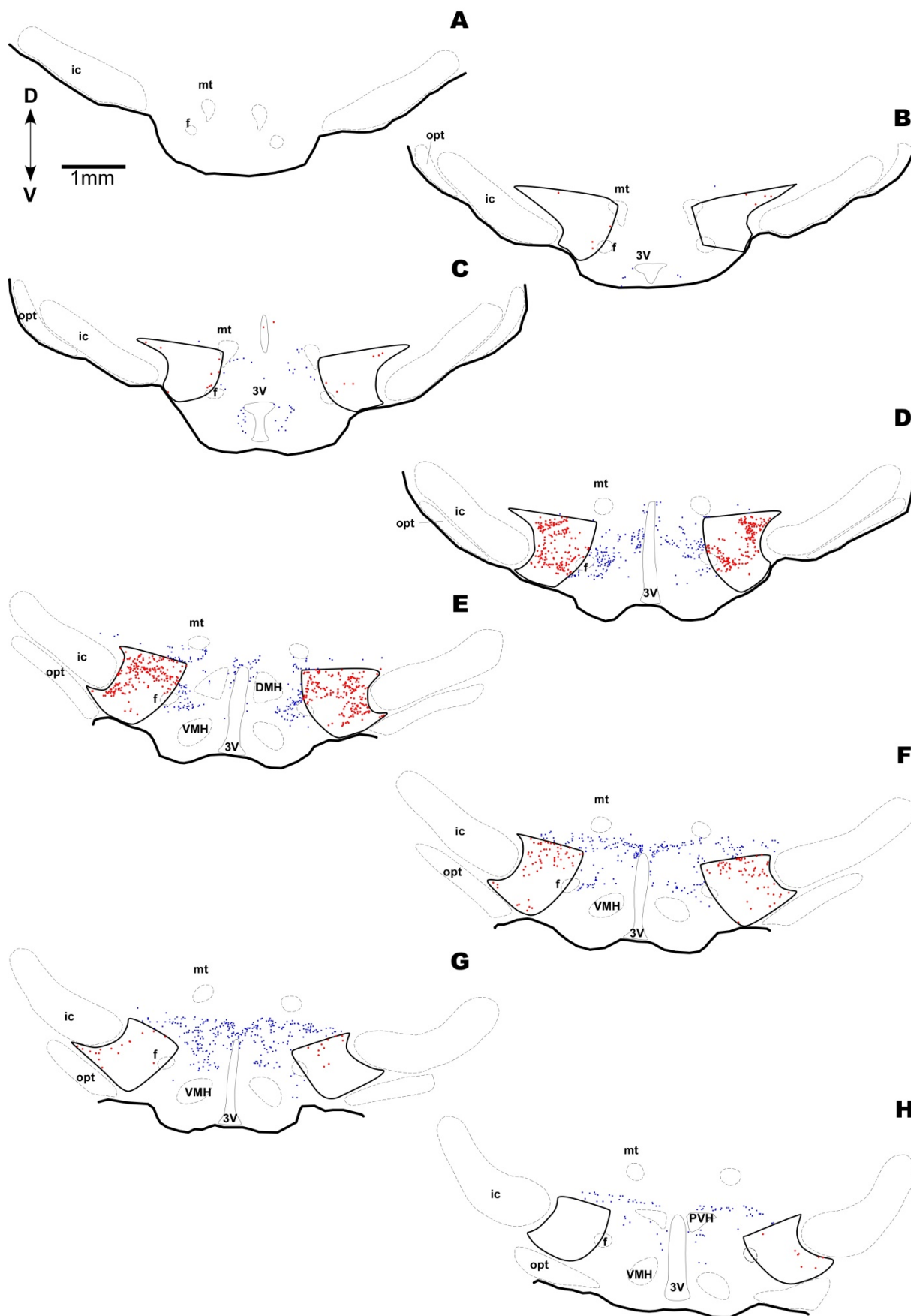


Figura 25: Esquemas de mapeamento dos neurônios imunorreativos ao MCH em animal de 750 dias. Os esquemas representam seções coronais do hipotálamo orientados de caudal (A) para rostral (J). O intervalo entre as seções é de 300µm. A barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas. Símbolos: ● = neurônios MCH-ir da LHA; ■ = neurônios MCH-ir de regiões adjacentes.

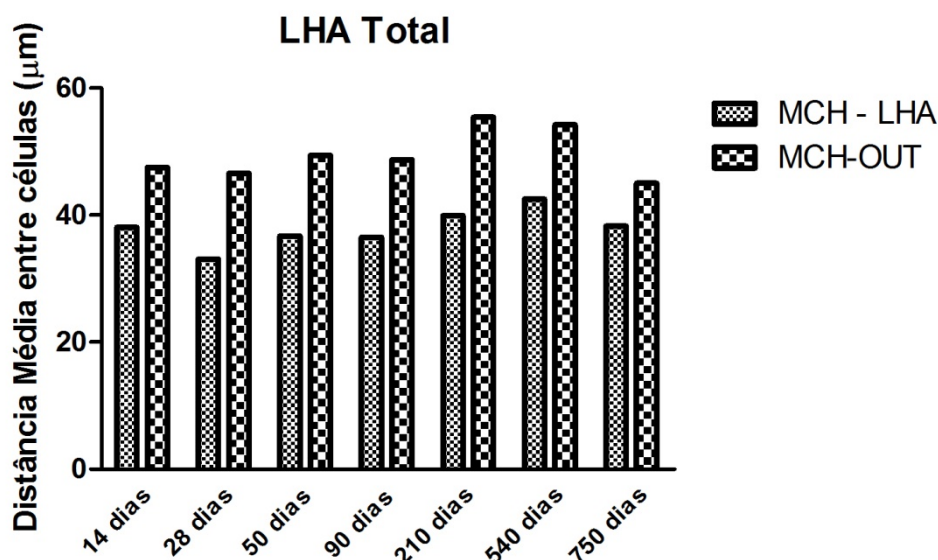


Figura 26: Distância média (µm) entre as células MCH-ir da LHA total e das regiões adjacentes a ela para os grupos de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias. Os neurônios MCH-ir da LHA apresentaram menor distância média, demonstrando maior compactação quando comparados aos neurônios MCH-ir fora da LHA.

Hibridização *in situ*

O protocolo de hibridização *in situ* para o RNAm do ppMCH foi testado em um animal adulto de 90 dias e sua eficácia pôde ser comprovada (Figura 27). Foi realizado protocolo de hibridização *in situ* para ppMCH em uma série de cortes de cada animal dos grupos experimentais. Em todos os grupos etários, foi observada a deposição de grãos de prata reduzida nas mesmas regiões da área hipotalâmica lateral onde se obtém a identificação de somas MCH-ir (Figuras 28, 29 e 30).

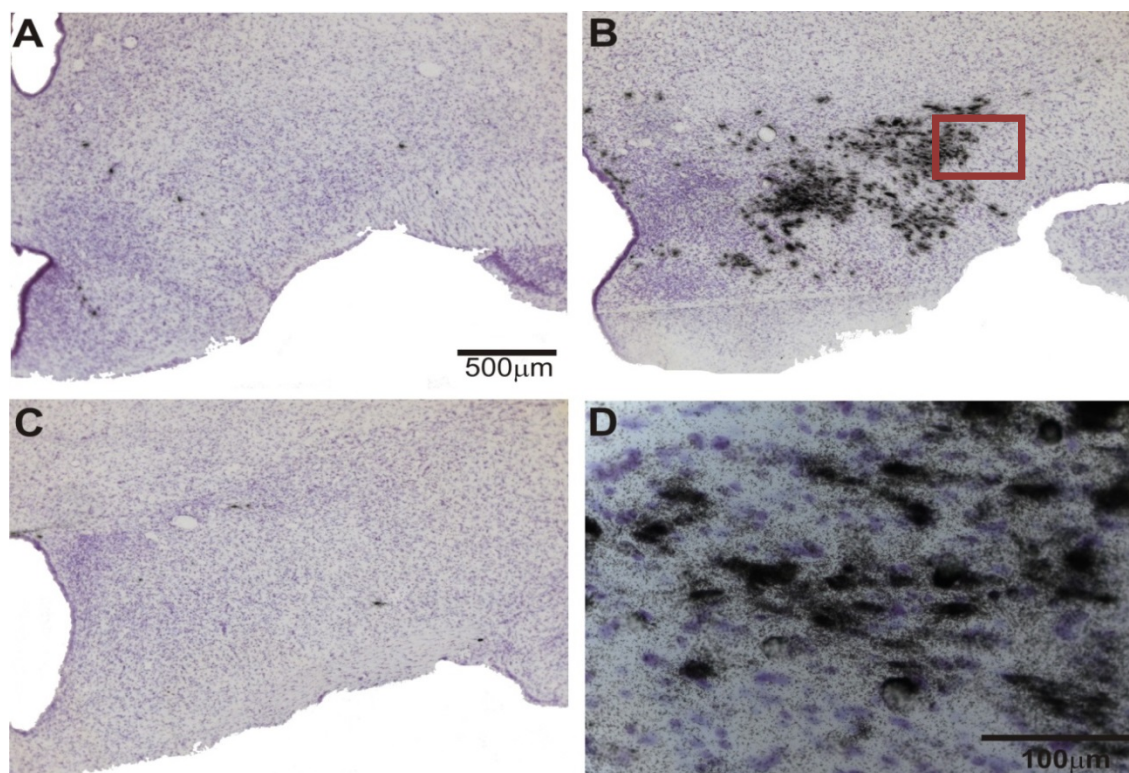


Figura 27: Hibridização *in situ* para RNAm do ppMCH nas regiões da área hipotalâmica lateral: mamilar (A), tuberal (B), anterior (C). Em D, detalhe em maior aumento da área delimitada pelo retângulo em B, destacando a marcação pelos grãos de prata nos neurônios da região tuberal. A barra de calibração em A é válida para as imagens B e C.

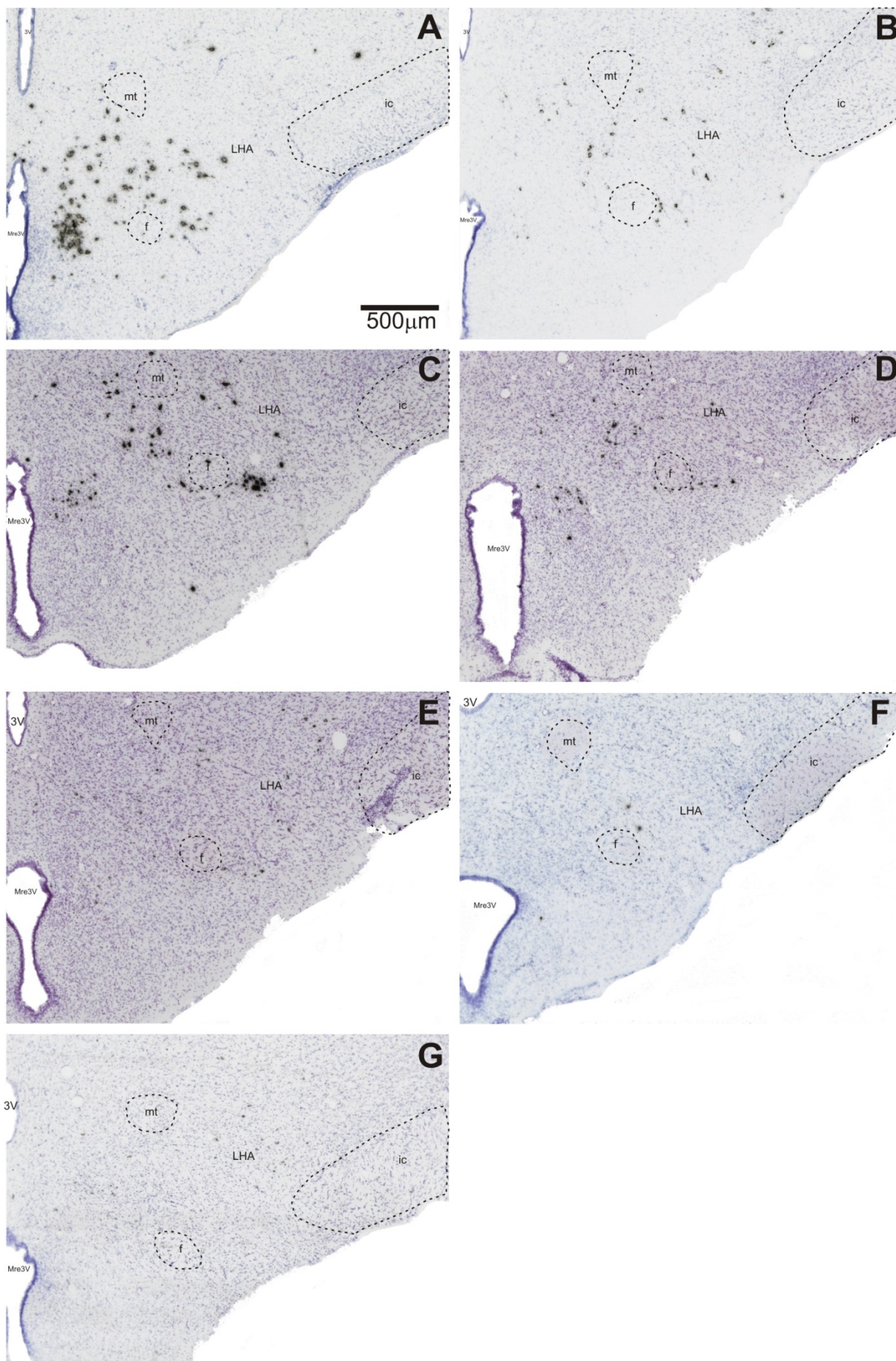


Figura 28: Hibridização *in situ* para o ppMCH na região mamilar da LHA. Fotomicrografias representativas dos grupos etários 14 (A), 28 (B), 50 (C), 90 (D), 210 (E), 540 (F) e 750 (G) dias. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens. Para as abreviaturas, consultar a lista de abreviaturas.

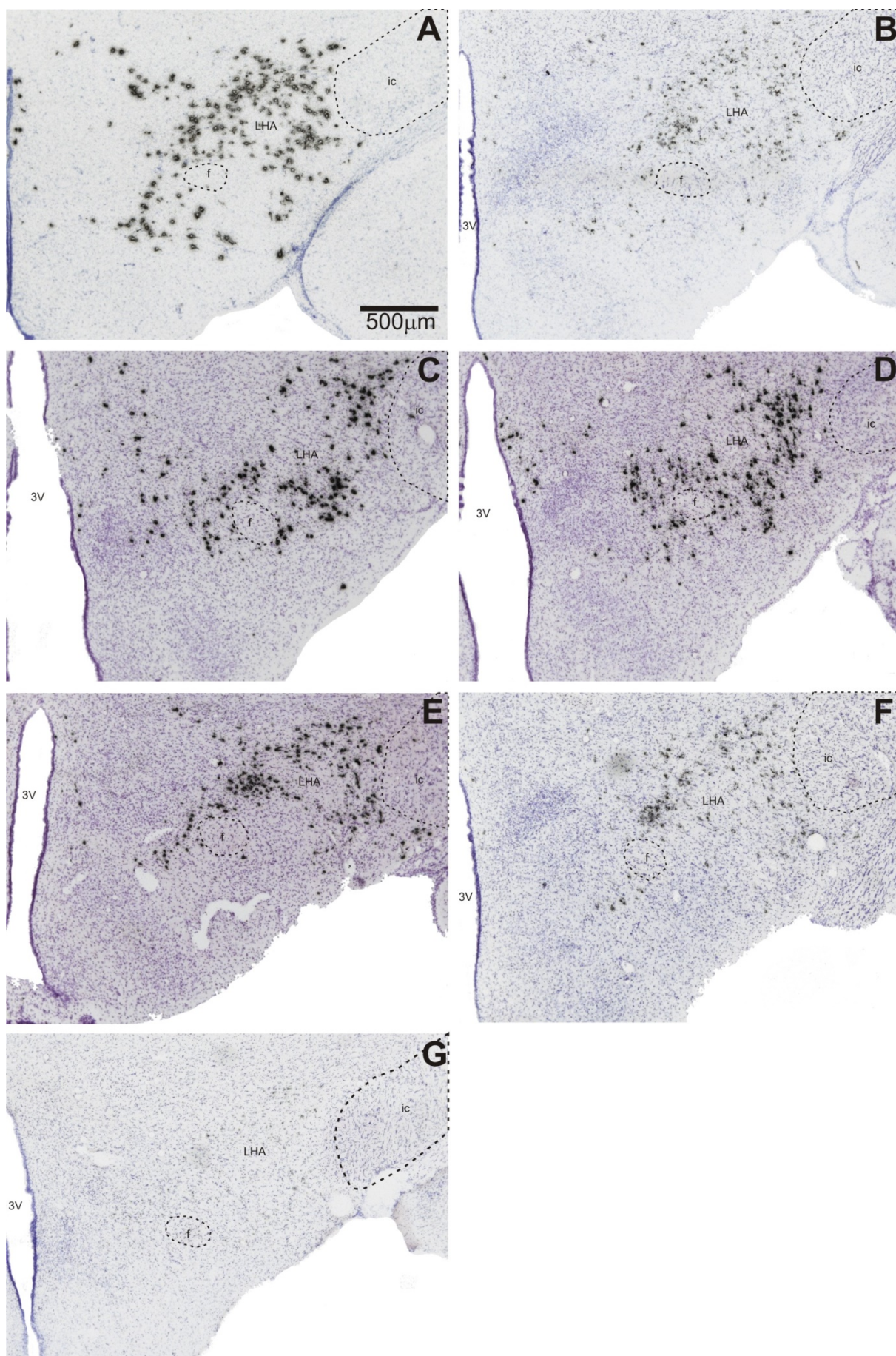


Figura 29: Hibridização *in situ* para o ppMCH na região tuberal da LHA. Fotomicrografias representativas dos grupos etários 14 (A), 28 (B), 50 (C), 90 (D), 210 (E), 540 (F) e 750 (G) dias. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens. Para as abreviaturas, consultar a lista de abreviaturas.

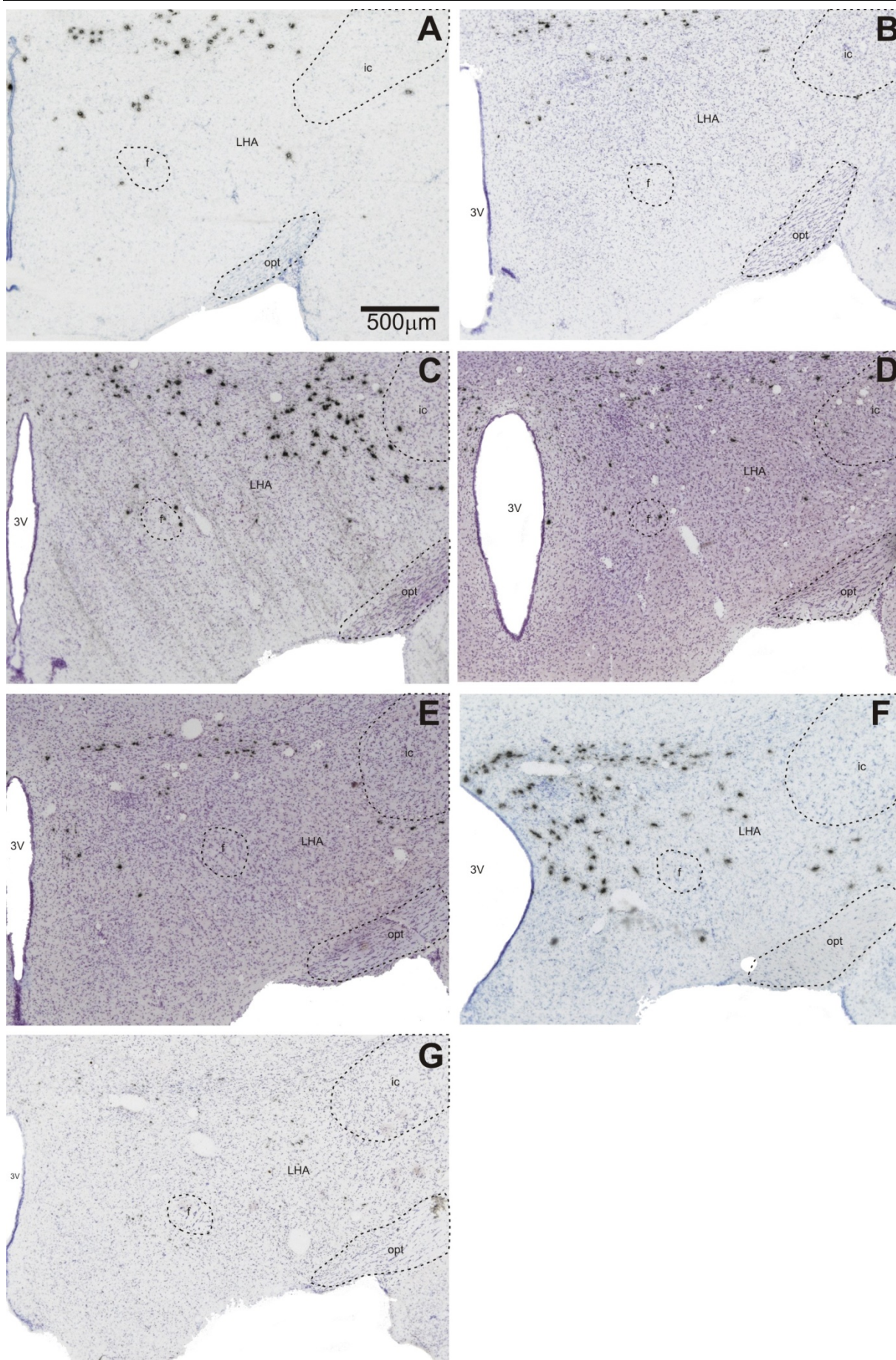


Figura 30: Hibridização *in situ* para o ppMCH na região anterior da LHA. Fotomicrografias representativas dos grupos etários 14 (A), 28 (B), 50 (C), 90 (D), 210 (E), 540 (F) e 750 (G) dias. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens. Para as abreviaturas, consultar a lista de abreviaturas.

Densitometria óptica

Após a realização do protocolo de hibridização *in situ* para o ppMCH, foi executada a análise da quantidade relativa de RNAm para o ppMCH na LHA dos animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5). Foram mensuradas a densidade óptica integrada, a área marcada e sua densidade óptica média. A densidade óptica integrada é o produto entre a densidade óptica média dos grãos de prata precipitados e a área marcada por eles. A densidade óptica média permite analisar o valor relativo à densidade dos grãos de prata precipitados no tecido que é proporcional à quantidade de RNAm para o ppMCH, e a área marcada é proporcional a quantidade de tecido hibridizado que expressa o RNAm.

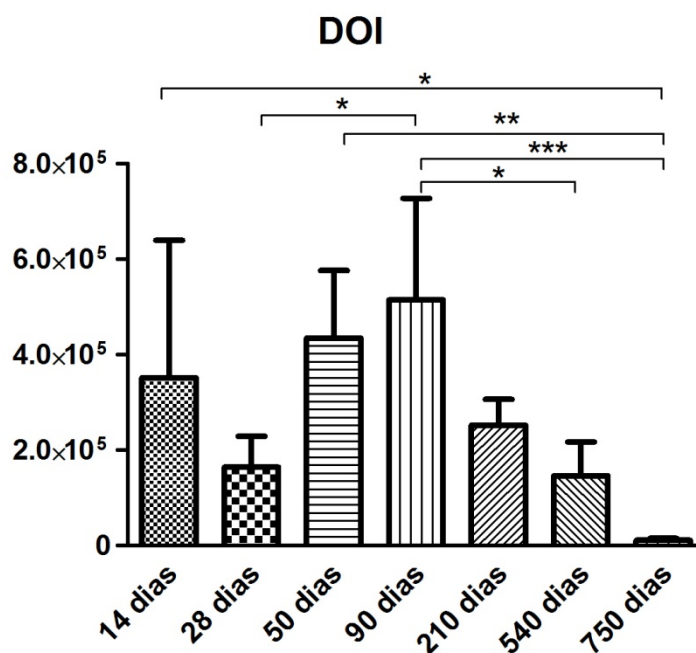


Figura 31: Média da densidade óptica integrada (DOI) na LHA total para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5 por grupo). As barras de erro indicam o desvio-padrão (*= p<0,05, ** = p<0,01, ***= p<0,001).

Os animais de 28, 540 e 750 dias apresentaram valores de DOI significativamente menores na LHA como um todo (Figura 31 e Apêndice G5) quando comparado com os grupos de 90 dias. Além disso, o grupo de 750 dias também apresentou diminuição significativa de DOI quando comparado com os animais de 14 e 50 dias de idade.

Quanto à densidade óptica média, o grupo de 28 dias apresentou valores significativamente menores do que os grupos de 14, 50, 90 e 210 dias, indicando aumento quantidade relativa de RNAm para o ppMCH na LHA total nos grupos púbere e adultos (Figura 32 e Apêndice G6) em relação ao grupo pré-púbere. Já os grupos de 540 e 750 dias apresentaram diminuição significativa de densidade óptica média comparados aos grupos de 50 e 90 dias (Figura 32), resultando assim, em uma diminuição da quantidade relativa de RNAm para ppMCH na LHA com o envelhecimento.

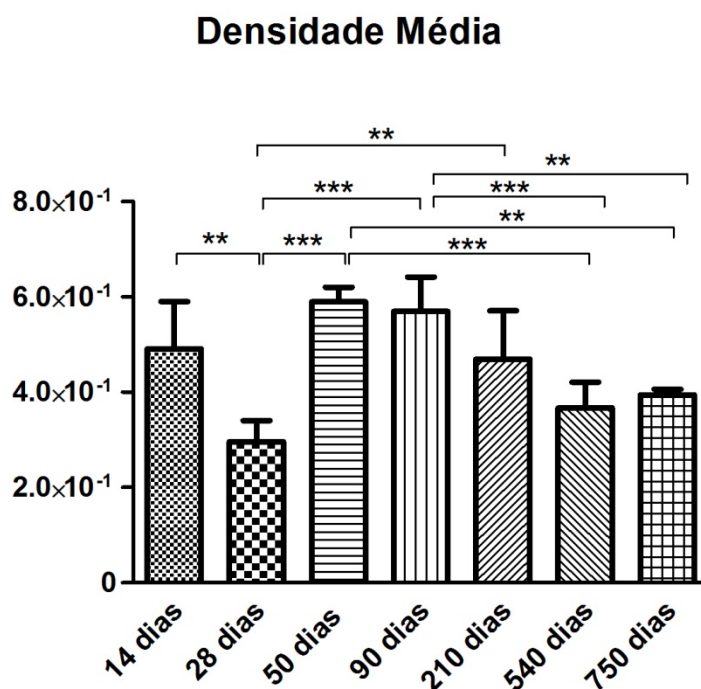


Figura 32: Média da densidade óptica média dos grãos de prata precipitados na LHA total para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5 por grupo). As barras de erro indicam o desvio-padrão (** = p<0,01, ***= p<0,001)

Com relação a área de tecido hibridizado na LHA total, os animais de 750 dias apresentaram diminuição significativa quando comparados aos animais de 14, 50 e 90 dias (Figura 33 e Apêndice G7). Além disso, embora sem significância estatística, os valores de média de área seguem uma relação de grandeza entre os grupos semelhante a descrita para a densidade óptica média, sendo mais acentuada a diminuição aos 750 dias (Figura 33).

Analisando a LHA dividida em suas regiões, mamilar (LHAM), tuberal (LHA_t) e anterior (LHA_a), observou-se que os maiores valores de DOI encontram-se na LHA_t, onde o comportamento da DOI foi semelhante ao que ocorreu para a LHA como um todo. Nessa região, os animais de 750 e 540 dias apresentaram diminuição de densidade óptica integrada na quando comparados aos animais de 50 e 90 dias (Figura 34 e Apêndices G8, G9 e G10) . Além disso, o grupo de 750 dias também apresenta diminuição de DOI quando comparado com os animais de 14 dias de idade e o grupo de 28 dias apresentou valores de DOI significativamente menores quando comparado com o grupo de 90 dias.

Na região LHA_a, o grupo de 750 dias apresentou diminuição de DOI comparado aos grupos de 50 e 90 dias. Na LHAM, não houve diferenças estatisticamente significantes na DOI entre os grupos (Figura 34 e Apêndice G8 e G10).

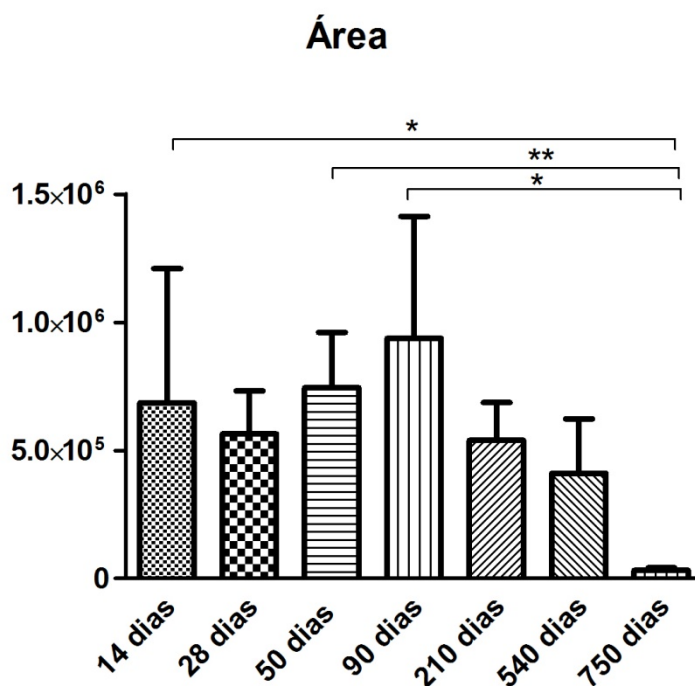


Figura 33: Média da área marcada na LHA total para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5 por grupo). As barras de erro indicam o desvio-padrão.

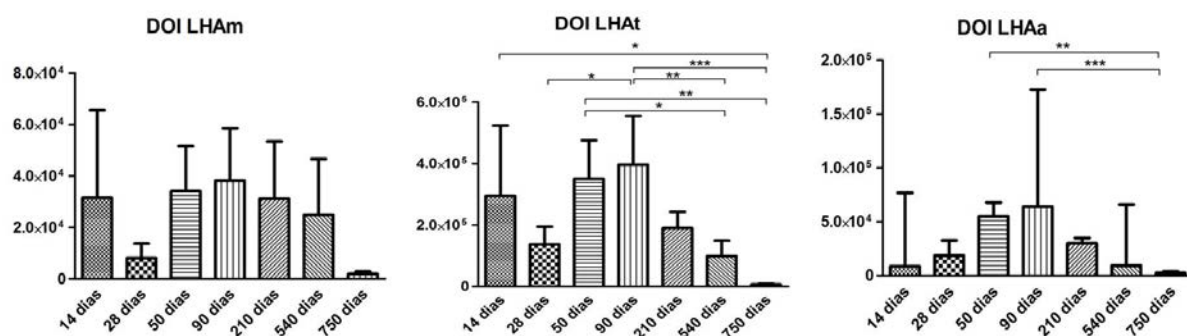


Figura 34: Média da densidade óptica integrada (DOI) nas regiões mamilar (LHAM), tuberal (LHAt) e mediana da DOI na LHA anterior (LHAa) para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5 por grupo). As barras de erro indicam o desvio-padrão (LHAM e LHAt) e máximo (LHAa) (* = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001).

Em relação à densidade óptica média, os gráficos para cada região da LHA apresentaram padrão de relação de grandeza entre os grupos semelhante ao que ocorreu na LHA como um todo. Na LHAM, os grupos de 750 e 540 dias apresentaram diminuição de densidade óptica média comparados com o grupo de 50 dias. Além disso, o grupo de 28 dias apresentou valores significativamente menores quando comparados aos grupos de 50 e 90 dias (Figura 35 e Apêndice G11).

Na LHAt, novamente os grupos de 750 e 540 dias apresentaram diminuição de densidade óptica média em relação aos grupos de 50 e 90 dias. Além disso, os animais do grupo de 28 dias obtiveram valores significativamente menores de densidade óptica média em relação aos animais de 14, 50, 90 e 210 dias (Figura 35 e Apêndice G12).

Na região anterior, houve aumento significativo da densidade óptica média nos grupos de 50 e 90 dias quando comparados com o grupo de 28 dias (Figura 35 e Apêndice G13). No entanto, observou-se uma tendência de diminuição da densidade óptica média com o avanço da idade, sem significância estatística.

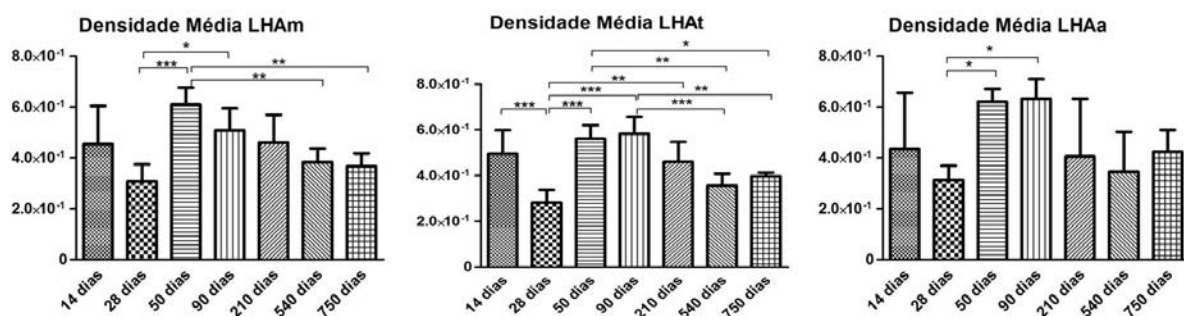


Figura 35: Média da densidade óptica média nas regiões mamilar (LHAM), tuberal (LHAT) e mediana para a LHA anterior (LHAa) para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5 por grupo). As barras de erro indicam o desvio-padrão e máximo (LHAa) (* = p<0,05, ** = p<0,01, ***=p<0,001).

Quanto à área marcada nas três regiões da LHA (Figura 36 e Apêndices G14, G15 e G16), o grupo de 750 dias apresentou diminuição da área hibridizada comparado ao grupo de 90 dias em todas as regiões. Na LHAM, o grupo de 750 dias também apresentou diminuição da área em relação ao grupo de 210 dias e, na LHAT, com o grupo de 50 dias.

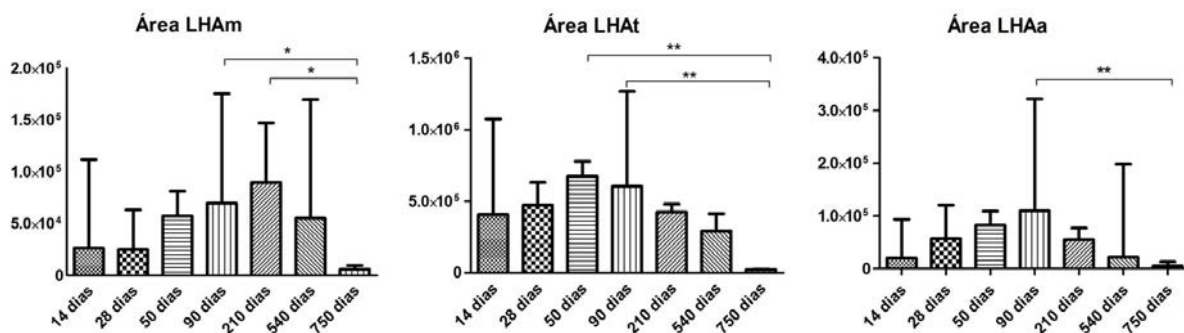


Figura 36: Médiana da área marcada nas regiões mamilar (LHAM), tuberal (LHAT) e anterior (LHAa) para os animais de 14, 28, 50, 90, 210, 540 e 750 dias (n=5 por grupo). As barras de erro indicam o máximo (LHAa) (* = p<0,05, ***=p<0,001).

DISCUSSÃO

Imuno-histoquímica e hibridização *in situ*

As técnicas de imuno-histoquímica e hibridização *in situ* são métodos complementares para a identificação de neurônios que apresentam o MCH e o RNAm para o pppMCH, respectivamente. Em todos os experimentos realizados, houve localização positiva dos neurônios que apresentam MCH e RNAm para ppMCH na LHA, tanto pela técnica de imuno-histoquímica quanto para hibridização *in situ*, conforme descrito por Bittencourt et al. (1992).

Uma vantagem da hibridização sobre a técnica de imuno-histoquímica se deve à possibilidade de quantificação dos grãos de prata da emulsão fotográfica aplicada sobre o tecido, que foram sensibilizados pela sonda marcada com isótopo radioativo, nas regiões hibridizadas. Em nosso projeto, optamos por quantificar os grãos de prata, que estão negros após a revelação, por densitometria óptica.

Além disso, vários parâmetros do protocolo de hibridização foram controlados para garantir o mesmo nível de sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados intra e inter-grupos experimentais, como a purificação da sonda removendo os NTPs não incorporados em micro colunas de resina

(Probe Quant G-50) e a contagem de incorporação do radioisótopo S^{35} em aparelho de cintilação, o que permite a diluição das sondas com a mesma quantidade de radiação. Assim, considera-se muito mais precisa a quantificação da síntese protéica a partir da hidridização *in situ* do que pela imunohistoquímica (PRESSE e NAHON, 1993). Dessa forma, acreditamos que podemos estimar com precisão uma variação da quantidade de RNAm para o ppMCH em neurônios marcados de diferentes grupos experimentais durante o processo de envelhecimento.

Por outro lado, o protocolo de imunohistoquímica permitiu individualizar os somas dos neurônios MCH-érgicos, realizar a contagem e o mapeamento de sua distribuição com maior precisão, haja visto que, nessa técnica, a marcação limita-se ao corpo celular.

Ambas as técnicas permitem confirmar a especificidade mútua e, por essa razão, foram empregadas em muitos trabalhos de forma complementar (BITTENCOURT et al., 1992; HERVIEU et al., 2000; BRISCHOUX et al., 2001; ELIAS et al., 2008).

Estimativa do número de neurônios MCH-ir na LHA e a expressão de MCH quantificada por densitometria óptica

Nossos resultados da análise estereológica mostram o aumento significativo na quantidade de neurônios MCH-ir entre as idades de 14 e 28 dias. Os trabalhos que tratam da ontogênese do MCH relatam que esse neuropeptídeo é produzido no período embrionário, sendo possível observar tanto o RNAm para o ppMCH quanto o próprio neuropeptídeo no 13º dia embrionário (BRISCHOUX et al., 2001), e que o padrão de distribuição dos somas MCH-ir semelhante ao animal adulto dá-se no 16º dia pós-natal, com a total maturação do sistema MCH-érgico no 21º dia (STEININGER et al., 2004). Embora esses trabalhos não mostrem dados a respeito da quantidade de neurônios MCH-ir nas diferentes fases de desenvolvimento, as duas faixas etárias estudadas no presente trabalho (14 e 28) são próximas a essas duas etapas pós-natais importantes para o desenvolvimento do sistema MCH-érgico (16º e 21º dias). Assim, o aumento do número de neurônios encontrado em nossos resultados pode estar associado à maturação do sistema MCH-érgico na LHA.

Os resultados obtidos também indicam que o número de neurônios MCH-ir na LHA não sofre alterações com o processo de envelhecimento entre os grupos experimentais avaliados, com base nos resultados obtidos por estereologia (Figuras 13). Esses resultados concordam com um trabalho prévio que estudou a presença de neurônios MCH-érgicos no hipotálamo de ratos da linhagem *Fisher 344*, realizando estimativas por estereologia (KESSLER et al., 2011).

Embora animais com 26-28 meses de idade (780 – 840 dias) demonstrassem diminuição significativa do número total de células MCH-ir no hipotálamo comparados aos animais adultos jovens (3-4 meses), no hipotálamo lateral não há diminuição significativa do número de neurônios MCH-ir (KESSLER et al., 2011), corroborando nossos dados obtidos na análise estereológica para a LHA (que pertence ao hipotálamo lateral). A diferença encontrada no hipotálamo como um todo provavelmente se deve ao hipotálamo medial, onde a diminuição na quantidade de neurônios MCH-érgicos permaneceu ocorrendo. Em nosso estudo, não foi estimado por estereologia o número de neurônios MCH-ir fora da área hipotalâmica lateral. Contudo, a porcentagem de neurônios adjacentes a LHA (MCH-OUT) mapeados na reconstrução tridimensional variou muito pouco entre os grupos experimentais, não demonstrando diminuição com o envelhecimento (Tabela 1).

Os dados absolutos do número total de neurônios MCH-ir estimados para a LHA em nosso estudo discordam dos obtidos por Kessler (2011), mas o comportamento dessas células na LHA durante o envelhecimento é o mesmo, não havendo alteração no número de neurônios em indivíduos mais velhos. As diferenças entre os valores obtidos nas estimativas daquele e do nosso estudo provavelmente residem na linhagem de rato estudada e em diferenças metodológicas da técnica de estereologia, cuja descrição é incompleta, dificultando a comparação de aspectos cruciais como o coeficiente de erro e objetiva utilizada.

O estudo realizado por Thannickal et al. (2007) demonstrou que a progressão e o estadiamento clínico da doença de Parkinson, doença neurodegenerativa que acomete com maior frequência indivíduos idosos, e que pode provocar sintomas como insônia noturna e distúrbios de sono REM, está associada a uma diminuição do número de neurônios Hcrt-ir e MCH-ir na área hipotalâmica lateral de pacientes parkinsonianos. Nossos dados demonstraram que, no rato, o envelhecimento não leva a uma diminuição fisiológica do número de células MCH-ir na LHA, sugerindo não ser, em si, um fator relevante para perda dos neurônios MCH-ir que acontece nessa patologia.

Em pacientes com doença de Alzheimer, que também é neurodegenerativa e está associada ao envelhecimento, foi identificado o aumento no nível de MCH no líquido cérebro-espinhal, sugerindo-se que isso poderia ser causado por necrose ou apoptose de células MCH-érgicas (SCHMIDT et al., 2013). Da mesma forma, nossos dados mostram que o processo de envelhecimento em si não seria compatível com o aumento na taxa de apoptose dessas células e, conseqüentemente, aumento nos níveis de MCH no líquido cérebro-espinhal. Assim, é interessante investigar o papel da perda de neurônios MCH-érgicos na progressão de doenças neurodegenerativas já que este não parece ser um processo fisiológico ligado ao envelhecimento.

O aumento significativo na área e no volume da LHA encontrado entre o grupo de 14 dias e os grupos de 28, 50, 90, 210 e 540 dias (Figuras 14 e 15) pode estar associado ao crescimento e desenvolvimento do SNC como um todo, bem como a ausência dessa diferença, estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo de 750 dias, mostram uma provável retração do tecido nervoso decorrente do processo de envelhecimento.

O aumento do número de neurônios combinado com o aumento do volume apenas nos primeiros estágios de desenvolvimento pós-natal e sua manutenção nos demais grupos etários estão refletidos na ausência de diferenças na densidade neuronal entre todos os grupos experimentais (Figura 16).

Os dados de densitometria óptica da LHA como um todo, após a hibridização com sonda para o RNAm do ppMCH, sofrem alterações ao longo do desenvolvimento pós-natal e envelhecimento (Figuras 31, 32 e 33). Nessa análise, as variações entre os grupos foram semelhantes nas três variáveis estudadas: densidade óptica média, área e densidade óptica integrada. A densidade óptica integrada é o produto entre a densidade óptica média do sinal de hibridização e a área ocupada por ele. São especialmente relevantes os dados de densidade óptica integrada uma vez que ponderam tanto a intensidade do sinal de hibridização (determinada pela densidade óptica média) como a quantidade de tecido hibridizado (determinada pela área). Dessa forma, sofre influência diretamente proporcional tanto da área como da densidade óptica média. No entanto, por contarmos com o método estereológico para estimar e comparar o número de neurônios em cada grupo etário,

acreditamos ser mais confiável a discussão do número de neurônios por meio dos resultados de estereologia e da quantidade de expressão do RNAm do ppMCH pela densidade óptica integrada.

No lactente, a média de DOI é maior do que no pré-púbere, embora não haja diferença estatisticamente significativa. Com o desenvolvimento, a DOI aumenta progressivamente até o adulto jovem com diferença estatisticamente significativa com o pré-púbere. Esse comportamento também foi observado para o neuropeptídeo transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) durante o desenvolvimento pós-natal (RODRIGUES et al., 2011) e poderia estar relacionado com desenvolvimento de circuitos neurais. No caso do MCH, devido a sua relação com comportamento alimentar, especialmente em seus mecanismos de busca (ROBERTS, 2000; AKIMOTO e MIYASAKA, 2010), nossos resultados são coerentes com a busca constante de alimento no lactente e com a modificação do comportamento alimentar a partir da mudança da dieta no pré-púbere, passando por uma necessidade energética crescente até a idade adulta. Os estudos sobre o desenvolvimento do sistema MCH-érgico mostram o padrão de expressão do RNAm para o ppMCH durante o período embrionário, no qual ocorre a diferenciação das células MCH-ir entre o 10^o e 16^o dias (E10 a E16) (BRISCHOUX et al., 2001). Nossos dados mostram o padrão de expressão do RNAm no período pós-natal, demonstrando um aumento dessa expressão da fase pré-púbere para adulta, após o total amadurecimento do sistema MCH-érgico.

A partir do grupo adulto jovem a DOI sofre diminuição com o processo de envelhecimento (Figura 31), sugerindo, assim, que indivíduos mais velhos apresentam diminuição da expressão do RNAm para esse neuropeptídeo, com diferenças significativas no adulto senescente e senil, o que está de acordo com o balanço energético negativo nos indivíduos idosos.

O MCH possui papel de destaque no controle do balanço energético e do comportamento alimentar, exercendo papel orexígeno (QU et al., 1996; ROSSI et al., 1997). A diminuição da expressão do MCH está de acordo com o fato de grupos etários mais velhos apresentarem redução substancial em sua capacidade de manter um balanço energético em estado de equilíbrio. Mesmo indivíduos saudáveis sofrem desequilíbrio na relação consumo e gasto energético, gerado pelas alterações fisiológicas decorrentes do envelhecimento (ROBERTS, 2000; AKIMOTO e MIYASAKA, 2010).

Nossos resultados sobre a expressão do RNAm do MCH também concordam com relatos da literatura que, com o envelhecimento ocorre diminuição da expressão de genes hipotalâmicos de neuropeptídios como POMC, CART e o MCH, indicando diminuição no consumo energético em indivíduos mais velhos (KAPPELER et al., 2003).

Visto que a LHA pode ser dividida em regiões mamilar, tuberal e anterior, e que essas regiões apresentam particularidades descritas quanto a sua conectividade (SAPER, 1979), além da análise da LHA total de ambos os lados, também analisamos os dados densitométricos e os dados quantitativos fornecidos pela reconstrução tridimensional nas três regiões da LHA.

As três regiões da LHA apresentaram o aumento de densidade média entre o grupo de 28 dias e grupos de 50 e 90 dias, comportando-se de forma semelhante a LHA como um todo. Além disso, a LHA tuberal apresenta comportamento semelhante ao da LHA total quanto a densidade óptica média.

Os resultados obtidos mostram também que, com o envelhecimento, há uma diminuição significativa da área em todas as regiões, diminuição da densidade média para o RNAm do ppMCH

nas regiões mamilar e tuberal da LHA, com tendência semelhante para região anterior, porém sem significância estatística (Figura 36). Os resultados de DOI nas regiões também evidenciam a diminuição, com o envelhecimento, na região anterior e especialmente na região tuberal, onde os dados apresentam uma relação de grandeza entre os grupos experimentais muito semelhante à LHA como um todo, o que também pode ser observado para os dados de densidade óptica média. Este aspecto, e a maior quantidade de neurônios MCH-ir presentes na LHA, evidenciados nos estudos de reconstrução tridimensional e mapeamento, nos indicam que essa região da LHA sofra as maiores alterações na expressão para o RNAm do ppMCH em função da idade.

Apesar do comportamento constante do número de neurônios MCH-ir durante o envelhecimento, a diminuição da expressão do RNAm do ppMCH nos parece indicar a diminuição de disponibilidade desse neuropeptídeo na LHA com o envelhecimento. Esse efeito parece ocorrer também com a orexina, outro neuropeptídeo importante no comportamento alimentar presente na LHA, já que foi observada a diminuição do número de neurônios orexinérgicos com o processo de envelhecimento (KESSLER et al., 2011).

Reconstrução Tridimensional

Todos os grupos experimentais estudados apresentaram imunomarcagem para MCH e seu padrão de distribuição na área hipotalâmica lateral está de acordo com o descrito anteriormente por Bittencourt et al. (1992). Assim como observado por Hahn (2010), os neurônios MCH-ir são encontrados na metade mais caudal do hipotálamo, desde os cortes mais rostrais do hipotálamo mamilar até secções mais caudais na altura do núcleo paraventricular do hipotálamo.

A distribuição dos neurônios MCH-ir na LHA se manteve constante entre os grupos experimentais nas três regiões da LHA, sendo semelhante a descrita anteriormente (SWANSON et al., 2005; HAHN, 2010), com predomínio de células marcadas nas regiões perifornical, magnocelular e dorsal. A região central da LHA apresenta menor número de células, devido a passagem de grande número de fibras do feixe prosencefálico medial. Mesmo no grupo de 14 dias foi possível observar um padrão de distribuição semelhante aos grupos de animais adultos, indicando que, provavelmente, a migração dos somas MCH-ir esteja finalizada um pouco antes do 16º dia pós-natal como observado previamente (STEININGER et al., 2004).

Apesar da reconstrução tridimensional ter sido realizada em apenas um animal de cada grupo experimental, os dados quantitativos fornecidos estão de acordo com a estimativa realizada pela estereologia e permitem, ainda, sugerir que não há diferença no número de neurônios MCH-ir dentro e fora da LHA e que as células MCH-érgicas apresentam maior compactação dentro da LHA em todos os grupos.

A relação entre os neurônios MCH-LHA e MCH-OUT não se mantém quando analisamos as divisões da LHA separadamente, de forma que a LHA tuberal contém o maior número de neurônios MCH-ir dentro da LHA e as regiões mamilar e anterior, maior quantidade de neurônios MCH-ir fora da LHA. Assim, podemos inferir que a região tuberal sofre maiores modificações nas alterações que ocorrem nos neurônios MCH-ir da LHA com o processo de envelhecimento.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas análises estereológica, de reconstrução tridimensional e de mensuração da densidade óptica nos permitem concluir que:

- O número dos neurônios MCH-ir na LHA não sofre alteração em função da idade desde a pré-puberdade até a senilidade;.
- A distribuição dos neurônios MCH-ir não é alterada com o passar da idade;
- Após a maturação do sistema MCH-érgico, a expressão do RNAm para o MCH aumenta durante o desenvolvimento pós-natal e diminui com o envelhecimento na LHA como um todo e em suas regiões;

Assim, acreditamos que a quantidade de MCH produzida na LHA diminui em função da idade e essa alteração de expressão estaria associada às mudanças em processos fisiológicos, nos quais o MCH está envolvido, durante o processo de envelhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIMOTO, S.; MIYASAKA, K. Age-associated changes of appetite-regulating peptides. **Geriatr Gerontol Int**, v. 10 Suppl 1, p. S107-19, 2010.
- ALLAËYS, I.;BOUYER, K.;LOUDES, C.;FAIVRE-BAUMAN, A.;PETIT, F.;ORTOLA, C.;CARDINAUD, B.;EPELBAUM, J.;NAHON, J. L. Characterization of mch-gene-overprinted-polypeptide-immunoreactive material in hypothalamus reveals an inhibitory role of pro-somatostatin1-64 on somatostatin secretion. **Eur J Neurosci**, v. 19, p. 925-36, 2004.
- ANDREOLLO, N. A.;SANTOS, E. F.;ARAUJO, M. R.;LOPES, L. R. Rat's age versus human's age: What is the relationship? **Arq Bras Cir Dig**, v. 25, p. 49-51, 2012.
- BAKER, B. I. Melanin-concentration hormone updated functional considerations. **Trends Endocrinol Metab**, v. 5, p. 120-6, 1994.
- BERNARDIS, L. L.; BELLINGER, L. L. The lateral hypothalamic area revisited: Neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 17, p. 141-193, 1993.
- BERNARDIS, L. L.; BELLINGER, L. L. The lateral hypothalamic area revisited: Ingestive behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 20, p. 189-287, 1996.
- BERTHOUD, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, p. 393-428, 2002.
- BITTENCOURT, J. C. Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. **Gen Comp Endocrinol**, v. 172, p. 185-97, 2011.
- BITTENCOURT, J. C.;PRESSE, F.;ARIAS, C.;PETO, C.;VAUGHAN, J.;NAHON, J. L.;VALE, W.;SAWCHENKO, P. E. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: An immuno- and hybridization histochemical characterization. **J Comp Neurol**, v. 319, p. 218-45, 1992.
- BRISCHOUX, F.; FELLMANN, D.; RISOLD, P. Y. Ontogenetic development of the diencephalic mch neurons: A hypothalamic 'mch area' hypothesis. **Eur J Neurosci**, v. 13, p. 1733-44, 2001.
- BROBERGER, C. Brain regulation of food intake and appetite: Molecules and networks. **J Intern Med**, v. 258, p. 301-27, 2005.
- BROBERGER, C.;DE LECEA, L.;SUTCLIFFE, J. G.;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. **J Comp Neurol**, v. 402, p. 460-74, 1998.
- CROSBY, E. C.; WOODBURNE, R. T. **The comparative anatomy of the preoptic area and the hypothalamus**: Williams & Wilkins. 1940
- ELIAS, C. F.;ASCHKENASI, C.;LEE, C.;KELLY, J.;AHIMA, R. S.;BJORBAEK, C.;FLIER, J. S.;SAPER, C. B.;ELMQUIST, J. K. Leptin differentially regulates npy and pomc neurons projecting to the lateral hypothalamic area. **Neuron**, v. 23, p. 775-86, 1999.
- ELIAS, C. F.;SAPER, C. B.;MARATOS-FLIER, E.;TRITOS, N. A.;LEE, C.;KELLY, J.;TATRO, J. B.;HOFFMAN, G. E.;OLLMANN, M. M.;BARSH, G. S.;SAKURAI, T.;YANAGISAWA, M.;ELMQUIST, J. K. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. **J Comp Neurol**, v. 402, p. 442-59, 1998.
- ELIAS, C. F.;SITA, L. V.;ZAMBON, B. K.;OLIVEIRA, E. R.;VASCONCELOS, L. A.;BITTENCOURT, J. C. Melanin-concentrating hormone projections to areas involved in somatomotor responses. **J Chem Neuroanat**, v. 35, p. 188-201, 2008.
- FADEL, J. R.; JOLIVALT, C. G.; REAGAN, L. P. Food for thought: The role of appetitive peptides in age-related cognitive decline. **Ageing Res Rev**, v. p. 2013.
- FAN, W.;BOSTON, B. A.;KESTERSON, R. A.;HRUBY, V. J.;CONE, R. D. Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. **Nature**, v. 385, p. 165-8, 1997.
- GUNDERSEN, H. J.;BAGGER, P.;BENDTSEN, T. F.;EVANS, S. M.;KORBO, L.;MARCUSSEN, N.;MOLLER, A.;NIELSEN, K.;NYENGAARD, J. R.;PAKKENBERG, B. The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Apmis**, v. 96, p. 857-81, 1988.
- GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **J Microsc**, v. 147 (Pt 3), p. 229-63, 1987.
- HAHN, J. D. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin peptide expression patterns in a current parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. **Neurosci Lett**, v. 468, p. 12-7, 2010.
- HAKANSSON, M. L.;BROWN, H.;GHILARDI, N.;SKODA, R. C.;MEISTER, B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 559-572, 1998.
- HERVIEU, G. J.;CLUDERAY, J. E.;HARRISON, D.;MEAKIN, J.;MAYCOX, P.;NASIR, S.;LESLIE, R. A. The distribution of the mrna and protein products of the melanin-concentrating hormone (mch) receptor gene, slc-1, in the central nervous system of the rat. **Eur J Neurosci**, v. 12, p. 1194-216, 2000.
- HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. **Am J Clin Pathol**, v. 75, p. 816-21, 1981.
- HSU, S. M.; SOBAN, E. Color modification of diaminobenzidine (dab) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 30, p. 1079-82, 1982.
- KADAR, A.;WITTMANN, G.;LIPOSITS, Z.;FEKETE, C. Improved method for combination of immunocytochemistry and nissl staining. **J Neurosci Methods**, v. 184, p. 115-8, 2009.

- KAPPELER, L.;GOURDJI, D.;ZIZZARI, P.;BLUET-PAJOT, M. T.;EPELBAUM, J. Age-associated changes in hypothalamic and pituitary neuroendocrine gene expression in the rat. **J Neuroendocrinol**, v. 15, p. 592-601, 2003.
- KAWAUCHI, H.;KAWAZOE, I.;TSUBOKAWA, M.;KISHIDA, M.;BAKER, B. I. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. **Nature**, v. 305, p. 321-3, 1983.
- KESSLER, B. A.;STANLEY, E. M.;FREDERICK-DUUS, D.;FADEL, J. Age-related loss of orexin/hypocretin neurons. **Neuroscience**, v. 178, p. 82-8, 2011.
- KNOLLEMA, S.;BROWN, E. R.;VALE, W.;SAWCHENKO, P. E. Novel hypothalamic and preoptic sites of prepro-melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid and peptide expression in lactating rats. **J Neuroendocrinol**, v. 4, p. 709-17, 1992.
- KONADHODE, R. R.;PELLURU, D.;BLANCO-CENTURION, C.;ZAYACHKIVSKY, A.;LIU, M.;UHDE, T.;GLEN, W. B., JR.;VAN DEN POL, A. N.;MULHOLLAND, P. J.;SHIROMANI, P. J. Optogenetic stimulation of mch neurons increases sleep. **J Neurosci**, v. 33, p. 10257-63, 2013.
- KOYLU, E. O.;COUCEYRO, P. R.;LAMBERT, P. D.;LING, N. C.;DESOUZA, E. B.;KUHAR, M. J. Immunohistochemical localization of novel cart peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. **J Neuroendocrinol**, v. 9, p. 823-33, 1997.
- KRILOWICZ, B. L.; SZYMUSIAK, R.; MCGINTY, D. Regulation of posterior lateral hypothalamic arousal related neuronal discharge by preoptic anterior hypothalamic warming. **Brain Research**, v. 668, p. 30-38, 1994.
- KUHAR, M. J.;ADAMS, S.;DOMINGUEZ, G.;JAWORSKI, J.;BALKAN, B. Cart peptides. **Neuropeptides**, v. 36, p. 1-8, 2002.
- KULESZA, J., RANDY J.;VINUELA, A.;SALDANA, E.;BERREBI, A. S. Unbiased stereological estimates of neuron number in subcortical auditory nuclei of the rat. **Hearing Research**, v. 168, p. 12-24, 2002.
- LARSEN, P. J.; HAY-SCHMIDT, A.; MIKKELSEN, J. D. Efferent connections from the lateral hypothalamic region and the lateral preoptic area to the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 342, p. 299-319, 1994.
- LE GROS CLARK, W. E. Morphological aspects of the hypothalamus. In: (Ed.). **The hypothalamus**. Edinburgh: Oliver and Boyd, 1938. Morphological aspects of the hypothalamus, p.1-68
- 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, p. e103585,
- LIM, A. S.;ELLISON, B. A.;WANG, J. L.;YU, L.;SCHNEIDER, J. A.;BUCHMAN, A. S.;BENNETT, D. A.;SAPER, C. B. Sleep is related to neuron numbers in the ventrolateral preoptic/intermediate nucleus in older adults with and without alzheimer's disease. **Brain**, v. 137, p. 2847-61, 2014.
- MILLER, C. L.;HRUBY, V. J.;MATSUNAGA, T. O.;BICKFORD, P. C. Alpha-msh and mch are functional antagonists in a cns auditory gating paradigm. **Peptides**, v. 14, p. 431-440, 1993.
- NAHON, J. L.; ABBA, J. K. The melanin-concentrating hormone. In: (Ed.). **Handbook of biologically active peptides**. Burlington: Academic Press, 2006. The melanin-concentrating hormone, p.705-714
- NAHON, J. L.;PRESSE, F.;BRETON, C.;HERVIEU, G.;SCHORPP, M. Structure and regulation of the melanin-concentrating hormone gene. **Ann N Y Acad Sci**, v. 680, p. 111-29, 1993.
- NAHON, J. L.;PRESSE, F.;VAUGHAN, J.;FISCHER, W.;BITTENCOURT, J. C.;HOEGER, C.;SCHOEPFER, R.;RIVIER, J.;SAWCHENKO, P. E.;VALE, W. Characterization of mammalian melanin concentrating hormones and their precursors. In: CASANUEVA, F. A. D., C., (Ed.). **Recent advances in basic and clinical neuroendocrinology**: ELSEVIER SCIENCE PUBL B V 1989. Characterization of mammalian melanin concentrating hormones and their precursors, p.15-23
- PANKSEPP, M. A. Anatomy of the hypothalamus. New York: Marcel Dekker. 1: 726 p. 1979.
- PARKES, D. G.; VALE, W. W. Contrasting actions of melanin-concentrating hormone and neuropeptide-e-i on posterior pituitary function. **Ann N Y Acad Sci**, v. 680, p. 588-90, 1993.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates: The new coronal set - 161 diagrams**. San Diego: Academic Press. 2005
- PETERVARI, E.;SOOS, S.;SZEKELY, M.;BALASKO, M. Alterations in the peptidergic regulation of energy balance in the course of aging. **Curr Protein Pept Sci**, v. 12, p. 316-24, 2011.
- PEYRON, C.;SAPIN, E.;LEGER, L.;LUPPI, P. H.;FORT, P. Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. **Peptides**, v. 30, p. 2052-9, 2009.
- PRESSE, F.; NAHON, J. L. Differential regulation of melanin-concentrating hormone gene expression in distinct hypothalamic areas under osmotic stimulation in rat. **Neuroscience**, v. 55, p. 709-20, 1993.
- PRESSE, F.;SOROKOVSKY, I.;MAX, J. P.;NICOLAIDIS, S.;NAHON, J. L. Melanin-concentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food-deprivation and glucopenia in the rat. **Neuroscience**, v. 71, p. 735-45, 1996.
- QU, D.;LUDWIG, D. S.;GAMMELTOFT, S.;PIPER, M.;PELLEYMOUNTER, M. A.;CULLEN, M. J.;MATHES, W. F.;PRZYPEK, R.;KANAREK, R.;MARATOS-FLIER, E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. **Nature**, v. 380, p. 243-7, 1996.
- QUINN, R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, p. 775-7, 2005.
- RISOLD, P. Y.;CROIZIER, S.;LEGAGNEUX, K.;BRISCHOUX, F.;FELLMANN, D.;GRIFFOND, B. The development of the mch system. **Peptides**, v. 30, p. 1969-72, 2009.
- ROBERTS, S. B. Energy regulation and aging: Recent findings and their implications. **Nutrition Reviews**, v. 58, p. 91-97, 2000.
- RODRIGUES, B. C.; CAVALCANTE, J. C.; ELIAS, C. F. Expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat forebrain during postnatal development. **Neuroscience**, v. 195, p. 201-14, 2011.
- RONDINI, T. A.;DONATO, J., JR.;RODRIGUES BDE, C.;BITTENCOURT, J. C.;ELIAS, C. F. Chemical identity and connections of medial preoptic area neurons expressing melanin-concentrating hormone during lactation. **J Chem Neuroanat**, v. 39, p. 51-62, 2010.

- RONDINI, T. A.; RODRIGUES BDE, C.; DE OLIVEIRA, A. P.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Melanin-concentrating hormone is expressed in the laterodorsal tegmental nucleus only in female rats. **Brain Res Bull**, v. 74, p. 21-8, 2007.
- ROSSI, M.; CHOI, S. J.; O'NEILL, S. H.; MIYOSHI, T.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. **Endocrinology**, v. 138, p. 351-355, 1997.
- SAITO, Y.; CHENG, M.; LESLIE, F. M.; CIVELLI, O. Expression of the melanin-concentrating hormone (mch) receptor mRNA in the rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 435, p. 26-40, 2001.
- SAPER, C. B. Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections. **Journal of Comparative Neurology**, v. 237, p. 21-46, 1985.
- SAPER, C. B. Image is everything. **J Comp Neurol**, v. 412, p. 381-2, 1999.
- SAPER, C. B.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Lateral hypothalamic innervation of the cerebral cortex: Immunoreactive staining for a peptide resembling but immunohistochemically distinct from pituitary/arcuate α -melanocyte stimulating hormone. **Brain Research Bulletin**, v. 16, p. 107-120, 1986.
- SAPER, C. B.; CHOU, T. C.; ELMQUIST, J. K. The need to feed: Homeostatic and hedonic control of eating. **Neuron**, v. 36, p. 199-211, 2002.
- SAPER, C. B.; SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. **J Comp Neurol**, v. 183, p. 689-706, 1979.
- SATINOFF, E.; SHAN, S. Y. Loss of behavioral thermoregulation after lateral hypothalamic lesions in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 77, p. 302-312, 1971.
- SAWCHENKO, P. E. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: The anatomists weigh in. **J Comp Neurol**, v. 402, p. 435-41, 1998.
- SCHENK, M. P.; MANNING, R. J.; PAALMAN, M. H. Going digital: Image preparation for biomedical publishing. **Anat Rec**, v. 257, p. 128-36, 1999.
- SCHMIDT, F. M.; KRATZSCH, J.; GERTZ, H. J.; TITTMANN, M.; JAHN, I.; PIETSCH, U. C.; KAISERS, U. X.; THIERY, J.; HEGERL, U.; SCHONKNECHT, P. Cerebrospinal fluid melanin-concentrating hormone (mch) and hypocretin-1 (hcrt-1, orexin-a) in Alzheimer's disease. **PLoS One**, v. 8, p. e63136, 2013.
- SHIMADA, M.; TRITOS, N. A.; LOWELL, B. B.; FLIER, J. S.; MARATOS-FLIER, E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. **Nature**, v. 396, p. 670-4, 1998.
- SIMERLY, R. B.; GEORGE, P. Chapter 14 - anatomical substrates of hypothalamic integration. In: (Ed.). **The rat nervous system (third edition)**. Burlington: Academic Press, 2004. Chapter 14 - anatomical substrates of hypothalamic integration, p.335-368
- SITA, L. V.; ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system. **Neuroscience**, v. 148, p. 949-69, 2007.
- SLOMIANKA, L.; WEST, M. J. Estimators of the precision of stereological estimates: An example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. **Neuroscience**, v. 136, p. 757-67, 2005.
- SQUIRE, L. **Fundamental neuroscience**: Elsevier, 2008
- STEININGER, T. L.; KILDUFF, T. S.; BEHAN, M.; BENCA, R. M.; LANDRY, C. F. Comparison of hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone neurons and axonal projections in the embryonic and postnatal rat brain. **J Chem Neuroanat**, v. 27, p. 165-81, 2004.
- SWANSON, L. W. The hypothalamus. In: (Ed.). **Bjorklund t. Hokfelt and swanson, I.W.(eds). Handbook of chemical neuroanatomy**: Elsevier Science Publisher, v.5, 1987. The hypothalamus, p.1-124
- SWANSON, L. W.; SANCHEZ-WATTS, G.; WATTS, A. G. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parcelling scheme of the lateral hypothalamic zone. **Neurosci Lett**, v. 387, p. 80-4, 2005.
- SZEKELY, M.; SZELENYI, Z. Regulation of energy balance by peptides: A review. **Curr Protein Pept Sci**, v. 6, p. 327-353, 2005.
- SZYMUSIAK, R.; IRIYE, T.; MCGINTY, D. Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamic area of cats. **Brain Research Bulletin**, v. 23, p. 111-120, 1989.
- THANNICKAL, T. C.; LAI, Y. Y.; SIEGEL, J. M. Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease. **Brain**, v. 130, p. 1586-95, 2007.
- TORTEROLO, P.; LAGOS, P.; MONTI, J. M. Melanin-concentrating hormone: A new sleep factor? **Front Neurol**, v. 2, p. 14, 2011.
- TOUMANIANTZ, G.; BITTENCOURT, J. C.; NAHON, J. L. The rat melanin-concentrating hormone gene encodes an additional putative protein in a different reading frame. **Endocrinology**, v. 137, p. 4518-21, 1996.
- TOUMANIANTZ, G.; FERREIRA, P. C.; ALLAEYS, I.; BITTENCOURT, J. C.; NAHON, J. L. Differential neuronal expression and projections of melanin-concentrating hormone (mch) and mch-gene-overprinted-polypeptide (mgop) in the rat brain. **Eur J Neurosci**, v. 12, p. 4367-80, 2000.
- VAUGHAN, J. M.; FISCHER, W. H.; HOEGER, C.; RIVIER, J.; VALE, W. Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. **Endocrinology**, v. 125, p. 1660-5, 1989.
- VERRET, L.; GOUTAGNY, R.; FORT, P.; CAGNON, L.; SALVERT, D.; LEGER, L.; BOISSARD, R.; SALIN, P.; PEYRON, C.; LUPPI, P. H. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. **BMC Neurosci**, v. 4, p. 19, 2003.
- VRANG, N.; LARSEN, P. J.; CLAUSEN, J. T.; KRISTENSEN, P. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. **J Neurosci**, v. 19, p. RC5, 1999.
- WEST, M. J.; GUNDERSEN, H. J. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. **J Comp Neurol**, v. 296, p. 1-22, 1990.
- WEST, M. J.; SLOMIANKA, L.; GUNDERSEN, H. J. G. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **The Anatomical Record**, v. 231, p. 482-497, 1991.

ZHANG, M.; HAN, L.; XU, Y. Roles of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the central nervous system. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 39, p. 586-92, 2012.

ZHANG, Y. H.; HOSONO, T.; YANASE-FUJIWARA, M.; CHEN, X. M.; KANOSUE, K. Effect of midbrain stimulations on thermoregulatory vasomotor responses in rats. **Journal of Physiology**, v. 503, p. 177-186, 1997.

APÊNDICES - Protocolos

APÊNDICE A - Protocolo de acasalamento programado de ratos

(Linhagens *Wistar* e *Sprague-Dawley*)

Dados gerais animais

Idade reprodutiva: a partir de 90 dias
 Período de gestação: 20-22 dias
 Período de amamentação: 21 dias
 Duração de ciclo estral da fêmea: 5-6 dias

Aquisição de animais

1. Calcular a quantidade necessária de reprodutores a serem acasalados de acordo com o número de animais solicitados.
2. O acasalamento deve ser realizado com antecedência, considerando: cópula + período de gestação da espécie + amamentação + idade experimental dos animais
3. As datas de nascimento dos animais reprodutores (machos e fêmeas) devem ser verificadas e anotadas. Machos e fêmeas devem possuir datas próximas de nascimento.
4. Os animais atingem sua maturidade reprodutiva e estão aptos ao acasalamento com cerca de 90 dias de idade.
5. No biotério, enquanto os animais não chegam na data programada, intercalar as caixas entre machos e fêmeas para que ocorra percepção pelo odor, facilitando a posterior apresentação.

Apresentação dos casais

Importante: Os machos devem estar em suas caixas novas com pelo menos 24h de antecedência, para que realizem a marcação de território.

1. Separar os materiais necessários: caixas, grades, fichas de registro, garrafas, balança.
2. Pesquisar todas as fêmeas que irão compor os casais, para controle durante a prenhez.
3. Identificar fêmeas e machos de maneira a diferenciar cada casal (com letras, por exemplo)
4. Próximo ao início do ciclo escuro, colocar a fêmea A na caixa do macho A, fêmea B na caixa do macho B. É possível apresentar até 03 fêmeas para um macho, dependendo da disponibilidade de reprodutores.
5. Os casais devem permanecer juntos por 6 dias (duração do ciclo estral).
6. Registrar na ficha da gaiola: linhagem, letra de identificação do casal, se preferir as datas de nascimentos dos reprodutores.
7. Coletar lavado vaginal das fêmeas pela manhã durante todos os dias do período de acasalamento, em duplicata se possível, para posterior coloração e confirmação da prenhez. Anotar datas das coletas nas lâminas e fazer mapa da lâmina para identificar o material (vide exemplo).

Data - Lâm. 01	1	2	3	4	5
	A	B	C	D	E
	6	7	8	9	10
	A	B	C	D	E

8. A prenhez é confirmada após visualização de espermatozoides no lavado vaginal coletado (Figura A1). Analisar o material e anotar a data de diagnóstico positivo para cada animal. Ao final do sexto dia de acasalamento, retirar as fêmeas das caixas. Para coleta, fixação, coloração e montagem de esfregaços vaginais devem ser seguidas as seguintes etapas:

1. Coleta

Material necessário: solução fisiológica NaCl (0,9%), ponteira de 200µl, lâminas histológicas com pocinhos, água destilada, borracha para sucção.

- Identificar as lâminas histológicas com a data da coleta e o número dos animais. Anotar qual animal corresponde a cada um dos pocinhos.
- Segurar o animal firmemente, como no procedimento de injeção intraperitoneal, expondo-se a vagina mais facilmente. De preferência, sempre fazer a coleta em duas pessoas.
- Completar a ponteira com soro fisiológico.
- Na entrada da vagina, com muito cuidado, liberar e sugar o soro fisiológico cerca de três vezes para obter o lavado vaginal com as células descamadas.

- Colocar o líquido obtido no pocinho correspondente ao animal.
- Sempre descartar a ponteira entre uma coleta e outra.

2. Fixação, coloração e montagem

- Deixar o material em estufa desligada durante 12h para secagem.
- Fixar com passagem em álcool absoluto. Deixar secar por mais 12h em estufa desligada.

- Após esse período, é possível se iniciar a coloração.

- 30s em álcool 100% I
- 30s em álcool 95%
- 30s em álcool 70%
- 30s em água destilada
- 2min em hematoxilina filtrada (*Hematoxilina de Harris, CAS 517-28-2*)
- 2 lavagens de 30s/cada em água destilada
- 5 lavagens em água corrente
- 30s em álcool 70%
- 30s em álcool 95%
- 30s em álcool 100% I
- 1min em Orange-G (*Orange-G, Sigma #O-1625*)
- 30s em álcool 100% I
- 30s em álcool 100% II
- 2min em eosina (*Eosina amarela 0,25%, CAS 17372-87-1*)
- 30s em álcool 100% I
- 30s em álcool 100% II
- 1min em xilol I
- 1 min em xilol II

- Montagem: adicionar um fio de Permount junto à borda inferior da lamínula e deitar a lâmina sobre ela com cuidado, a fim de expulsar todo o ar e evitar a formação de bolhas. Checar a montagem contra uma superfície escura. Deixar as lâminas secando e, posteriormente, limpar o excesso de cola com um pano umedecido com xilol.

Preparo Orange-G

Álcool 99,5%	800ml
Orange-G	5g
Ácido fosfotúngico (<i>Sigma #P-4006</i>)	0,16g
H ₂ O destilada	200ml

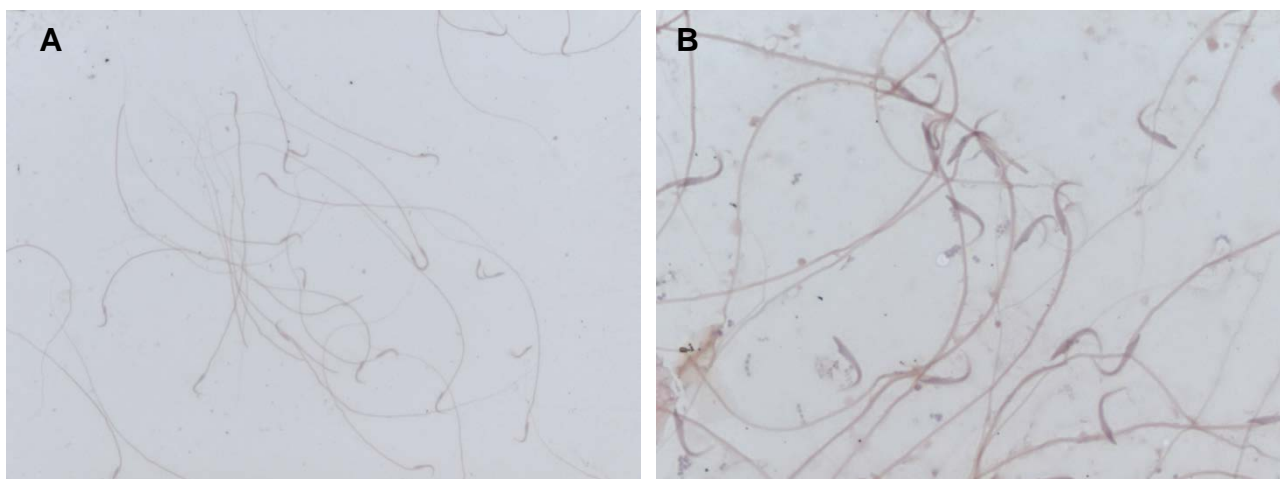


Figura A1: Espermatozoides visualizados em lavado vaginal no dia seguinte à cópula. Em A, fotomicrografia com objetiva de 40x. Em B, fotomicrografia com objetiva de 100X.

9. As fêmeas que apresentarem diagnóstico positivo devem ser colocadas sozinhas, em caixas separadas e devidamente identificadas.

10. As que não apresentarem a prenhez podem ser apresentadas a outro macho (mais eficiente) ou ao mesmo que estava.

Acompanhamento da prenhez

Importante: Após o décimo dia de gestação, as fêmeas ganham de 30 a 40g em peso corporal. Além disso, é possível observar um aumento em seu diâmetro abdominal.

1. Preencher tabela com todos dados de pesos das fêmeas, datas de diagnóstico e provável nascimento da prole, a data em que a prole atingirá a idade de desmame (21º dia) e a data em que os animais atingirão a idade experimental desejada. Assim será possível acompanhar com mais critério toda a programação pós-acasalamento.

Fêmea	Peso Inicial (antes da apresentação ao macho)	Data da Prenhez	Data do 10º dia de prenhez	Peso da fêmea no 10º dia de prenhez	Data de Nascimento da prole	Data que a prole atinge a data de desmame	Data que a prole atinge a data experimental desejada
A							
B							
D							
C							

2. O tempo de gestação de uma rata é de 20-22 dias, embora devido a um atraso na implantação do embrião, o nascimento dos filhotes pode demorar mais que 22 dias, atingindo até 25-26 dias.

Importante: O ambiente de biotério deve ser o mais favorável possível para o tempo de gestação das fêmeas. Fêmeas prenhes estão mais suscetíveis a estresse, assim é fundamental evitar excesso de barulho, manejo inadequado, entre outras situações que podem gerar episódios de estresse e colocar a gestação desses animais em risco.

3. Se possível, realizar a pesagem das fêmeas prenhes semanalmente e acompanhar o ganho de peso durante o período. Seu manejo deve ser feito com todo cuidado, evitando situações de estresse.

4. Próximo à data programada para o nascimento da prole, trocar a caixa da fêmea para que ela possa construir seu ninho em maravalha limpa. É importante checar se os nascimentos ocorreram todos os dias (uma vez no período da manhã e uma vez no período da tarde), para que a data de nascimento da prole seja marcada com precisão.

5. Observada a presença da ninhada (Figura A2), anotar na ficha da fêmea a data de nascimento dos novos animais. Evitar mexer com a prole nesse dia e aguardar pelo menos 2-3 dias, se possível.



Figura A2: Ninhada de ratos linhagem *Sprague-Dawley* com 10 dias de idade

Sexagem dos filhotes

1. A sexagem pode ser feita nos primeiros dias em que a ninhada nasceu. Se a data experimental desejada permite que a sexagem seja feita mais tarde, 10 dias de idade por exemplo, a chance de acerto é maior para pessoas inexperientes.

2. A separação por gênero é feita através da observação da distância anogenital de cada filhote. Em machos essa distância é maior e em fêmeas menor (Figuras A3 e A4). Além disso, em fêmeas é possível notar a presença de mamas e nos machos o início da decídua testicular.



Figura A3: Distância anogenital em macho de 10 dias de idade.



Figura A4: Distância anogenital em fêmea de 10 dias de idade.

3. Após a identificação de gênero de cada animal, marcar na ficha de cada caixa a quantidade de machos e fêmeas para controle.

Desmame

1. Quando a prole atinge o 21º dia de vida, separá-la da mãe para realizar o desmame. Identificar perfeitamente a nova caixa, com a quantidade de cada animal, a data de nascimento, e a que mãe pertence a prole.
2. Também pode-se realizar a separação da própria prole em duas caixas por gênero, dependendo da idade experimental desejada para que não ocorra acasalamento consanguíneo.

APÊNDICE B - Protocolo padrão de imuno-histoquímica – MCH

1º Dia

Antes de iniciar a imuno verificar:

Data: _____ Horário do início: _____ Horário previsto para término: _____

Potinhos a serem utilizados: _____

Material necessário: pincéis, redinhas, becker para descarte de soluções e para dosar tampões, suporte para potinhos, agitador orbital, tampões, inibição de peroxidase, anticorpos (primário e secundário), soluções de bloqueio e reação histoquímica. (repassar todo o protocolo antes de iniciar!!)

- PB (tampão fosfato) 0,1 M pH 7.42 X 10 min. em agitação.

PB se prepara a partir da solução estoque 0,4M. Diluir 1 parte de PB 0,4M em 3 partes de H₂O destilada.

A solução estoque se prepara:

Tampão fosfato 0,4 M pH 7,4

- Na₂HPO₄ (M= 141,96 Merck 1.06586.0500).....45,12 g

- NaH₂PO₄ · H₂O (M= 137,99 Merck 1.06346.0500)11,04g

- H₂O destilada.....1000 ml

Ajustar o pH com solução de HCl a 3M até pH 7,4

*Em 800ml de água, adicionar os sais aos poucos em agitador e então completar até 1000ml.

- Inibição da peroxidase endógena1 X 20 min. em agitação.

A solução de inibição da peroxidase endógena se prepara adicionando 9 partes de PB 0,1M pH 7,4 e uma parte de H₂O₂ 33% (P.A.). Incubar 3 ml por potinho.

- PB (tampão fosfato) 0,1 M pH 7.45 X 5 min. em agitação.

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,603 X 10 min. em agitação.

TBS-Tx se prepara diluindo 1 parte da solução estoque 10X em 9 partes de H₂O destilada ou:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121,1).....6,06 gr

- NaCl.....8,85 gr

- Triton X-100 (Merck - 1.08603.1000 C₃₄H₆₂O₁₁ PM 646,37) à 20%.....25 ml

- H₂O dest.....q.s.p. 1000 ml

*Ajustar o pH com solução de HCl 3M até 7,60

- Bloqueio de marcação inespecífica.....1 X 40 min. em agitação.

Incubar em solução de soro normal da espécie onde foi produzido o anticorpo secundário, em soro normal de cabra inativado. Preparar a solução a 2% em TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar 1 ml por potinho.

- Anticorpo primário anti-MCH produzido em coelho, concentração 1:600048 horas à 4 °C em agitação.

2º Dia

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação.

- Anticorpo secundário: anti-IgG de coelho feito em cabra, concentração 120 min. temp. ambiente em agitação.

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação

- Incubação em ABC 1/200 (Vector - Vectastain Standart Kit PK4000)..... 120 min. à temp. amb.

ou uma noite à 4 °C, em agitação.

Solução de incubação ABC Kit para 4 ml (4 potinhos, Incubar 1 ml por potinho):

- 4 ml TBS-Tx 0,05 M pH 7,6 + 20µl solução A (laranja)

- Agitar bem

- Adicionar 20µl solução B (marrom)

- Agitar bem e esperar 30 minutos para que o complexo se forme e possa ser usado.

*Importante: recuperar o complexo ABC usado por somente uma vez. Marcar e guardar em geladeira para ser utilizado mais uma vez.

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....2 X 10 min. em agitação.

- Tris-HCl 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação.

Tris-HCl se prepara:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121,1).....6,06 gr

- H₂O dest.q.s.p. 1000 ml

Ajustar o pH com solução de HCl até 7,6

- Revelação com DAB.....em baixa agitação e controle visual em microscópio.

Preparar as soluções imediatamente antes de usar e protege-las da luz, pois o DAB é fotossensível. Sempre usar luvas de látex e realizar o procedimento em capela, pois o DAB é carcinogênico.

Solução de revelação DAB (até 5 potinhos):

- 0,05g de níquel amônio sulfato

-12,5 ml Tris-HCl 0,05 M pH 7.60

-Adicionar uma alíquota de 200µl de solução de DAB a 1% em H₂O_{dd} (pegar no freezer) DAB = Sigma D - 9015 PM 360,1

-Adicionar 2,5µl de água oxigenada P.A. imediatamente antes de incubar (H₂O₂ a 30% PM= 34,01 Merck 108597).

- Tris-HCl 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação.

- Montagem dos cortes

Montar os cortes em lâminas, organizando-os em uma placa de Petri com gelatina (Merck 1.04078.0500, para material processado com DAB= Gelatina 0,4

Para preparar a gelatina 0,4% diluir 50 ml da solução estoque 4X, congelada nos tubos falcon, em 150 ml de H₂O dest. Para gelatina a 0,1% diluir 50 ml da solução estoque em 750 ml de H₂O dest.

Obs: a gelatina diluída e em boas condições de uso pode ser identificada e armazenada em freezer.

Pode-se preparar também da seguinte forma:

- gelatina.....0,8g(0,4%) ou 0,2g(0,1%)

- Tris-HCl 0,05Mq.s.p. 200 ml

Ajustar o pH até 7,60, filtrar após a montagem de cada potinho e guardar em freezer para utilização posterior, caso a solução ainda esteja límpida e transparente

- Cobertura com lamínula

Para material com DAB, cobrir adicionando um fio de Permont junto a borda inferior da lamínula e deitando a lâmina sobre a lamínula com cuidado para expulsar o ar e evitar a formação de bolhas. Checar a montagem contra uma superfície escura.

Para material com reagentes fluorescentes, cobrir usando meio de montagem específico de fluorescência. Armazenar as lâminas em geladeira envolvidas com papel alumínio.

APÊNDICE C - Protocolo de hibridização *in situ* para ppMCH

**LABORATÓRIO DE NEUROANATOMIA QUÍMICA (ICB/USP)
TRANSCRIÇÃO DE RIBOPROBE MARCADA COM ³⁵S**

OBS: RNase-FREE

OBS: material radioativo

1º DIA

OBS: pegar RNA polimerase, RNasin e RQ1 DNase e armazenar no rack gelado

pegar 5XTB (kit), ΔNTP, H₂O nuclease free (kit) e cDNA no -20º

pegar UTP ³⁵S do freezer do radioativo

preparar banho a 37º C

identificar eppendorf estéril com o nome da sonda

- ✓ preparar solução de transcrição em tubo eppendorf (1,5mL, embalado individualmente) RNase-FREE

SOLUÇÃO DE TRANSCRIÇÃO

- 4µl de 5XTB
- 0,6µl de RNasin
- 5,5µl de ΔNTP (solução estoque: 5 µL de cada — ATP, CTP, GTP e H₂O)
- cDNA linearizado (calcular volume para a concentração final ser de 0,05µg/µl). Ex: se o cDNA linearizado está 1µg/µl, colocar 1µl para transcrever.
- 4,2µl de UTP-³⁵S
- completar para 32µl com H₂O nuclease-free (só para diluir um pouco a solução)
- 1µl de RNA polimerase
- misturar com a ponteira

- ✓ 30 min na solução de transcrição no banho a 37º C
- ✓ acrescentar 1µl da RNA polimerase (gentilmente)
- ✓ 30 min no banho a 37º C
- ✓ acrescentar H₂O nuclease-free até completar 50µl
- ✓ acrescentar 1µl de RQ1-DNase e 1µl de RNasin (gentilmente)
- ✓ 10 min no banho a 37º C

OBS: enquanto isso, ligar a centrífuga Eppendorf a 4º C no multi-usuário e preparar eppendorfs e 3 frascos de cintilação com 4ml de líquido de cintilação (um branco e duas amostras)

- ✓ colocar uma coluna (Amersham, na geladeira) 5-10s no vórtex (fica opaco)

No multi-usuário:

- quebrar a coluna, abrir ¼ de volta e colocar em eppendorf autoclavado (sem tampa)
- centrifugar a 3500rpm por 2min, 4º C
- desprezar o eppendorf autoclavado e colocar a coluna em outro eppendorf estéril (sem tampa) e aplicar a sonda no centro da resina da coluna
- centrifugar a 3500 rpm por 2 min, 4º C
- transferir líquido para tubo com rosca identificado
- acrescentar 1µl da sonda em tubo de cintilação (2 amostras) e contar no cintilador
- colocar tubos à direita no fundo (“protocol 1” para frente e parte metálica atrás)
- F1 seleciona o programa 1
- F2 inicia a contagem (demora cerca de 15 minutos)

No laboratório:

- ✓ acrescentar 1µl de DTT 5M na sonda e armazenar no freezer da sala de radioativos

PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA ISH EM LÂMINAS

OBS: RNase-FREE

1º DIA

- ✓ montar em lâminas RNase-FREE (Fisher Superfrost Plus) utilizando 1XPBS RNase-FREE + 5 gotas de formalina em placa de petri estéril

- ✓ armazenamento em freezer com cápsulas de sílica se for necessário

2º DIA - PREPARAÇÃO DO TECIDO

OBS: preparar banho a 37°C

- ✓ preparar fixador de tecido (pode ser preparado no dia anterior)

FORMALDEÍDO 4% EM 1XPBS

26,6ml de formaldeído 37% (armazenado embaixo da capela)
25ml de 10XPBS
198,4ml de DEPC H₂O
agitar no próprio frasco

OBS: para as lavagens a seguir não é necessário montar bateria, pode-se usar apenas 2 cubas verdes autoclavadas

- ✓ 5 min em formaldeído 4% em 1XPBS
- ✓ 2x10min em 1XPBS
- ✓ 30 min em Proteinase K 0,5µg/ml em banho a 37°C

PROTEINASE K 0,5µg/ml

25ml de EDTA 0,5M pH8,0
25ml de Tris 1M pH8,0 (comercial, armazenado na geladeira)
200ml H₂O DEPC
250µl PK (aliquotado 10mg/ml e armazenado a -20°C)

- ✓ mergulhos em H₂O DEPC
- ✓ 10min TEA-HCl
- ✓ acetilar: 10 min em TEA-HCl-anidrido acético a Tamb na capela
TEA-HCl- anidrido acético
250ml TEA-HCl 0,1M
625µl anidrido acético (armazenado embaixo da capela)
- ✓ 2X5min em 2XSSC
- ✓ desidratar e deslipidificar:
1 min em ETOH 70%
1 min em ETOH 80%
2 min em ETOH 95%
1 min em ETOH 100%
15 min em xilol (usar de novo nas baterias do lab de baixo)
1 min em ETOH 100%
1 min em ETOH 95%
- ✓ secar as lâminas cerca de 30 minutos e proceder a hibridização ou armazenar em freezer com cápsulas de sílica se for necessário

HIBRIDIZAÇÃO ³⁵S - LÂMINAS

1º DIA: HIBRIDIZAÇÃO

OBS: RNase-FREE

OBS: preparar becker com água na mesa aquecedora a 90-95°C

preparar gelo picado

preparar forno/estufa para 57°C (com duas placas de petri com água)

preparar placa para colocar as lâminas cobrindo com papel de filtro (Whatman) umedecido com 4XSSC/formamida e aplainado com um tubo FALCON. Colocar também duas tampas de tubo FALCON com 4XSSC/formamida nos cantos da placa para umidificar.

- ✓ tecido pré-tratado
- ✓ aplicar a solução da ribossonda ao tecido (100µl/lâmina, aplicado entre os cortes) e cobrir com lamínulas flexíveis estéreis — PONTO CRÍTICO, NÃO CONTAMINAR!!!

SOLUÇÃO DA RIBOSSONDA (1,5ml)

- 750µl de 2XHB (tampão de hibridização alíquotado a -80°C)
- sonda(s) marcada(s) com ³⁵S e/ou digoxigenina (volume depende da contagem no cintilador e da curva de diluição obtida com o dot blot, respectivamente). Em geral, para sondas com digoxigenina, colocar 15µl.
- 5 min em água a 90°C
- 5 min em gelo
- acrescentar (sem fazer bolhas!!!) 750µl de formamida (armazenada a 4°C) e depois misturar por inversão:
- 15µl de SDS 10% (comercial)
- 15µl de Na tiosulfato 10%
- 30µl de DTT 5M (alíquotado, -20°C)

- ✓ incubar tecido "overnight" em estufa a 57°C

2º DIA: PÓS- HIBRIDIZAÇÃO

OBS: a partir daqui não há necessidade do procedimento ser RNase-FREE (bancada azul) material radioativo até tampão de RNase (descarte especial e luvas)

OBS: preparar dois banhos: 50°C e 55°C

para as lavagens a seguir não é necessário montar bateria, pode-se usar apenas 3 potinhos

- ✓ colocar lâminas em becker com 2XSSC para remoção espontânea de lamínulas (descartar lamínulas dentro de um tubo Falcon). → colocar placas e becker no sabão e o papel de filtro no lixo radioativo
- ✓ 30 min em solução de RNase A Tamb

TAMPÃO PARA RNase - 2 L

- 200ml de NaCl 5M
- 80ml de Tris-HCl 1M pH8,0
- 4ml de EDTA 0,5M pH8,0
- 1776ml de H₂O estéril

SOLUÇÃO DE RNase A - 250ml

250ml de tampão para RNase A

500µl de RNase A (alíquotada 10µg/ml e armazenada em freezer) (conc. final =20µg/ml)

- ✓ 30 min em tampão de RNase Tamb
- ✓ um mergulho em 2XSSC
- ✓ continuar os protocolos A, B ou C, conforme for uma dupla marcação ou não

A) ISH com ³⁵S

- ✓ lavar em alta estringência:

OBS: o DTT deve ser acrescentado imediatamente antes de colocar as lâminas)

- 1h em 2XSSC + 1mM de DTT (50µl de DTT 5M em 250ml) em banho a 50°C (previamente aquecido)
- lavar em 0,2XSSC + 1mM DTT a 55°C (previamente aquecido)
- 1h em 0,2XSSC + 1mM de DTT a 55°C (previamente aquecido)
- 1h em 0,2XSSC + 1mM de DTT a 60°C (previamente aquecido)
- ✓ desidratar durante 10 min em EtOH com SSC (1000ml de EtOH 70% + 1ml de 20XSSC)
- ✓ OBS: para preparar 1l de
- ✓ secar ao ar ambiente
- ✓ expor ao filme
- ✓ revelar após 24-72 horas (depende da sonda utilizada) – MCH (48horas)
- ✓ na sala escura: ±1 min em revelador
 - retirada do excesso de revelador com água
 - ±1 min em fixador
 - lavar em água corrente por cerca de 15 minutos
 - secar ao ar ambiente
- ✓ mergulhar na emulsão

REVELAÇÃO

OBS: **luz vermelha**

- ✓ encher potes com revelador e fixador em bandeja contendo água e gelo e esperar até alcançar 16-18°C
- ✓ transferir lâminas para um rack
- ✓ 2 min no revelador
- ✓ mergulhos na H₂O
- ✓ 2 min no fixador
- ✓ 15 min em H₂O corrente
- ✓ desprezar tudo na pia

A) ISH ³⁵S simples:

- fazer coloração de Nissl: mergulhar diretamente na tionina, desidratar e cobrir com DPX
 - limpar excesso de DPX com gilette
 - limpar resto de emulsão: 1 min no hipoclorito (puro)
- 1 min em água
1 min em álcool 100%
secagem ao ar ambiente

APÊNDICE D - Protocolo de estereologia – contagem de células utilizando a ferramenta “optical fractionator” do sistema de estereologia “stereoinvestigator” (MBF Bioscience)

Para realizar a contagem de células no Stereoinvestigator, é necessário utilizar a ferramenta “optical fractionator”. Essa metodologia permite que a contagem seja feita sem nenhuma preferência, ou seja, todos os neurônios da região de interesse tem a mesma oportunidade de serem contados.

Através da pesquisa em literatura (papers e livros) é preciso determinar parâmetros importantes para toda a análise. Todos eles interferirão diretamente no valor do CE Gundersen (coeficiente de erro) e são determinantes para bons resultados na contagem.

Neste estudo, os seguintes dados foram definidos e preenchidos no programa:

Região de interesse: Área Hipotalâmica Lateral

Células de interesse: Neurônios Imunorreativos ao MCH da LHA

Padrão de distribuição das células: Heterogêneo

Section Sampling fraction = Material dividido em 5 séries – intervalo de 150µm

Section Thickness:30µm

Ferramenta que será utilizada: Optical Fractionator

Guard Zones: 2-3 µm

Dissector height: 5µm – dissector centralizado e com tamanho fixo

Counting Frame: 70µm x 70µm

Grid size: 214µm x 163µm

Target cell count: 500 a 1000 cell per animal

CE: Gundersen (m=1) : menor que 0,1 para cada caso experimental

Low Magnification: 4x

High magnification: 100x

Etapas Importantes para Estereologia:

1) Ligar equipamentos na seguinte sequencia: estabilizador, platina motorizada, camera, microscópio. Obs: Desligar na ordem inversa. Não desligar a câmera antes do computador pois o mesmo será re-iniciado e os dados perdidos.

2) Abrir estereoinvestigator e o protocolo.

3) Checar configuração do driver da câmera acoplada ao microscópio
Option > câmera setup> selecionar câmera DC1394

4) Ajustar câmera de vídeo: checar balanço de cor e tempo exposição
Acquisition> Adjust câmera settings> White balance> automatic
Acquisition> Adjust câmera settings>General

5) Realizar a centralização da luz pelo método de kholler

6) Sempre lembrar de ajustar o software de acordo com a objetiva em uso. Para cada mudança da objetiva mudar também a calibração do software

7) Começar um experimento novo em file>new data file.

8) Selecionar o tipo de prova a ser utilizada em probes>optical fractionator. Seguir o passo a passo do software: introduzir os dados do experimento

9) Colocar a lâmina de interesse no microscópio com a superfície ventral em direção a estativa do microscópio. Visualizar material em objetiva de 4x.

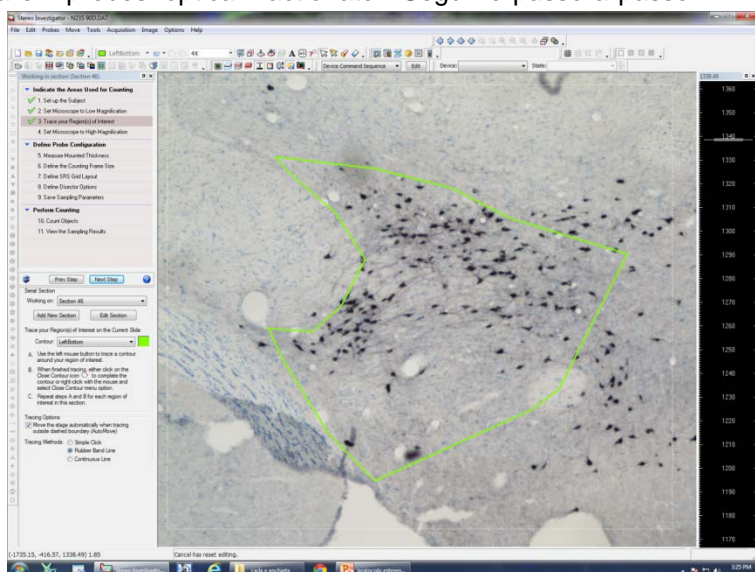
10) Seguir o passo a passo do software: introduzir os dados do experimento:

10.1- Set up the subject: Digitar nome do usuário, número do caso a ser contado.

Em seguida, preencher Section Thickness:30µm, Section Evaluation Interval (5,00), Starting section number (1). Clicar em next step.

10.2- Set the microscope Low Magnification: 4x

10.3- Trace your region(s) of interest
Selecionar contorno para cada área de interesse num mesmo corte. Delimitar a



região por critérios pré-estabelecidos como citoarquitetura. Após delimitação é possível ir pra próxima etapa (next step) ou adicionar nova secção (add new section).

10.4- Set the microscope High Magnification: 100x

10.5- Measure Mounted Thicknbess

Selecionar as opções: *Measure the mounted thickness while counting e Measure mounted thickness at sampling sites*

Evaluation Interval measure every 1 site

10.6- Selecionar a opção *Force the counting frame to be square*

Counting frame size 70µm x 70µm

10.7- Preencher a opção *Determine grid size based on number of sampling sites: 30* , com a quantidade de campos a serem contados. Clicar em *Estimate Grid Size*. Em todos os casos o grid size foi de 214µm x 163µm

10.8- Define Disector Options

Selecionar Opção : *Center the de disector between the guard zones*

Optical Disector Height: 5µm

10.9- Saving Sample Paramenters

Digitar o nome do document o e clicar em *Save your Current Settings*

11) Counting Objects

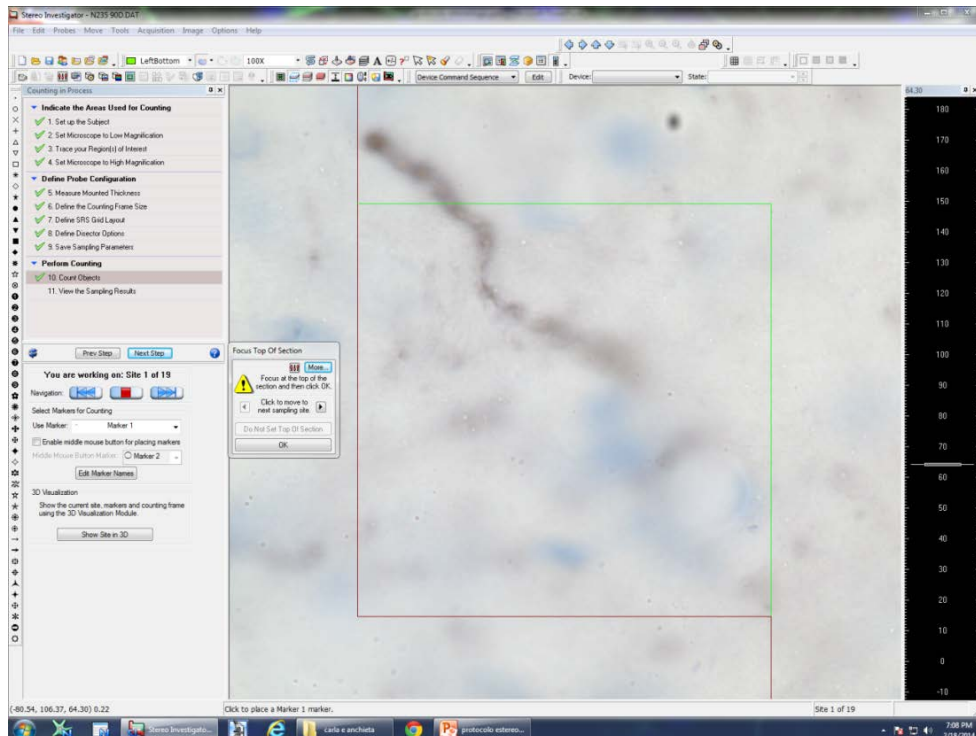
Para contar uma região de interesse previamente traçada, selecione na lista a secção e a região de interesse. Para cada região de interesse devemos posicionar o traçado sobre a secção com a objetiva de 4x. Para isto libere o joystick, posicione o traçado sobre o tecido, conecte o joystick e cheque se o traçado está bem posicionado utilizando o “go to” na janela macro view (clique com botão direito do mouse).

Se o traçado tiver que ser reposicionado, libere novamente o joystick e reposicione, se estiver correto, mude a objetiva no *software* e no microscópio para 100x, coloque a lâmina em imersão e inicie a contagem naquela região de interesse clicando em *start counting*.

12) Colocar em foco o topo do tecido e clicar em ok, em seguida selecionar a base do tecido e clicar em ok.

13) Caso haja alguma célula para ser marcada, selecionar um *Use Marker* e *clicar sobre a célula*.

14) Uma célula só pode ser marcada, se estiver dentro da região de interesse e dentro do counting frame, sem encostar nas linhas vermelhas do counting frame e em foco.



APÊNDICE E - Protocolo para análise densitométrica para RNAm após hibridização *in situ*

CAPTURA DE IMAGENS EM MICROSCÓPIO DE LUZ

Calibração do Microscópio

- Verificar qual a objetiva mais indicada para a região de estudo que será analisada
- Utilizar filtro neutro número 05
- Utilizar a lente de condensador (dependendo da objetiva e configuração do microscópio)
- Executar o kholler (centralização de luz) e *shading correction* (uniformidade de iluminação)
- Colocar uma lâmina com o material, determinar a intensidade de luz e executar *over exposure* (para verificar que a intensidade de luz não satura o rango dinâmico da câmera)
- Ajuste dos canais de cor:
 - color offset: 0,70
 - resolução: 1388x1040 *standard color*

Não mexer mais nos parâmetros durante a sessão de fotos, o ideal é realizar **todas** as fotos de uma vez. Apenas o pequenos ajustes de **foco** podem ser realizados para captura das imagens.

Captura das imagens do filtro de densidade óptica

- Limpar bem o filtro e o seu suporte antes de utilizá-los – álcool 90%
- Colocar o suporte de vidro e em seguida o filtro. Acertar o foco.
- Capturar as 11 fotos correspondentes a cada faixa de densidade do filtro, do mais claro para o mais escuro e salvá-las de acordo com o nível de cinza correspondente. O campo deve ser completamente limpo em cada imagen, evitando sujeiras e pontos marcados.
- Escala: 0,04 – 0,1- 0,2 – 0,3 – 0,4 – 0,5 – 0,6 – 0,7 – 0,8 – 0,9 – 1,0
- Finalizadas as fotos do filtro de densidade óptica, sem alterar nenhum parâmetro, colocar lâmina com o material desejado e acertar o foco.
- Capturar as fotos de toda a área. Caso necessário capturar mais de uma foto por corte, para posterior montagem do mosaico utilizando ferramenta *photomerge* em *photoshop*.

PREPARO DAS IMAGENS NO ADOBE PHOTOSHOP

- Para realizar o *photomerge* de imagens e configurar uma imagem panorâmica: Arquivo>automatizar>photomerge>selecionar as fotos>ok
Salvar a imagem descartando as camadas.
- Em cada lado, a LHA deve ser delimitada utilizando os mesmos critérios citoarquitetônicos da estereologia, recortada e inserida em uma nova figura, somente com as LHA de ambos lados com fundo branco.
- Nessa etapa, ainda é possível retirar imperfeições e pontos escuros na imagem que possam ser confundidos na análise densitométrica. Ex: sujeira na lâmina, coloração de Nissl mais escura etc. No caso da coloração de Nissl excluir os tons de ciano/azul com a ferramenta *select>color range*.

ANÁLISE DE DENSIDADE ÓPTICA INTEGRADA – IMAGE J

Calibração do Programa:

A) Calibração da densidade óptica

- Abrir as 11 imagens do filtro de densidade óptica e transformá-las imagens de 8bits.
Image>type>8bits>ok
 - Após essa etapa, clicar em Analyze>Set Measurements e selecionar *Area* e *Mean Gray Value*
 - Clicar em cada imagem do filtro e pressionar ctrl+M na ordem crescente de níveis de cinza. Obs: a escala medida deve ser decrescente.
 - Salvar a escala feita em arquivo .txt e fechar as fotos.
 - Clicar em Analyze> calibrate
- Digitar os valores de níveis de cinza correspondentes do filtro para cada densidade óptica.
Ex: 196.68 -----0.04
180.63 -----0.1
- Clicar em Global
Salvar o arquivo na pasta com as fotos do filtro correspondente. Em seguida selecionar a função (*Function*): Cada nome de função gerará um gráfico, sendo que a mais adequada será a que contiver o R² mais próximo de 1.
- Salvar a imagem da função como .JPEG
 - Fechar os arquivos de calibração

B) Calibração das distâncias lineares – fotos da escala micrométrica obtidas no microscópio

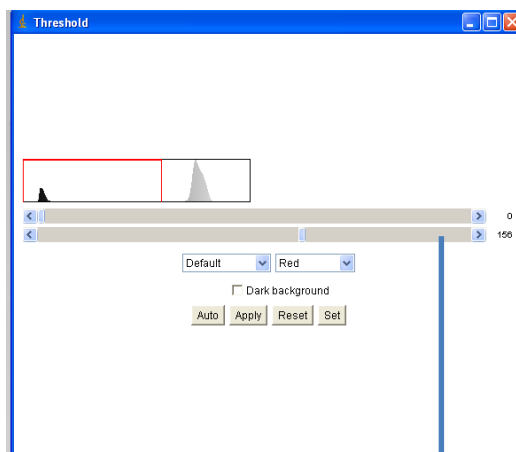
- Abrir a foto da escala micrométrica para objetiva utilizada na captura das imagens.
- Transformá-la em imagens de 8bits
Image>Type>8bits
- Desenhar uma linha reta com a tecla shift pressionada sobre a escala micrométrica na maior distância possível.
- Clicar em *Analyze>Set scale*
 Selecionar o Global
Know distance: (preencher com a distância conhecida da linha desenhada)
Unit: micrometer > ok

OBS: NÃO FECHAR O PROGRAMA IMAGE J NO MEIO DE ALGUM ETAPA, POIS A CALIBRAÇÃO SERÁ PERDIDA. CASO OCORRA, REALIZAR TODAS AS CALIBRAÇÕES NOVAMENTE.

C) Mensuração de Densidade Óptica Integrada

- Abrir a 1ª foto, que já foi preparada no photoshop, para a mensuração.
- Transformá-la em uma imagem de 8bits
- Clicar em *Analyze>Set Measurements*
- Selecionar: *Area, Mean Gray Value, Max, Min, Standard Deviation, Integrated Density, Limit Treshold, Display Label*
 Casas decimais: 4 > ok
- Clicar em Image>Adjust>Treshold

Na barra de controle debaixo, ajustar o *Treshold* de acordo com área marcada a ser mensurada. A área marcada em vermelho é que será medida pelo programa.



Barra de ajuste de Treshold

- Após selecionar a área com o ajuste de treshold, clicar ctrl+m e a mensuração aparecerá em uma nova janela.
- Feche a foto e abra a seguinte, realizando a transformação em imagem de 8bits e realizando a mensuração clicando em ctrl+m
- Faça todas as fotos para cada grupo e salve os resultados para cada um no formato de tabela excel.

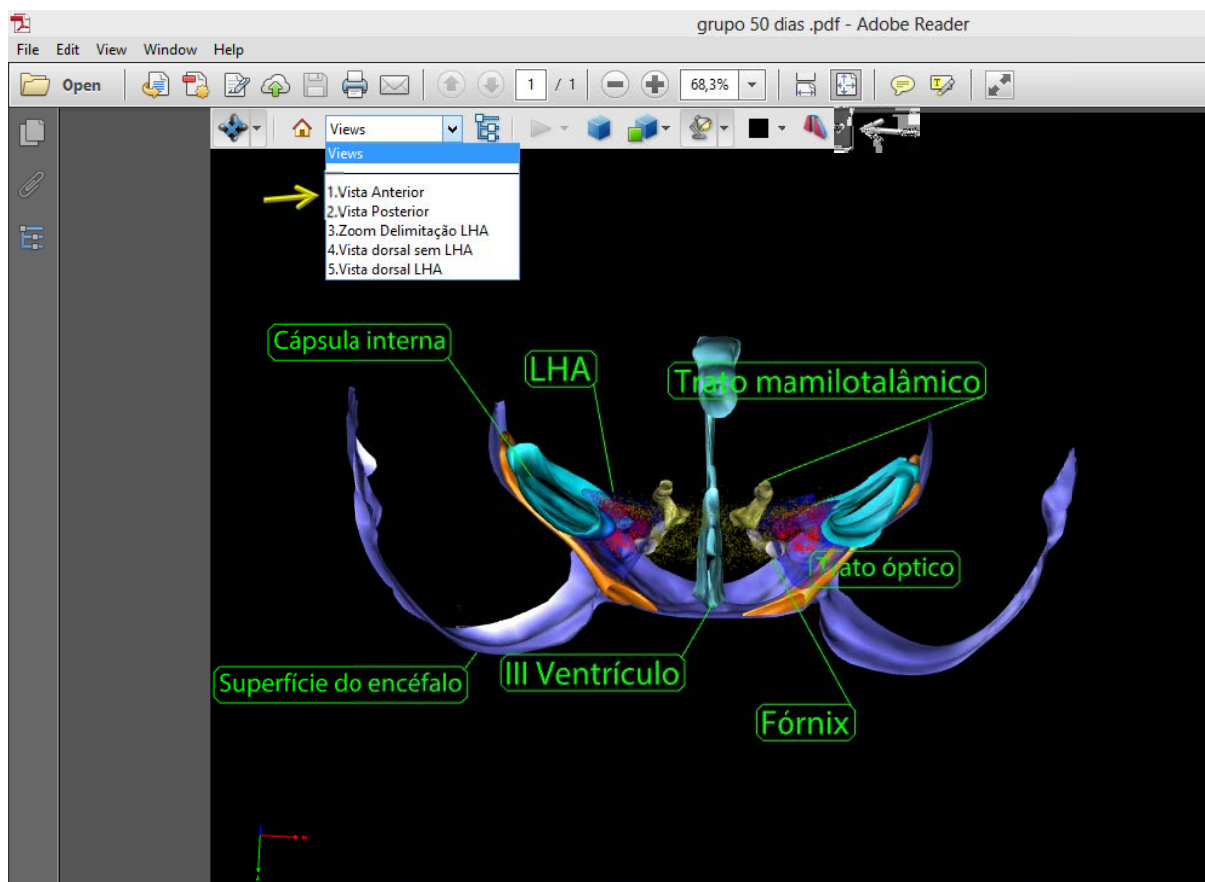
APÊNDICE F - Instruções para manipulação de pdf 3D interativo criado a partir do modelo de reconstrução tridimensional

Clicar no link abaixo para direcionamento:

Link para a pasta intitulada "Dissertação Carla – PDFs Interativos":

https://www.dropbox.com/sh/u4760tawgg7t30b/AAC282t8cGSgboEzD_y0TJEJa?dl=0

- Realizar o download de cada arquivo na pasta
- Abrir o arquivo .pdf (cada arquivo está nomeado de acordo com os grupos experimentais estabelecidos) no programa Adobe Reader® (versão 7 ou superior).
- Clique em cima da imagem do modelo para ativar as ferramentas de manipulação 3D. Caso seja exibida uma mensagem de alerta de segurança, ative os recursos. Este arquivo é confiável e sua integridade foi verificada com programa anti-virus *McAfee Security Center*.
- Após ativação do modelo, passe o *mouse* sobre a imagem para visualização do painel de controle 3D (Veja abaixo na imagem da janela do programa, indicado pela seta branca).
- No menu *pop-up* intitulado "visualizações", clique na cabeça de seta e selecione uma das vistas pré-configuradas para facilitar a exploração do modelo.
Por exemplo: opção 1. *Vista Anterior* (seta amarela).



- Em todas as vistas selecionadas, é possível realizar a movimentação do modelo em qualquer eixo do espaço, movimentando-se o *mouse* com o botão esquerdo pressionado.

- A seguir indicamos a legenda de cada uma das visualizações pré-configuradas:

1. **Vista Anterior:** Representação completa da reconstrução tridimensional do hipotálamo na região da LHA e a citoarquitetura utilizada como referência. Nesta vista, estão identificadas todas as estruturas citoarquitetônicas de referência e os neurônios MCH-ir dentro (esferas vermelhas) e fora da LHA (esferas amarelas).
2. **Vista Posterior:** Visualização da face posterior da reconstrução tridimensional do hipotálamo na região da LHA. Nessa vista, a delimitação da LHA foi retirada para observação da distribuição dos neurônios MCH-ir na LHA e fora dela ao longo do eixo anteroposterior. Destaca-se também o trato mamilotalâmico e o fórnix, estruturas importantes para a delimitação da LHA. Barra de calibração 3D (500 μ m) é válida para o modelo em todas as vistas.
3. **Zoom Delimitação LHA:** Vista que destaca a delimitação da LHA e as estruturas citoarquitetônicas utilizadas para essa delimitação, o fórnix, trato mamilotalâmico e a cápsula interna. Também são identificados os neurônios MCH-ir dentro (MCH – LHA, esferas vermelhas) e fora da LHA (MCH – OUT, esferas amarelas).
4. **Vista Dorsal sem LHA:** Vista dorsal sem a delimitação da LHA com destaque para a distribuição dos neurônios MCH-ir ao longo do eixo anteroposterior. MCH – LHA: esferas vermelhas; MCH – OUT: esferas amarelas.
5. **Vista Dorsal LHA:** Vista dorsal da LHA em maior aumento, cujo limite foi reconstruído em *tessellation* para observação com mais detalhe da organização dos neurônios MCH-ir na LHA (MCH – LHA, esferas vermelhas) e os neurônios MCH-ir nas regiões adjacentes (MCH – OUT, esferas amarelas). Nesta vista, apenas a estrutura do III ventrículo foi mantida como referência.

APÊNDICE G – Análises estatísticas dos resultados

G1: Número de neurônios na LHA total

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Mean	24635	37934	29730	33947	28697	33612	27891
Std. Deviation	5307	5573	6093	5217	5856	4419	6888
Std. Error	2373	2492	2725	2333	2619	1976	3444

One-way analysis of variance

P value	0,0183
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	7
F	3,137
R squared	0,4107

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	593800000	6	98960000
Residual (within columns)	851900000	27	31550000
Total	1446000000	33	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
14 dias vs 28 dias	-13300	5,294	Yes	*
14 dias vs 50 dias	-5095	2,028	No	ns
14 dias vs 90 dias	-9313	3,707	No	ns
14 dias vs 210 dias	-4063	1,617	No	ns
14 dias vs 540 dias	-8978	3,574	No	ns
14 dias vs 750 dias	-3256	1,222	No	ns
28 dias vs 50 dias	8204	3,266	No	ns
28 dias vs 90 dias	3986	1,587	No	ns
28 dias vs 210 dias	9236	3,677	No	ns
28 dias vs 540 dias	4322	1,720	No	ns
28 dias vs 750 dias	10040	3,769	No	ns
50 dias vs 90 dias	-4218	1,679	No	ns
50 dias vs 210 dias	1032	0,4110	No	ns
50 dias vs 540 dias	-3882	1,546	No	ns
50 dias vs 750 dias	1839	0,6903	No	ns
90 dias vs 210 dias	5250	2,090	No	ns
90 dias vs 540 dias	335,2	0,1334	No	ns
90 dias vs 750 dias	6057	2,273	No	ns
210 dias vs 540 dias	-4915	1,957	No	ns
210 dias vs 750 dias	806,9	0,3028	No	ns
540 dias vs 750 dias	5722	2,147	No	ns

G2: Área da LHA Total

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Mean	1,952e+007	2,853e+007	2,768e+007	3,038e+007	3,084e+007	2,989e+007	2,441e+007
Std. Deviation	2,369e+006	2,852e+006	4,034e+006	4,236e+006	5,935e+006	3,396e+006	1,928e+006
Std. Error	1,060e+006	1,275e+006	1,804e+006	1,895e+006	2,654e+006	1,519e+006	963798

One-way analysis of variance

P value 0,0007
 P value summary ***
 Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
 Number of groups 7
 F 5,620
 R squared 0,5553

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	48720000000000	6	8119000000000
Residual (within columns)	39010000000000	27	1445000000000
Total	87720000000000	33	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
14 dias vs 28 dias	-9010000	5,301	Yes	*
14 dias vs 50 dias	-8158000	4,799	Yes	*
14 dias vs 90 dias	-10860000	6,386	Yes	**
14 dias vs 210 dias	-11320000	6,657	Yes	**
14 dias vs 540 dias	-10370000	6,099	Yes	**
14 dias vs 750 dias	-4893000	2,714	No	ns
28 dias vs 50 dias	852500	0,5015	No	ns
28 dias vs 90 dias	-1845000	1,085	No	ns
28 dias vs 210 dias	-2305000	1,356	No	ns
28 dias vs 540 dias	-1357000	0,7986	No	ns
28 dias vs 750 dias	4118000	2,284	No	ns
50 dias vs 90 dias	-2697000	1,587	No	ns
50 dias vs 210 dias	-3158000	1,858	No	ns
50 dias vs 540 dias	-2210000	1,300	No	ns
50 dias vs 750 dias	3265000	1,811	No	ns
90 dias vs 210 dias	-460400	0,2708	No	ns
90 dias vs 540 dias	487300	0,2867	No	ns
90 dias vs 750 dias	5962000	3,307	No	ns
210 dias vs 540 dias	947700	0,5575	No	ns
210 dias vs 750 dias	6423000	3,562	No	ns
540 dias vs 750 dias	5475000	3,037	No	ns

G3: Volume da LHA Total

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Mean	2,928e+009	4,280e+009	4,152e+009	4,556e+009	4,625e+009	4,483e+009	3,662e+009
Std. Deviation	3,554e+008	4,277e+008	6,052e+008	6,355e+008	8,903e+008	5,094e+008	2,891e+008
Std. Error	1,589e+008	1,913e+008	2,706e+008	2,842e+008	3,982e+008	2,278e+008	1,446e+008

One-way analysis of variance

P value 0,0007
 P value summary ***
 Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
 Number of groups 7
 F 5,620
 R squared 0,5553

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1096000000000000000	6	182700000000000000
Residual (within columns)	8777000000000000000	27	325100000000000000
Total	1974000000000000000	33	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
14 dias vs 28 dias	-1352000000	5,301	Yes	*
14 dias vs 50 dias	-1224000000	4,799	Yes	*
14 dias vs 90 dias	-1628000000	6,386	Yes	**
14 dias vs 210 dias	-1697000000	6,657	Yes	**
14 dias vs 540 dias	-1555000000	6,099	Yes	**
14 dias vs 750 dias	-733900000	2,714	No	ns
28 dias vs 50 dias	127900000	0,5015	No	ns
28 dias vs 90 dias	-276700000	1,085	No	ns
28 dias vs 210 dias	-345800000	1,356	No	ns
28 dias vs 540 dias	-203600000	0,7986	No	ns
28 dias vs 750 dias	617700000	2,284	No	ns
50 dias vs 90 dias	-404600000	1,587	No	ns
50 dias vs 210 dias	-473600000	1,858	No	ns
50 dias vs 540 dias	-331500000	1,300	No	ns
50 dias vs 750 dias	489800000	1,811	No	ns
90 dias vs 210 dias	-69060000	0,2708	No	ns
90 dias vs 540 dias	73100000	0,2867	No	ns
90 dias vs 750 dias	894400000	3,307	No	ns
210 dias vs 540 dias	142200000	0,5575	No	ns
210 dias vs 750 dias	963400000	3,562	No	ns
540 dias vs 750 dias	821300000	3,037	No	ns

G4: Densidade Neuronal

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Mean	8418	9025	7148	7628	6301	7634	7098
Std. Deviation	1657	2191	859,8	2030	1284	1665	1650
Std. Error	741,0	979,7	384,5	907,8	574,2	744,7	737,9

One-way analysis of variance

P value	0,2327
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	7
F	1,446
R squared	0,2366

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)	3,562
P value	0,7358
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table

	SS	df	MS
Treatment (between columns)	24230000	6	4039000
Residual (within columns)	78190000	28	2793000
Total	102400000	34	

Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
14 dias vs 28 dias	-607,2	0,8125	No	ns
14 dias vs 50 dias	1270	1,699	No	ns
14 dias vs 90 dias	789,9	1,057	No	ns
14 dias vs 210 dias	2117	2,833	No	ns
14 dias vs 540 dias	783,6	1,049	No	ns
14 dias vs 750 dias	1320	1,766	No	ns
28 dias vs 50 dias	1877	2,512	No	ns
28 dias vs 90 dias	1397	1,870	No	ns
28 dias vs 210 dias	2725	3,646	No	ns
28 dias vs 540 dias	1391	1,861	No	ns
28 dias vs 750 dias	1927	2,579	No	ns
50 dias vs 90 dias	-480,1	0,6424	No	ns
50 dias vs 210 dias	847,4	1,134	No	ns
50 dias vs 540 dias	-486,4	0,6509	No	ns
50 dias vs 750 dias	50,04	0,06696	No	ns
90 dias vs 210 dias	1327	1,776	No	ns
90 dias vs 540 dias	-6,322	0,008460	No	ns
90 dias vs 750 dias	530,1	0,7094	No	ns
210 dias vs 540 dias	-1334	1,785	No	ns
210 dias vs 750 dias	-797,3	1,067	No	ns
540 dias vs 750 dias	536,5	0,7178	No	ns

G5: DOI da LHA total

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Mean	351594	164282	434865	515120	252375	146408	11130
Std. Deviation	288286	64525	141530	212646	53976	70709	3738
Std. Error	128925	28856	63294	95098	24139	31622	1672

One-way analysis of variance

P value	0,0002
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	7
F	6,823
R squared	0,5938

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)	39,67
P value	< 0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table

	SS	df	MS
Treatment (between columns)	938300000000	6	156400000000
Residual (within columns)	641800000000	28	229200000000
Total	1580000000000	34	

Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?
14 dias vs 28 dias	187300	2,767	No
14 dias vs 50 dias	-83270	1,230	No
14 dias vs 90 dias	-163500	2,415	No
14 dias vs 210 dias	99220	1,465	No
14 dias vs 540 dias	205200	3,030	No
14 dias vs 750 dias	340500	5,028	Yes
28 dias vs 50 dias	-270600	3,996	No
28 dias vs 90 dias	-350800	5,182	Yes
28 dias vs 210 dias	-88090	1,301	No
28 dias vs 540 dias	17870	0,2640	No
28 dias vs 750 dias	153200	2,262	No
50 dias vs 90 dias	-80250	1,185	No
50 dias vs 210 dias	182500	2,695	No
50 dias vs 540 dias	288500	4,260	No
50 dias vs 750 dias	423700	6,258	Yes
90 dias vs 210 dias	262700	3,881	No
90 dias vs 540 dias	368700	5,446	Yes
90 dias vs 750 dias	504000	7,444	Yes
210 dias vs 540 dias	106000	1,565	No
210 dias vs 750 dias	241200	3,563	No
540 dias vs 750 dias	135300	1,998	No

G6: Densidade óptica média da LHA Total

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Mean	0,4910	0,2963	0,5897	0,5696	0,4694	0,3671	0,3946
Std. Deviation	0,09911	0,04405	0,03098	0,07180	0,1013	0,05419	0,01165
Std. Error	0,04432	0,01970	0,01385	0,03211	0,04531	0,02424	0,005208

One-way analysis of variance

P value < 0.0001

P value summary ***

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 7

F 12,96

R squared 0,7352

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected) 16,47

P value 0,0114

P value summary *

Do the variances differ signif. (P < 0.05) Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,3467	6	0,05778
Residual (within columns)	0,1249	28	0,004460
Total	0,4715	34	

Tukey's Multiple Comparison Test Mean Diff. q Significant? P < 0.05? Summary

14 dias vs 28 dias	0,1947	6,520	Yes	**
14 dias vs 50 dias	-0,09866	3,303	No	ns
14 dias vs 90 dias	-0,07863	2,633	No	ns
14 dias vs 210 dias	0,02159	0,7230	No	ns
14 dias vs 540 dias	0,1239	4,149	No	ns
14 dias vs 750 dias	0,09641	3,228	No	ns
28 dias vs 50 dias	-0,2934	9,823	Yes	***
28 dias vs 90 dias	-0,2733	9,153	Yes	***
28 dias vs 210 dias	-0,1731	5,797	Yes	**
28 dias vs 540 dias	-0,07081	2,371	No	ns
28 dias vs 750 dias	-0,09830	3,291	No	ns
50 dias vs 90 dias	0,02002	0,6704	No	ns
50 dias vs 210 dias	0,1202	4,026	No	ns
50 dias vs 540 dias	0,2226	7,452	Yes	***
50 dias vs 750 dias	0,1951	6,532	Yes	**
90 dias vs 210 dias	0,1002	3,356	No	ns
90 dias vs 540 dias	0,2025	6,782	Yes	***
90 dias vs 750 dias	0,1750	5,861	Yes	**
210 dias vs 540 dias	0,1023	3,426	No	ns
210 dias vs 750 dias	0,07482	2,505	No	ns
540 dias vs 750 dias	-0,02749	0,9205	No	ns

G7: Área Marcada na LHA Total

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Mean	685934	564443	744949	937278	539140	411040	32031
Std. Deviation	523297	167195	215557	475446	148234	212138	9850
Std. Error	234026	74772	96400	212626	66292	94871	4405

One-way analysis of variance

P value	0,0026
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	7
F	4,491
R squared	0,4904

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)	32,35
P value	< 0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table

	SS	df	MS
Treatment (between columns)	2469000000000	6	411500000000
Residual (within columns)	2566000000000	28	916300000000
Total	5035000000000	34	

Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
14 dias vs 28 dias	121500	0,8975	No	ns
14 dias vs 50 dias	-59020	0,4360	No	ns
14 dias vs 90 dias	-251300	1,857	No	ns
14 dias vs 210 dias	146800	1,084	No	ns
14 dias vs 540 dias	274900	2,031	No	ns
14 dias vs 750 dias	653900	4,830	Yes	*
28 dias vs 50 dias	-180500	1,333	No	ns
28 dias vs 90 dias	-372800	2,754	No	ns
28 dias vs 210 dias	253000	1,869	No	ns
28 dias vs 540 dias	153400	1,133	No	ns
28 dias vs 750 dias	532400	3,933	No	ns
50 dias vs 90 dias	-192300	1,421	No	ns
50 dias vs 210 dias	205800	1,520	No	ns
50 dias vs 540 dias	333900	2,467	No	ns
50 dias vs 750 dias	712900	5,266	Yes	*
90 dias vs 210 dias	398100	2,941	No	ns
90 dias vs 540 dias	526200	3,887	No	ns
90 dias vs 750 dias	905200	6,687	Yes	**
210 dias vs 540 dias	128100	0,9463	No	ns
210 dias vs 750 dias	507100	3,746	No	ns
540 dias vs 750 dias	379000	2,800	No	ns

G8: DOI da LHAM

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Mean	31540	8092	34119	38260	31214	24895	1924
Std. Deviation	33946	5582	17427	20229	22226	21719	934,6
Std. Error	15181	2496	7793	9047	9940	9713	418,0

One-way analysis of variance

P value	0,0575
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	7
F	2,354
R squared	0,3353

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)	27,95
P value	< 0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	5776000000	6	962700000
Residual (within columns)	11450000000	28	409000000
Total	17230000000	34	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
14 dias vs 28 dias	23450	2,593	No	ns
14 dias vs 50 dias	-2579	0,2852	No	ns
14 dias vs 90 dias	-6720	0,7430	No	ns
14 dias vs 210 dias	326,5	0,03610	No	ns
14 dias vs 540 dias	6646	0,7348	No	ns
14 dias vs 750 dias	29620	3,275	No	ns
28 dias vs 50 dias	-26030	2,878	No	ns
28 dias vs 90 dias	-30170	3,336	No	ns
28 dias vs 210 dias	-23120	2,557	No	ns
28 dias vs 540 dias	-16800	1,858	No	ns
28 dias vs 750 dias	6168	0,6819	No	ns
50 dias vs 90 dias	-4141	0,4578	No	ns
50 dias vs 210 dias	2905	0,3213	No	ns
50 dias vs 540 dias	9225	1,020	No	ns
50 dias vs 750 dias	32200	3,560	No	ns
90 dias vs 210 dias	7046	0,7791	No	ns
90 dias vs 540 dias	13370	1,478	No	ns
90 dias vs 750 dias	36340	4,018	No	ns
210 dias vs 540 dias	6319	0,6987	No	ns
210 dias vs 750 dias	29290	3,238	No	ns
540 dias vs 750 dias	22970	2,540	No	ns

G9: DOI da LHAt

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Mean	295552	137195	351374	396602	190348	99022	6758
Std. Deviation	228805	57713	124953	159175	52578	50815	2370
Std. Error	102325	25810	55881	71185	23514	22725	1060

One-way analysis of variance

P value	0,0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	7
F	6,946
R squared	0,5981

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)	39,54
P value	< 0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	607100000000	6	101200000000
Residual (within columns)	407900000000	28	145700000000
Total	1015000000000	34	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
14 dias vs 28 dias	158400	2,934	No	ns
14 dias vs 50 dias	-55820	1,034	No	ns
14 dias vs 90 dias	-101000	1,872	No	ns
14 dias vs 210 dias	105200	1,949	No	ns
14 dias vs 540 dias	196500	3,641	No	ns
14 dias vs 750 dias	288800	5,350	Yes	*
28 dias vs 50 dias	-214200	3,968	No	ns
28 dias vs 90 dias	-259400	4,806	Yes	*
28 dias vs 210 dias	-531500	9,847	No	ns
28 dias vs 540 dias	381700	7,072	No	ns
28 dias vs 750 dias	130400	2,416	No	ns
50 dias vs 90 dias	-452300	8,379	No	ns
50 dias vs 210 dias	161000	2,983	No	ns
50 dias vs 540 dias	252400	4,675	Yes	*
50 dias vs 750 dias	344600	6,384	Yes	**
90 dias vs 210 dias	206300	3,821	No	ns
90 dias vs 540 dias	297600	5,513	Yes	**
90 dias vs 750 dias	389800	7,222	Yes	***
210 dias vs 540 dias	91330	1,692	No	ns
210 dias vs 750 dias	183600	3,401	No	ns
540 dias vs 750 dias	92260	1,709	No	ns

G10: DOI da LHAa

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Minimum	5573	6571	32944	30735	17454	5502	828,4
Median	8620	18627	55121	64068	29876	9234	2472
Maximum	76914	32680	67851	172944	34917	66131	3988

Kruskal-Wallis test

P value 0,0010

Exact or approximate P value? Gaussian Approximation

P value summary **

Do the medians vary signif. (P < 0.05) Yes

Number of groups 7

Kruskal-Wallis statistic 22,38

Dunn's Multiple Comparison Test Difference in rank sum Significant? P < 0.05? Summary

14 dias vs 28 dias 0,6000 No ns

14 dias vs 50 dias -11,40 No ns

14 dias vs 90 dias -14,00 No ns

14 dias vs 210 dias -5,000 No ns

14 dias vs 540 dias 0,4000 No ns

14 dias vs 750 dias 12,60 No ns

28 dias vs 50 dias -12,00 No ns

28 dias vs 90 dias -14,60 No ns

28 dias vs 210 dias -5,600 No ns

28 dias vs 540 dias -0,2000 No ns

28 dias vs 750 dias 12,00 No ns

50 dias vs 90 dias -2,600 No ns

50 dias vs 210 dias 6,400 No ns

50 dias vs 540 dias 11,80 No ns

50 dias vs 750 dias 24,00 Yes **

90 dias vs 210 dias 9,000 No ns

90 dias vs 540 dias 14,40 No ns

90 dias vs 750 dias 26,60 Yes ***

210 dias vs 540 dias 5,400 No ns

210 dias vs 750 dias 17,60 No ns

540 dias vs 750 dias 12,20 No ns

G11: Densidade óptica média da LHAm

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Mean	0,4539	0,3079	0,6085	0,5081	0,4597	0,3829	0,3662
Std. Deviation	0,1497	0,06648	0,06764	0,08684	0,1090	0,05428	0,05097
Std. Error	0,06697	0,02973	0,03025	0,03884	0,04877	0,02427	0,02279

One-way analysis of variance

P value	0,0003
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	7
F	6,184
R squared	0,5699

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)	7,148
P value	0,3074
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,2989	6	0,04982
Residual (within columns)	0,2256	28	0,008057
Total	0,5245	34	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
14 dias vs 28 dias	0,1460	3,637	No	ns
14 dias vs 50 dias	-0,1547	3,853	No	ns
14 dias vs 90 dias	-0,05419	1,350	No	ns
14 dias vs 210 dias	-0,005846	0,1456	No	ns
14 dias vs 540 dias	0,07103	1,769	No	ns
14 dias vs 750 dias	0,08772	2,185	No	ns
28 dias vs 50 dias	-0,3007	7,490	Yes	***
28 dias vs 90 dias	-0,2002	4,987	Yes	*
28 dias vs 210 dias	-0,1518	3,783	No	ns
28 dias vs 540 dias	-0,07497	1,868	No	ns
28 dias vs 750 dias	-0,05828	1,452	No	ns
50 dias vs 90 dias	0,1005	2,503	No	ns
50 dias vs 210 dias	0,1488	3,707	No	ns
50 dias vs 540 dias	0,2257	5,622	Yes	**
50 dias vs 750 dias	0,2424	6,038	Yes	**
90 dias vs 210 dias	0,04834	1,204	No	ns
90 dias vs 540 dias	0,1252	3,119	No	ns
90 dias vs 750 dias	0,1419	3,535	No	ns
210 dias vs 540 dias	0,07687	1,915	No	ns
210 dias vs 750 dias	0,09357	2,331	No	ns
540 dias vs 750 dias	0,01669	0,4159	No	ns

G12: Densidade óptica média da LHAt

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Mean	0,4944	0,2813	0,5607	0,5822	0,4596	0,3566	0,3978
Std. Deviation	0,1039	0,05601	0,05954	0,07537	0,08644	0,05158	0,01429
Std. Error	0,04645	0,02505	0,02663	0,03371	0,03866	0,02307	0,006391

One-way analysis of variance

P value	< 0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	7
F	12,48
R squared	0,7279

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)	11,07
P value	0,0862
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table

	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,3583	6	0,05972
Residual (within columns)	0,1339	28	0,004784
Total	0,4923	34	

Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
14 dias vs 28 dias	0,2131	6,889	Yes	***
14 dias vs 50 dias	-0,06628	2,143	No	ns
14 dias vs 90 dias	-0,08780	2,838	No	ns
14 dias vs 210 dias	0,03478	1,124	No	ns
14 dias vs 540 dias	0,1378	4,456	No	ns
14 dias vs 750 dias	0,09664	3,124	No	ns
28 dias vs 50 dias	-0,2794	9,032	Yes	***
28 dias vs 90 dias	-0,3009	9,728	Yes	***
28 dias vs 210 dias	-0,1783	5,765	Yes	**
28 dias vs 540 dias	-0,07526	2,433	No	ns
28 dias vs 750 dias	-0,1165	3,765	No	ns
50 dias vs 90 dias	-0,02152	0,6957	No	ns
50 dias vs 210 dias	0,1011	3,267	No	ns
50 dias vs 540 dias	0,2041	6,599	Yes	**
50 dias vs 750 dias	0,1629	5,267	Yes	*
90 dias vs 210 dias	0,1226	3,963	No	ns
90 dias vs 540 dias	0,2256	7,295	Yes	***
90 dias vs 750 dias	0,1844	5,963	Yes	**
210 dias vs 540 dias	0,1031	3,332	No	ns
210 dias vs 750 dias	0,06186	2,000	No	ns
540 dias vs 750 dias	-0,04120	1,332	No	ns

G13: Densidade óptica média da LHAa

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Minimum	0,3929	0,1814	0,5347	0,4177	0,3571	0,2941	0,3326
Median	0,4352	0,3131	0,6199	0,6314	0,4053	0,3447	0,4229
Maximum	0,6549	0,3691	0,6710	0,7096	0,6325	0,5015	0,5099

Kruskal-Wallis test

P value 0,0014

Exact or approximate P value? Gaussian Approximation

P value summary **

Do the medians vary signif. (P < 0.05) Yes

Number of groups 7

Kruskal-Wallis statistic 21,62

Dunn's Multiple Comparison Test Difference in rank sum Significant? P < 0.05? Summary

14 dias vs 28 dias	15,20	No	ns
14 dias vs 50 dias	-7,200	No	ns
14 dias vs 90 dias	-7,000	No	ns
14 dias vs 210 dias	2,200	No	ns
14 dias vs 540 dias	12,20	No	ns
14 dias vs 750 dias	5,600	No	ns
28 dias vs 50 dias	-22,40	Yes	*
28 dias vs 90 dias	-22,20	Yes	*
28 dias vs 210 dias	-13,00	No	ns
28 dias vs 540 dias	-3,000	No	ns
28 dias vs 750 dias	-9,600	No	ns
50 dias vs 90 dias	0,2000	No	ns
50 dias vs 210 dias	9,400	No	ns
50 dias vs 540 dias	19,40	No	ns
50 dias vs 750 dias	12,80	No	ns
90 dias vs 210 dias	9,200	No	ns
90 dias vs 540 dias	19,20	No	ns
90 dias vs 750 dias	12,60	No	ns
210 dias vs 540 dias	10,00	No	ns
210 dias vs 750 dias	3,400	No	ns
540 dias vs 750 dias	-6,600	No	ns

G14: Área marcada na LHAM

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Minimum	17652	13798	17275	27291	19430	9049	1669
Median	26405	24857	57453	69736	89692	55295	5992
Maximum	112014	63456	81258	175559	147464	169814	9652

Kruskal-Wallis test

P value 0,0166
 Exact or approximate P value? Gaussian Approximation
 P value summary *
 Do the medians vary signif. (P < 0.05) Yes
 Number of groups 7
 Kruskal-Wallis statistic 15,51

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
14 dias vs 28 dias	5,400	No	ns
14 dias vs 50 dias	-0,4000	No	ns
14 dias vs 90 dias	-5,200	No	ns
14 dias vs 210 dias	-4,200	No	ns
14 dias vs 540 dias	-0,8000	No	ns
14 dias vs 750 dias	16,40	No	ns
28 dias vs 50 dias	-5,800	No	ns
28 dias vs 90 dias	-10,60	No	ns
28 dias vs 210 dias	-9,600	No	ns
28 dias vs 540 dias	-6,200	No	ns
28 dias vs 750 dias	11,00	No	ns
50 dias vs 90 dias	-4,800	No	ns
50 dias vs 210 dias	-3,800	No	ns
50 dias vs 540 dias	-0,4000	No	ns
50 dias vs 750 dias	16,80	No	ns
90 dias vs 210 dias	1,000	No	ns
90 dias vs 540 dias	4,400	No	ns
90 dias vs 750 dias	21,60	Yes	*
210 dias vs 540 dias	3,400	No	ns
210 dias vs 750 dias	20,60	Yes	*
540 dias vs 750 dias	17,20	No	ns

G15: Área marcada na LHAt

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Minimum	125047	247400	312674	313086	218117	75562	9927
Median	407190	472205	673838	602776	424793	292036	22363
Maximum	1,075e+006	630628	778174	1,267e+006	479861	411292	24884

Kruskal-Wallis test

P value 0,0035
 Exact or approximate P value? Gaussian Approximation
 P value summary **
 Do the medians vary signif. (P < 0.05) Yes
 Number of groups 7
 Kruskal-Wallis statistic 19,42

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
14 dias vs 28 dias	-1,000	No	ns
14 dias vs 50 dias	-5,600	No	ns
14 dias vs 90 dias	-6,200	No	ns
14 dias vs 210 dias	2,800	No	ns
14 dias vs 540 dias	8,200	No	ns
14 dias vs 750 dias	17,20	No	ns
28 dias vs 50 dias	-4,600	No	ns
28 dias vs 90 dias	-5,200	No	ns
28 dias vs 210 dias	3,800	No	ns
28 dias vs 540 dias	9,200	No	ns
28 dias vs 750 dias	18,20	No	ns
50 dias vs 90 dias	-0,6000	No	ns
50 dias vs 210 dias	8,400	No	ns
50 dias vs 540 dias	13,80	No	ns
50 dias vs 750 dias	22,80	Yes	**
90 dias vs 210 dias	9,000	No	ns
90 dias vs 540 dias	14,40	No	ns
90 dias vs 750 dias	23,40	Yes	**
210 dias vs 540 dias	5,400	No	ns
210 dias vs 750 dias	14,40	No	ns
540 dias vs 750 dias	9,000	No	ns

G16: Área marcada na LHAa

	14 dias	28 dias	50 dias	90 dias	210 dias	540 dias	750 dias
Minimum	11620	36444	48288	55707	54148	18046	1639
Median	20140	57326	82556	109833	55558	21704	5070
Maximum	93354	120852	109267	321931	77054	198646	13115

Kruskal-Wallis test

P value 0,0060

Exact or approximate P value? Gaussian Approximation

P value summary **

Do the medians vary signif. (P < 0.05) Yes

Number of groups 7

Kruskal-Wallis statistic 18,11

Dunn's Multiple Comparison Test Difference in rank sum Significant? P < 0.05? Summary

14 dias vs 28 dias	-5,400	No	ns
14 dias vs 50 dias	-7,800	No	ns
14 dias vs 90 dias	-14,40	No	ns
14 dias vs 210 dias	-5,400	No	ns
14 dias vs 540 dias	-2,200	No	ns
14 dias vs 750 dias	11,40	No	ns
28 dias vs 50 dias	-2,400	No	ns
28 dias vs 90 dias	-9,000	No	ns
28 dias vs 210 dias	0,0000	No	ns
28 dias vs 540 dias	3,200	No	ns
28 dias vs 750 dias	16,80	No	ns
50 dias vs 90 dias	-6,600	No	ns
50 dias vs 210 dias	2,400	No	ns
50 dias vs 540 dias	5,600	No	ns
50 dias vs 750 dias	19,20	No	ns
90 dias vs 210 dias	9,000	No	ns
90 dias vs 540 dias	12,20	No	ns
90 dias vs 750 dias	25,80	Yes	**
210 dias vs 540 dias	3,200	No	ns
210 dias vs 750 dias	16,80	No	ns
540 dias vs 750 dias	13,60	No	ns