



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

NATÁLIA BORGES NAKAMURA

Função da leptina no controle ventilatório:

Efeito central da leptina ou do antagonista do receptor melanocortina na
resposta cardiovascular e na resposta ventilatória do CO₂

Araraquara

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Função da leptina no controle ventilatório:

Efeito central da leptina ou do antagonista do receptor melanocortina na resposta cardiovascular e na resposta ventilatória do CO₂

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” – UNESP, para obtenção do
título de Farmacêutico-Bioquímico.

Aluno: Natália Borges Nakamura

Orientador: Prof. Dr. Eduardo
Colombari

Co-orientadora: Dra. Mirian Bassi

Araraquara

2014

Agradecimentos

Em especial à Deus que sempre ilumina meus caminhos e guia as minhas escolhas.

Ao Professor Eduardo Colombari por ter acreditado em mim e me concedido a oportunidade de ser sua aluna de iniciação científica.

À pós-doutoranda Mirian Bassi, por ter me ensinado tudo sobre esse mundo tão complexo. Sem você, minha caminhada teria sido mais árdua e sem tantos frutos como os que obtivemos no período que trabalhamos juntas. Nem sempre foi fácil, mas agradeço de coração por ter me orientado tão bem, e por ter feito por mim o que gostaria que tivessem feito para você. Muito obrigada pela dedicação.

Aos demais professores e também a todos os alunos de iniciação e pós-graduação do departamento de fisiologia que me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desse projeto.

Ao meu pai e minhas queridas tias Irene e Teresa pelo apoio que sempre me deram durante minha empreitada pela ciência. Me receberam com abraços carinhosos quando voltei para casa com lágrimas nos olhos por

experimentos frustrados, mas também festejaram comigo cada conquista que tive.

À todos os meus amigos, em especial à Fernanda Oliveira e a Michele Favero por terem me apoiado e me motivado durante a condução desse projeto.

Índice

Agradecimentos	2
1. Resumo	5
2. Lista de Figuras	7
3. Lista de Abreviaturas	8
4. Introdução	9
5. Objetivo	11
6. Material e Métodos	12
6.1. Animais	12
6.2. Procedimentos cirúrgicos	12
6.2.1. Implante de cânula guia no ventrículo lateral	12
6.2.2. Canulação da artéria femoral	13
6.3. Drogas utilizadas	13
6.4. Injeções cerebrais	14
6.5. Medidas de ingestão de água e de alimento	14
6.6. Medidas e determinações bioquímicas na urina	15
6.7. Registro da pressão arterial média e da frequência cardíaca	15
6.8. Medidas de ventilação pulmonar	15
6.9. Medidas de taxa metabólica	16
6.10. Histologia	17
6.11. Análise estatística	17
7. Protocolo experimental	19
8. Resultados	20
9. Discussão	27
10. Conclusão	32
11. Referências Bibliográficas	33
12. Trabalhos desenvolvidos durante a Iniciação Científica	42
13. Anexos	43
14. Folha de Assinaturas	72

1. Resumo

A leptina é um hormônio protéico produzido por adipócitos que atua no sistema nervoso central (SNC) modulando as respostas metabólicas e cardiorrespiratórias. Estudos prévios demonstraram que a leptina ativa receptores do sistema melanocortina (MC3/4R) para modular a ingestão de alimentos e a atividade simpática, no entanto a função dos MC3/4R no controle ventilatório ainda não foi completamente elucidada. Dessa forma, o objetivo do estudo foi de avaliar a função do sistema melanocortina e da leptina sobre as respostas cardiovasculares, metabólicas e ventilatórias.

Foram utilizados ratos Holtzman (n=6/grupo) implantados com cânula guia no ventrículo lateral (VL) para a administração de leptina (5 µg/3 µl/dia), de SHU9119, antagonista MC3/4R (0,6 nmol/3 µl/dia) ou do tratamento combinado (SHU+LEP) durante sete dias consecutivos. Após o sexta dia de tratamento, foram analisadas a resposta ventilatória (VE) durante a ativação do quimiorreflexo por hipercapnia (7% CO₂) pelo método de pletismografia e o índice metabólico pela análise do consumo de O₂ e da produção de CO₂ pelo método de calorimetria indireta. A pressão arterial media (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram avaliadas no sétimo dia de tratamento por meio de catéter intravenoso.

A leptina injetada no VL reduziu a ingestão alimentar (~70%) e o peso corporal (~17%), promoveu um aumento no volume corrente (12±0.4 ml.kg⁻¹,

vs. salina: $9 \pm 0.9 \text{ ml.kg}^{-1}$), na fR ($172 \pm 8 \text{ ciclos.min}^{-1}$ vs. salina: $146 \pm 5 \text{ ciclos.min}^{-1}$) e na resposta ventilatória ao CO_2 ($2119 \pm 90 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, vs. saline: $1378 \pm 91 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$) ($p < 0,05$). Também aumentou a PAM ($130 \pm 2 \text{ mmHg}$ vs. salina: $106 \pm 6 \text{ mmHg}$) e a FC ($409 \pm 11 \text{ bpm}$ vs. salina: $369 \pm 24 \text{ bpm}$). Já o bloqueio do MC4R promoveu efeitos opostos na ingestão alimentar e no peso corporal (aumento de $\sim 27\%$ e $\sim 13\%$, respectivamente) e atenuou a VE- CO_2 ($997 \pm 67 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ vs. salina: $1378 \pm 91 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$). O tratamentos SHU+LEP ou apenas SHU demonstraram efeito semelhantes com relação a ingestão alimentar e o peso corporal, e bloqueou o efeito estimulatório da leptina sobre a VE- CO_2 ($1391 \pm 137 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ vs. leptina: $2119 \pm 90 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$). Com relação a PAM e FC, não foram observadas alterações significativas. Assim, podemos sugerir que o sistema melanocortina modula a ação estimulatória da leptina sobre a resposta ventilatória ao CO_2 .

2.Lista de Figuras

- Figura 1: Efeito do tratamento i.c.v. crônico (7 dias) de leptina ou do antagonista dos receptores MC3/4 (SHU9119) na ingestão alimentar. Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β). $P < 0,05$ e $n = 6$ /grupo. 21
- Figura 2: Efeito do tratamento i.c.v. crônico (7 dias) de leptina ou do antagonista dos receptores MC3/4 (SHU9119) na ingestão de água. Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β). $P < 0,05$ e $n = 6$ /grupo. 22
- Figura 3: Efeito do tratamento i.c.v. crônico (7 dias) de leptina ou do antagonista dos receptores MC3/4 (SHU9119) no volume urinário (UV mL). Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β). $P < 0,05$ e $n = 6$ /grupo... 23
- Figura 4: Efeito do tratamento i.c.v. crônico (7 dias) de leptina ou do antagonista dos receptores MC3/4 (SHU9119) na excreção de íon sódio e potássio. Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β). $P < 0,05$ e $n = 6$ /grupo. 24
- Figura 5: Resposta ventilatória a hipercapnia após tratamento I.C.V crônico 7d de leptina, SHU9119 ou do tratamento combinado sobre a ventilação pulmonar (VE), volume corrente (Vc) e frequência respiratória (Fr). Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β). $P < 0,05$ e $n = 6$ /grupo. 26
- Figura 6: Efeito do tratamento ICV cronico (sete dias) de leptina, SHU9119 ou do tratamento conjugado de SHU+LEP sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β). 27
- Figura 7: Fotomicrografia da localização da cânula no VL 27

3. Lista de Abreviaturas

SNC	sistema nervoso central
MC3/4R	Receptores propiomelanocorticotrópico
VL	Ventrículo lateral
SHU9119	antagonista dos receptores melanocorticotrópico 3 e 4
LEP	leptina
VE	ventilação
PAM	pressão arterial média
FC	frequência cardíaca
icv	intracerebroventricular
fR	frequência respiratória
POMC	neurônio propiomelanocorticotrópico
α-MSH	neurônios alfa melanocito estimulante
NPY	neuro peptídeo hipotalâmico
AgRP	agouti yellow mice
QR	coeficiente respiratório
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo

4.Introdução

A leptina é um hormônio protéico produzido pelo tecido adiposo em proporção ao grau de gordura (Hall et al., 2010). Esse hormônio atravessa a barreira hematoencefálica e atua no sistema nervoso central (SNC) via ativação de receptores hipotalâmicos propiomelanocorticotrópicos (POMC). Quando ativados, os neurônios POMC promovem a liberação do hormônio alfa-melanócito-estimulante (α -MSH) que por sua vez ativa os receptores melanocorticotrópicos (MC3/4) responsáveis em parte pelo aumento da atividade simpática e da pressão arterial. No SNC, a leptina também exerce um efeito inibitório sobre o neuropeptídeo hipotalâmico (NPY) e sobre a proteína Agouti (AgRP), promovendo uma diminuição do apetite e do peso corporal (Hall, 2010, Elmquist et al., 2005).

Os receptores melanocortina são encontrados em várias áreas do encéfalo porém, estão concentrados principalmente nos neurônios hipotalâmicos, onde a leptina exerce grande parte de sua ação sobre a ingestão alimentar e controle do gasto energético (Wirth et al., 2001). Outros estudos demonstraram que a microinjeção do agonista dos receptores melanocortina II (MTII) no núcleo paraventricular do hipotálamo promove o aumento da atividade simpática renal e da pressão arterial média (PAM) (Li et al., 2013) e, por outro lado, diminuiu a ingestão alimentar (Balthasar et al., 2005). Sabe-se também que a administração crônica de leptina diretamente no ventrículo lateral promove um aumento na PAM e da frequência cardíaca (FC) e tais efeitos podem ser atenuados pelo tratamento com o antagonista SHU9119 (da Silva et al., 2004).

Estudos prévios demonstraram que a leptina também participa da modulação do controle respiratório (Tankerley et al., 1996, O'Donnell et al., 2000). Camundongos transgênicos deficientes em leptina (*ob/ob*) desenvolvem obesidade e depressão da resposta ventilatória quando estimulados com dióxido de carbono (CO_2) no ar inspirado (O'Donnell, et al., 1999, 2000). O tratamento periférico com leptina é capaz de reverter a obesidade e otimizar a resposta ventilatória ao CO_2 sugerindo um importante papel da leptina sobre os mecanismos de controle quimiossensível da ventilação (O'Donnell et al., 1999). Potencialmente, o sistema melanocortina pode modular os efeitos da leptina sobre a resposta ventilatória uma vez que animais *knockout* para receptores MC3/4 têm resposta ventilatória diminuída ao CO_2 principalmente durante o sono (Polotsky et al., 2004). No entanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos pelos quais a leptina modula a resposta ventilatória.

Levando em consideração a importância dos receptores MC3/4 na mediação das ações da leptina no hipotálamo, nós hipotetizamos que o sistema melanocortina também pode estar envolvido na ativação do quimioreflexo ventilatório, cuja resposta é exacerbada pela leptina. Para testar esta hipótese do envolvimento dos MC3/4R para que a leptina exerça seus efeitos estimulatórios sobre a resposta ventilatória à hipercanina (CO_2), nós estudamos os efeitos da leptina sobre a ventilação após a inibição crônica dos MC3/4R pelo uso de um antagonista farmacológico.

5.Objetivo

Avaliar a ação da leptina e do sistema melanocortina (MC3/4R) na região hipotalâmica sobre as respostas cardiovasculares e respiratórias em condições de normóxia e durante a ativação do quimiorreflexo pela hipercapnia.

6. Material e Métodos

6.1. Animais

Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da FOAR/UNESP (processo nº. 04/2010).

Foram utilizados ratos Holtzman, adultos, com peso na faixa de 270 e 350 gramas fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, campus de Araraquara. Os animais foram mantidos com água de torneira e ração granulada (Purina) *ad libitum* em gaiolas individuais.

6.2 Procedimentos cirúrgicos

6.2.1. Implante de cânula guia no ventrículo lateral

Os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotático (modelo Kopf 900). Foi feita uma incisão longitudinal de modo que as suturas bregma e lambda ficassem expostas para que fosse possível tomá-las como referência para o nivelamento da cabeça do animal. Com o auxílio de uma broca esférica foi realizada a trepanação da calota craniana para posicionamento da cânula de aço inoxidável 0,4 mm antero-posteriormente ao bregma, 1,6 mm lateralmente a linha mediana e 4,0 mm abaixo da superfície do osso. Tais parâmetros foram estabelecidos de acordo com o parâmetros estereotáticos do Atlas Franklin & Paxinos (2004). A cânula

foi fixada com o auxílio de parafusos e resina acrílica. Ao término da cirurgia, foram administradas uma dose intramuscular profilática (0,1 mL/animal) de Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda) e de anti-inflamatório (cetoprofeno 1%, 0,1 mL/rato, subcutaneamente).

6.2.2 Canulação da artéria femoral

Para a obtenção dos valores de PAM e FC, foi realizada outra cirurgia, após seis dias de tratamento, para implante de cânula de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) na artéria femoral. Para isso, os animais foram novamente anestesiados com a mistura de quetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal), então foi realizada uma pequena incisão próxima a região femoral de modo a dar acesso aos vasos sanguíneos desejados. A artéria femoral foi isolada da veia e do nervo, teve seu fluxo sanguíneo estancado e recebeu um pequeno pique com uma tesoura para instalação do cateter. Após este procedimento, o cateter foi exteriorizado na região escapular do animal, para posterior registro das variáveis cardiovasculares, utilizando-se para tal, transdutor de pressão (P-100, WPI), acoplado ao sistema de registro Power Lab (ADInstruments).

6.3. Drogas utilizadas

- Leptina (National Hormone & Peptide Program, Harbor-UCLA, Torrance, CA, USA; dissolvido em tampão fosfato salina PBS, pH 7.4) nas doses de 3 µg ou 5 µg /3 µl /dia.

- SHU9119, antagonista dos receptores MC3/4R (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA, USA; dissolvido em salina estéril, pH 7.4) nas doses de 0,6 nmol ou 1 nmol /3 μ l/ dia.

As doses foram baseadas em trabalhos anteriores que mostraram os efeitos da leptina e do SHU9119 no SNC (Choi et al., 2003, Fendt et al, 2009, Inyushkin et al., 2010; Mark et al., 2009).

6.4. Injeções cerebrais

As microinjeções foram realizadas diariamente entre as 11:00-12:00 durante sete dias. Os animais foram retirados da gaiola e receberam a dose do tratamento no VL com o auxílio de uma seringa Hamilton (5 μ l) conectada a um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora (0,3 mm diâmetro e 12 mm de comprimento).

6.5. Medidas de ingestão de água e de alimento

As medidas de ingestão de água foram feitas com o auxílio de uma bureta de plástico graduada em 0,1mL. Antes do reabastecimento diário de ração do animal, era medido a quantidade remanescente de comida do dia anterior e, então, era completado uma massa conhecida e fixa de ração, para que posteriormente, fosse possível a efetuação do cálculo pela subtração da massa de ração.

6.6. Medidas e determinações bioquímicas na urina

As amostras de urina foram coletadas por gravidade em tubos graduados. Elas foram posteriormente analisadas por um analisador de Na^+/K^+ (NOVA 1, Nova Biomedical). A excreção total de Na^+ e K^+ foi calculada como concentração de Na^+ e K^+ multiplicado pelo volume urinário, coletado a partir de gaiolas metabólicas.

6.7. Registro da pressão arterial média e da frequência cardíaca

Para fins de registro dos valores de PAM e FC a cânula foi conectada a um transdutor de pressão (Stathan Instruments Mod. P23Db) acoplado a um pré-amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier) e ao sistema de registro computadorizado PowerLab (modelo PowerLab 8SP ADInstruments) de 8 canais.

6.8. Medidas de ventilação pulmonar

As medidas de ventilação pulmonar foram obtidas pelo método de pletismografia de corpo inteiro adaptado para pequenos animais (Malan, 1973). Dessa forma, o animal foi colocado em uma câmara semi-aberta de acrílico rígido que permitia que ele se movimentasse livremente. Após aclimação de cerca de 40min, a câmara foi completamente vedada, impedindo qualquer troca de gases. Primeiramente foi feita uma calibração com o auxílio de uma seringa de 1ml, e então os movimentos respiratórios do animal foram registrados por aproximadamente 1 minuto.

Os sinais gerados no interior da câmara rígida são ocasionados pela diferença de temperatura entre o gás inspirado (25°C) e o gás expirado (37°C) pelo animal. Essas pequenas oscilações báticas foram captadas por um espirômetro (ADInstruments Mod. ML-141), permitindo o registro de duas variáveis respiratórias, a frequência respiratória (fR) e o volume corrente (VC), sendo a última variável calculada pela seguinte fórmula:

$$V_T = V_K \cdot \frac{(\Delta P)_T}{(\Delta P)_K} \cdot \frac{T_a}{T_a'} \cdot \frac{P_B - P_{a_{H_2O}}}{(P_B - P_{a_{H_2O}}) - T_a/T_L (P_B - P_{L_{H_2O}})}$$

$$\dot{V} \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1} = V_T \text{ mL.kg}^{-1} \times f_R \text{ min}^{-1}$$

Onde:

V_T : volume corrente

V_K : volume da calibração

$(\Delta P)_T$: registro da ventilação

$(\Delta P)_K$: registro da calibração

T_a' : temperatura do interior da câmara

T_L : temperatura pulmonar

P_B : pressão barométrica

$P_{a_{H_2O}}$: pressão de vapor d'água

$P_{L_{H_2O}}$: pressão de vapor d'água no pulmão

T_a : temperatura ambiente

6.9. Medidas de taxa metabólica

Consumo de oxigênio (VO_2), produção de dióxido de carbono (VCO_2), e quociente respiratório ($QR = VCO_2/VO_2$) foram calculados pelo método da calorimetria indireta. Após 7 dias de microinjeções diárias, os animais foram

aclimatizados à temperatura ambiente (25 °C) dentro de uma câmara de pletismografia (5L) por aproximadamente 30 minutos. A câmara foi conectada a um analisador gasométrico (modelo ML206, ADInstruments) para que fossem registradas as variações de O₂ e CO₂ durante aproximadamente um minuto.

6.10 Histologia

Ao término dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg). Foi realizada uma microinjeção de corante Azul de Evans (1 µl) e realizada a perfusão através do ventrículo cardíaco esquerdo com paraformaldeído (4% em 0,1 M de fosfato, pH 7.4). Os encéfalos foram retirados e guardados nesse fixador por 24 horas a 4°C. Na sequência, foram congelados e cortados em um micrótomo na espessura de 50 µm. Os cortes cerebrais foram montados em sequência rostro-caudal em lâminas gelatinizadas permanecendo em temperatura ambiente por 24hs para a secagem e posteriormente corados pelo método cresil violeta e desidratados com álcool e xilol. Após a secagem das lâminas, foram analisados os locais das microinjeções em um microscópio e foram realizadas fotos da região.

6.11. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico PRISMA versão 5.0. Os dados foram tabelados e representados em gráficos como Média ± Erro Padrão da Média. Foi realizada a análise de variância (ANOVA)

one-way ou two-way quando aplicável seguido de pós-teste Bonferroni's. O índice de significância foi fixado em $p < 0,05$.

7. Protocolo experimental

Os animais foram submetidos à cirurgia de implante da cânula no VL. Após sete dias de recuperação, foi feito um teste para avaliar se a cânula fora devidamente implantada no VL, para isso, foi injetado um volume de 1µl de solução de angiotensina, que de acordo com a literatura, causa resposta dipsogênica na região hipotalâmica. Os animais que tiveram resposta adequada foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas. Foi permitido um período de adaptação de 4 dias, e então os animais foram divididos em grupos que receberam leptina, SHU ou salina nas doses descritas nos procedimentos. Durante todo o período de tratamento, foram feitas medidas diárias da ingestão de ração e água, e também foram recolhidas amostras de urina para posteriores dosagens iônicas de sódio e potássio.

No sexto dia de tratamento, foi feita uma medida das variáveis respiratórias em condições de normoxia e hipercapnia (7% CO₂). Após as medidas ventilatórias, os animais foram transferidos para outra câmara pletismográfica que estava conectada a um analisador de gases para que as medidas das variáveis metabólicas fossem realizadas.

Em seguida, os animais foram submetidos à cirurgia para implante da cânula na artéria femoral. No dia seguinte à cirurgia, foram feitas medidas simultâneas das variáveis respiratórias e dos parâmetros cardíacos novamente nas duas condições: normóxia e hipercapnia. Durante todo o período de experimento foi mensurada a ingestão alimentar e o peso corporal dos animais.

8.Resultados

Com relação a ingestão alimentar e ao peso corporal, o tratamento i.c.v. com leptina causou redução de 70% e 17%, respectivamente e, quando comparado ao grupo controle, observou-se um pequeno aumento na taxa metabólica. Por outro lado, o tratamento com seu antagonista, SHU 9119, promoveu aumento de aproximadamente 27% na ingestão alimentar e de aproximadamente de 13% no ganho de massa corporal, e comparativamente ao grupo tratado com leptina, houve um aumento na taxa metabólica. O grupo que recebeu tratamento combinado de SHU+LEP demonstraram valores semelhantes aos dos obtidos pelo tratamento apenas com SHU (figura 1). Os dados de ingestão de água mostraram uma diferença significativa entre o grupo de animais que recebeu a leptina como tratamento quando comparado aos animais que receberam os demais tratamentos (figura 2).

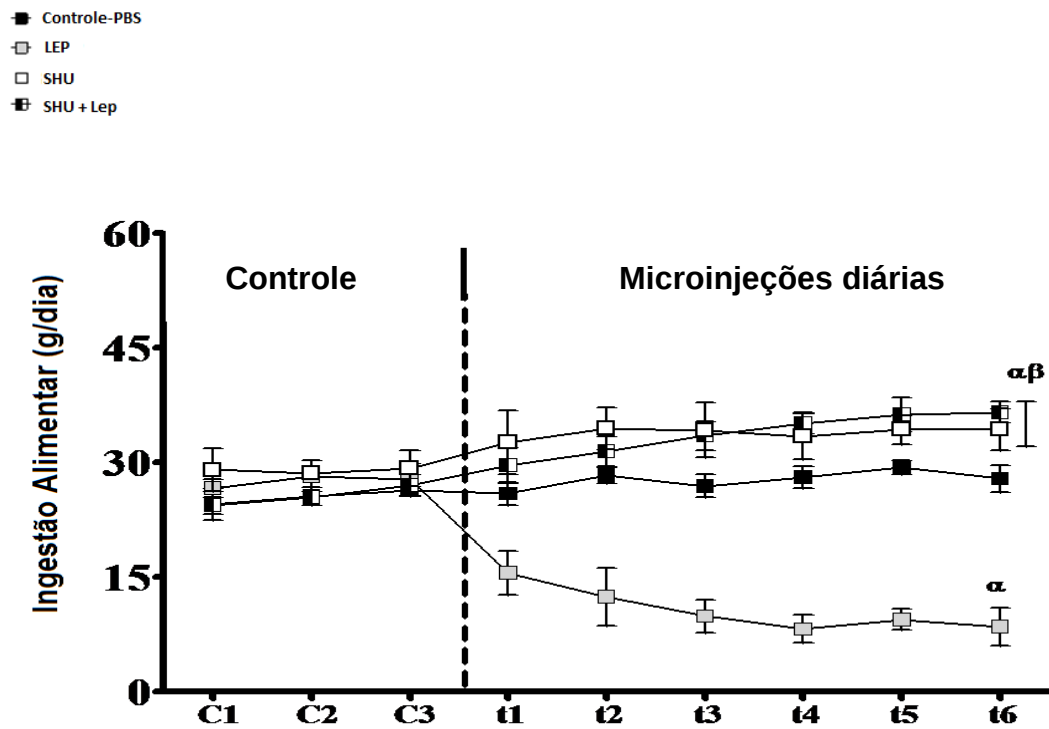


Figura 1: Efeito do tratamento i.c.v. crônico (7 dias) de leptina ou do antagonista dos receptores MC3/4 (SHU9119) na ingestão alimentar. Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β). $P < 0,05$ e $n = 6/\text{grupo}$.

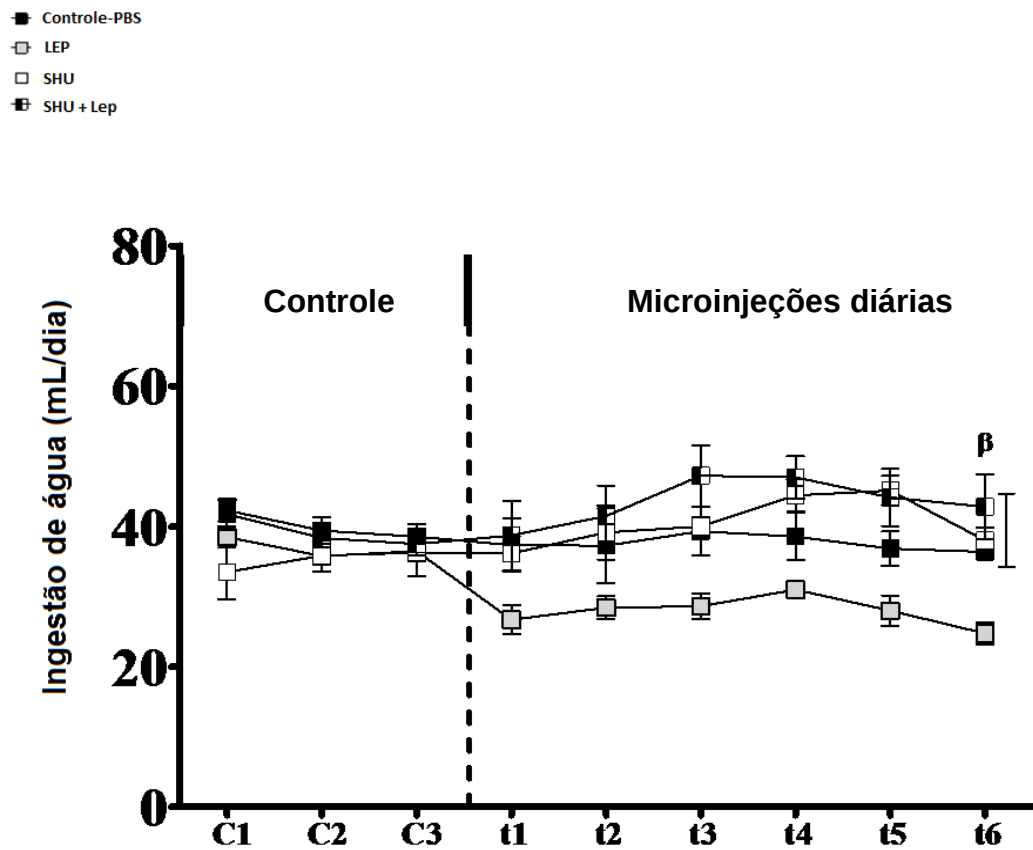


Figura 2: Efeito do tratamento i.c.v. crônico (7 dias) de leptina ou do antagonista dos receptores MC3/4 (SHU9119) na ingestão de água. Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β). $P < 0,05$ e $n = 6/\text{grupo}$.

Quando se analisa a quantidade de urina e também dos íons nela contida tem-se um valor mais elevado de volume urinário para os animais que foram tratados com SHU e SHU+LEP quando compara-se com os valores do período controle. O grupo tratado com LEP apresentou valores significativamente menores àqueles obtidos com o seu antagonista. (figura 3)

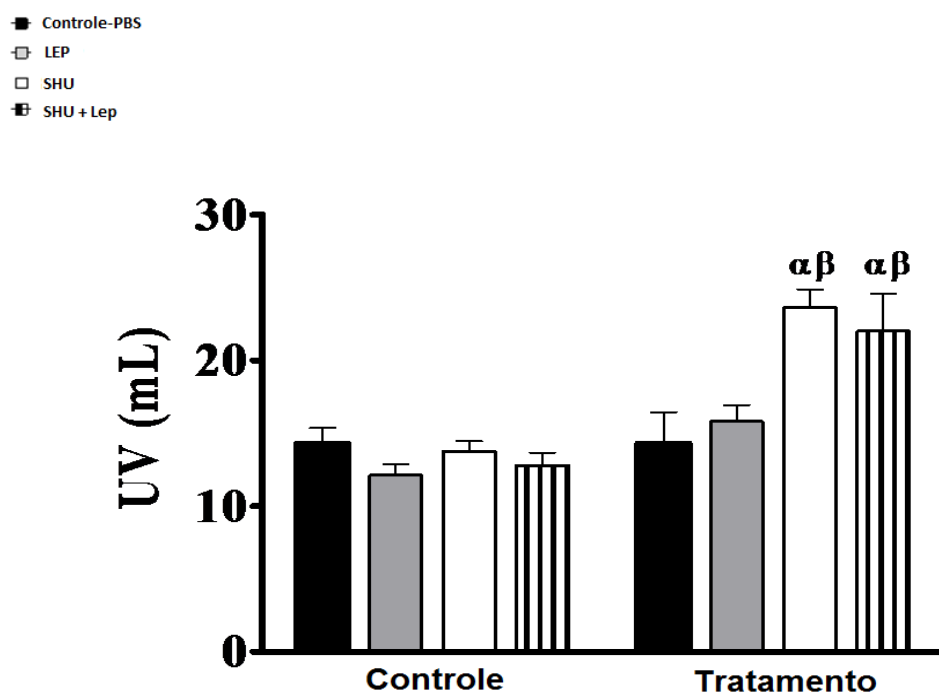


Figura 3: Efeito do tratamento i.c.v. crônico (7 dias) de leptina ou do antagonista dos receptores MC3/4 (SHU9119) no volume urinário (UV mL). Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β). $P < 0,05$ e $n = 6/\text{grupo}$.

Os resultados demonstraram uma diminuição significativa de íons sódio e potássio quando comparado ao controle, por outro lado, os grupos tratados com SHU e SHU+LEP apresentaram aumento quando comparados ao grupo que recebeu leptina. (Figura 4)

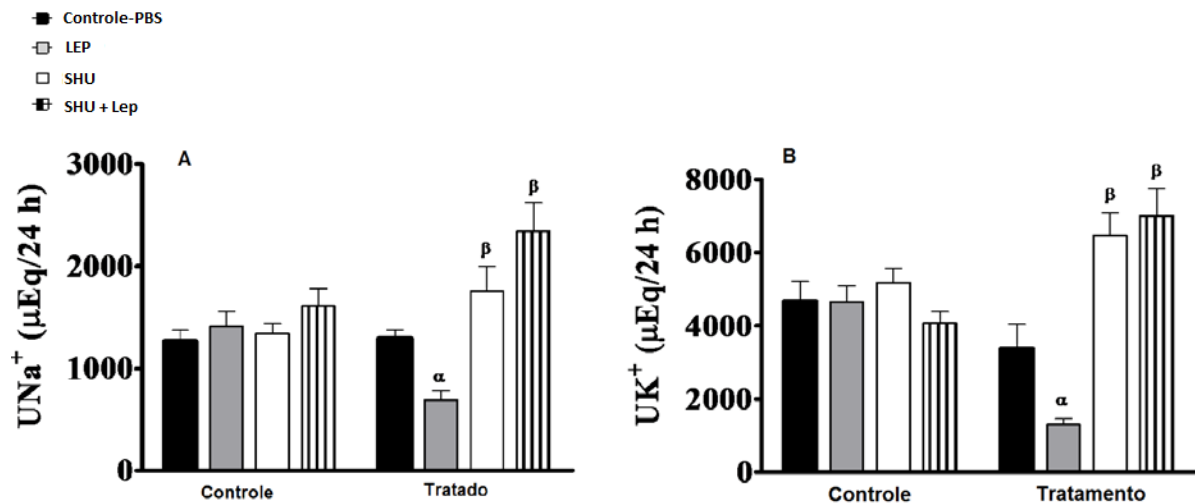


Figura 4: Efeito do tratamento i.c.v. crônico (7 dias) de leptina ou do antagonista dos receptores MC3/4 (SHU9119) na excreção de íon sódio e potássio. Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β). $P < 0,05$ e $n = 6$ /grupo.

	PBS	LEP	SHU	SHU + LEP
VCO ₂ (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	12.9 ± 1	10.9 ± 0.7	12.7 ± 0.5	11.3 ± 0.5
VO ₂ (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	15.1 ± 1	15.1 ± 0.6	13.8 ± 0.6	13.7 ± 0.3
RQ (VCO ₂ /VO ₂)	0.86 ± 0.04	0.73 ± 0.02 α	0.92 ± 0.01 β	0.83 ± 0.04 β
Temperatura Retal (°C)	36.7 ± 0.2	36.8 ± 0.2	36.6 ± 0.2	36.7 ± 0.1
Peso Corporal(g)	342 ± 8	286 ± 9 α	375 ± 7 $\alpha\beta$	386 ± 12 $\alpha\beta$

Tabela 1: Parâmetros metabólicos mensurados após a administração i.c.v. de leptina, SHU ou o tratamento combinado (SHU+LEP) durante 7 dias. Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β). $P < 0,05$ e $n = 6$ /grupo.

O tratamento com leptina promoveu um aumento ($P<0,05$) na resposta ventilatória durante a ativação do quimiorreflexo com 7% de CO_2 ($2119\pm90 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, vs. salina: $1379\pm91 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) devido ao aumento do V_c ($11\pm0,4 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$, vs. salina: $8,9\pm0,9 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$) e fR ($172\pm8 \text{ ciclos}\cdot\text{min}^{-1}$, vs. salina: $146\pm5 \text{ ciclos}\cdot\text{min}^{-1}$) (Figura 5). Já o bloqueio dos receptores MC3/4, demonstrou resposta atenuada durante a hipercapnia ($997\pm67 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ vs. salina: $1378\pm91 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$), pois o estímulo quimiorreflexo causou diminuição do V_c ($6,8\pm0,5 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ vs. salina: $8,9\pm0,9 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$). O tratamento conjugado resultou em valores semelhantes aos obtidos com o bloqueio dos receptores melanocorticotrópicos, e bloqueou o efeito estimulatório da leptina na VE- CO_2 ($1391\pm137 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ vs. leptina: $2119\pm90 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) devido ao menor V_c ($9,5\pm1 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ vs. leptina: $12\pm0,4 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$) e fR ($147\pm5 \text{ ciclos}\cdot\text{min}^{-1}$ vs. leptina: $172\pm8 \text{ ciclos}\cdot\text{min}^{-1}$).

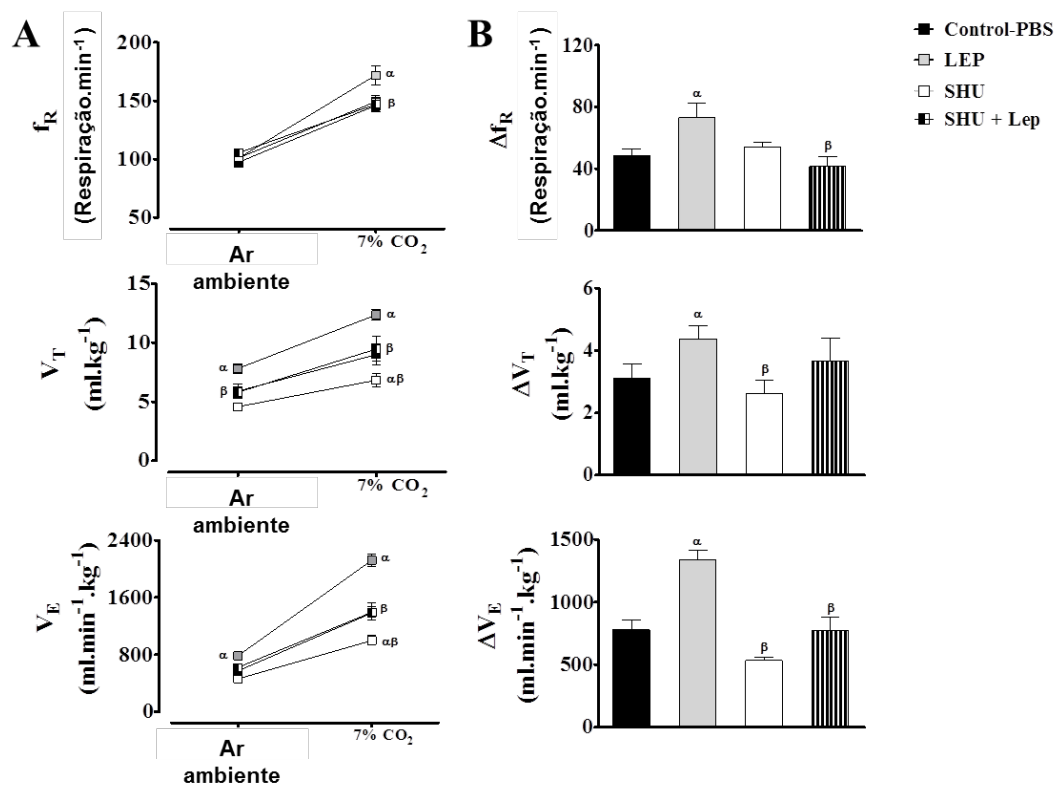


Figura 5: Resposta ventilatória a hipercapnia após tratamento I.C.V crônico 7d de leptina, SHU9119 ou do tratamento combinado sobre a ventilação pulmonar (VE), volume corrente (Vc) e frequência respiratória (Fr). Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β). P<0,05 e n= 6/grupo.

Os valores de PAM (130 ± 2 mmHg vs salina: 106 ± 2 mmHg, P<0,05) e na FC (409 ± 10 mmHg vs. salina: 369 ± 20 mmHg) sofreram um aumento significativo com o tratamento de Leptina (figura 6). Os outros tratamentos não alteraram os parâmetros pressóricos dos animais.

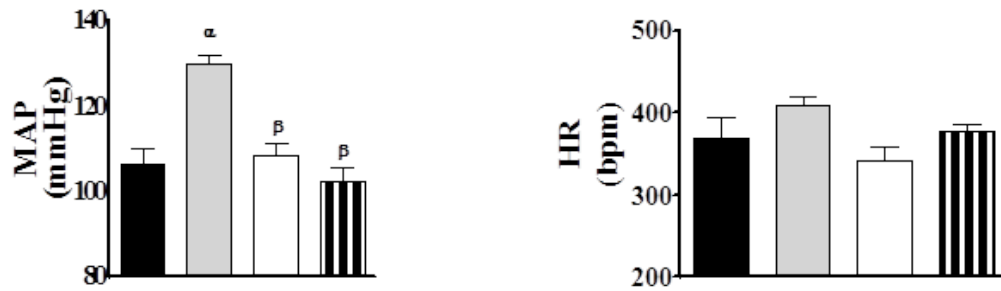


Figura 6: Efeito do tratamento ICV crônico (sete dias) de leptina, SHU9119 ou do tratamento conjugado de SHU+LEP sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Os símbolos significam diferença do grupo salina (α) e diferença do grupo leptina (β).

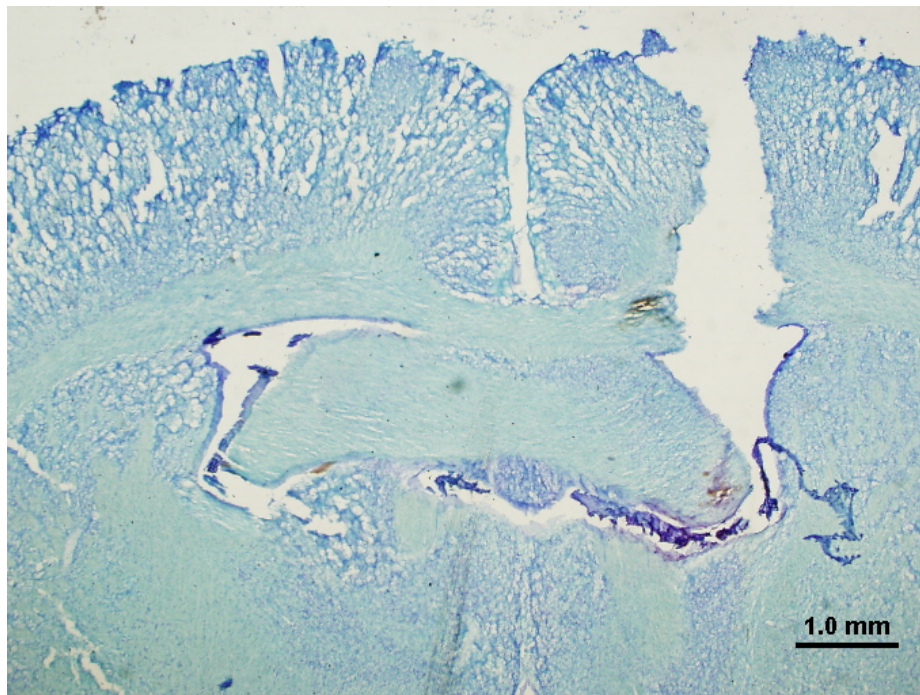


Figura 7: Fotomicrografia da localização da cânula no VL

9. Discussão

Sabe-se que o sistema melanocortina atua em áreas hipotalâmicas mediando a ação da leptina no controle metabólico e cardiovascular (atividade simpática) (Mark *et al.*, 2010, Rahmouni *et al.*, 2007). Estudos anteriores

concluíram que a leptina é um bom estimulador da resposta ventilatória aparentemente pela sua ação no tronco encefálico em específico nas áreas responsáveis pelo controle respiratório, como o núcleo do trato solitário e o núcleo retrotrapezóide (Bassi et al., 2012 e 2013, Inyushkina et al., 2010, Ciriello et al., 2012). Os resultados obtidos demonstram pela primeira vez que esse sistema também pode modular o controle ventilatório pela ativação hipotalâmica.

As vias hipotalâmicas podem mediar as respostas ventilatórias em condições especiais como, por exemplo, estresse, fuga, medo entre outras (Kuwaki & Zang 2012). Além disso, existem vias do hipotálamo que se projetam para diversos núcleos respiratórios que estão localizados no tronco encefálico e são responsáveis pelo controle quimiossensível da ventilação pulmonar (Fortuna et al., 2009, Song et al., 2012).

Respostas ventilatórias a qualquer estímulo, como por exemplo, a hipercapnia e a hipóxia, são resultados de uma atividade exacerbada de outras vias que não apenas aquelas neuronais responsáveis pela geração e manutenção da respiração basal. Anteriormente, foi demonstrado que estímulos gasosos bem como os elétricos no nervo do seio carotídeo pode ativar a região hipotalâmica caudal (Cross, 1963, Thomas, 1972). Além disso, um núcleo hipotalâmico rostral pode também mediar as respostas ventilatória se estimularmos eletricamente o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), e dessa forma promover um aumento na ventilação (Duan et al., 1997, Yeh, 1997). Com isso, podemos sugerir que a leptina ativa os MC3/4R em núcleos hipotalâmicos que estão associadas ao controle respiratório.

Levando em consideração o envolvimento de centros hipotalâmicos e o papel da leptina no controle ventilatório, foi especulado um potencial mecanismo para a modulação da ventilação pela via hipotalâmica. Ao serem ativados pela leptina, os neurônios propriomelanocorticotrópicos presentes no núcleo arqueado, estimulam a síntese e expressão de receptores MC3/4 no hipotálamo lateral. (Elias et al., 1998 e 1999, Leininger et. al, 2009, da Silva et al., 2004) o que possivelmente medeia a secreção de orexina, substância importante na mediação da resposta ventilatória à hipercapnia (Dias et al., 2009, Willians, 2007).

Também é possível que a leptina exerça suas ações ventilatórias por outro mecanismo que seria possivelmente a ativação da região perifornical (PeF), pois é sabido que há uma quantidade razoável de receptores para a leptina (Hakansson et al., 1999, Laque et al., 2013) e, além disso, outros estudos apontaram como essa sendo a área que regula o ciclo respiratório durante o sono, estresse e exercícios (Dimicco et al. 2002; McDowall et al. 2007, Li et al., 2013). Os resultados deste estudo confirmam que a leptina tem um importante efeito modulador na resposta ventilatória quimiossensível e acrescenta que o sistema melanocortina no SNC pode mediar essa ação.

Os resultados relacionados a pressão arterial reforçam o possível envolvimento dos receptores MC3/4R na modulação dos efeitos da leptina na função cardiovascular. Ficou demonstrado que a leptina no VL promove aumento na PA o qual foi bloqueado após o tratamento combinado de SHU 9119. Curiosamente, por outro lado, ao contrário do que era esperado, o tratamento apenas com o antagonista não causou a redução dos valores de pressão arterial, e demonstrou dados semelhantes aos que foram obtidos com

o grupo controle. Uma possível explicação para esse fenômeno seria que uma única microinjeção diária de antagonista não produziria tanto efeito quanto o observado em estudos nos quais foram utilizadas micro bombas de infusão osmótica (da Silva et al., 2009). Por essa mesma razão, podemos dizer que a leptina não causou alterações significativas com relação a frequência cardíaca. Entretanto, é importante ressaltar que a dose utilizada nesse estudo foi o suficiente para causar efeitos tão significativos e claros na ingestão alimentar e V_E .

Como era esperado, após o tratamento diário com leptina ocorreu uma queda na quantidade de ração ingerida pelo animal o que levou, consequentemente, a sua redução de massa, porém sem causar mudanças significativas na excreção de sódio e urina. Os mesmos resultados foram obtidos por estudos anteriores, nos quais após administração crônica de leptina parece estar relacionada com o seu papel no desenvolvimento de uma possível hipertensão (Bettowisk et al., 2005).

Com relação a taxa metabólica, estudos prévios demonstraram que a leptina causa uma queda no QR em camundongos transgênicos knockout para o gene ob (Hogberg et al., 2005). Os resultados sugerem que a diminuição do QR está relacionada com a queda de VCO_2 , o que pode ser justificado pela baixa ingestão alimentar e consequentemente, redução de substâncias oxidativas que irão produzir menos CO_2 .

Levando-se em conta todas as considerações feitas até agora, pode-se dizer que o estudo demonstrou dois pontos muito importantes e inéditos. Primeiro que a administração crônica de leptina no VL promove um aumento na

ventilação basal e também à resposta quimiorespiratória central, sugerindo dessa forma que leptina possivelmente contribui para o controle ventilatório na região hipotalâmica. Segundo, seria que o efeito estimulatório da leptina na ventilação foi completamente abolido quando os receptores MC3/4 estavam bloqueados, sugerindo dessa forma que o sistema melanocortina modula os efeitos da leptina na ventilação.

10. Conclusão

Os resultados do presente estudo demonstraram que a leptina tem efeito estimulador sobre a resposta ventilatória ao CO₂ e sobre a pressão arterial média e sugere que o sistema melanocortina (receptores MC3/4) modula esses efeitos.

11. Referências Bibliográficas

1. **Bassi M**, **Giusti H**, **Leite CM**, **Anselmo-Franci JA**, **do Carmo JM**, da **Silva AA**, **Hall JE**, **Colombari E**, **Glass ML**. Central leptin replacement enhances chemorespiratory responses in leptin-deficient mice independent of changes in body weight. *Pflügers Archiv Europ. J. Physiology* 464:145-153, 2012.

2. **Balthasar N**, TD Louise, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang C, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist LK, Lowell B. 2005. Cell, Vol. 123, 493–505, November 4. Divergence of Melanocortin Pathways in the Control of Food Intake and Energy Expenditure. *Cell*, vol 123, 493-505.

3. **Breslow MJ**, Min-Lee K, Brown DR, Chacko VP, Palmer D, and Berkowitz DE. Effect of leptin deficiency on metabolic rate in *ob/ob* mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: E443–E449, 1999.

4. **Carlyle M**, Jones OB, Kuo JJ, Hall JE. 2002. Chronic cardiovascular and renal actions of leptin: role of adrenergic activity. *Hypertension* 39:496 –501.

5. **Choi Y**, Li CL, Page K, Westby A, Della-Fera MA, Lin J, Hartzell DL, Baile CA. Melanocortin receptors mediate leptin effects on feeding and body

weight but not adipose apoptosis. *Physiology & Behavior* 79, 795 – 801. 2003.

6-Cross, B.A., Silver, I.A., 1963. Unit activity in the hypothalamus and the sympathetic response to hypoxia and hypercapnia. *Exp. Neurol.* 7, 375 – 393.

7-Dias MB, Li A, Nattie EE. 2009. Antagonism of orexin receptor-1 in the retrotrapezoid nucleus inhibits the ventilatory response to hypercapnia predominantly in wakefulness. *J Physiol* 587.9, pp 2059–2067.

8-DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV. 2002. The dorso-medial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 469 – 480.

9-do Carmo JM, da Silva AA, Cai Z, Lin S, Dubinon JH, Hall JE. 2011. Receptors in Proopiomelanocortin Neurons Control of Blood Pressure, Appetite, and Glucose by Leptin in Mice Lacking Leptin. *Hypertension*; 57:918-926.

10-Duan, Y.F., Winters, R., McCabe, P.M., Green, E.J., Huang, Y., Schneiderman, N., 1996. Behavioral characteristics of defence and vigilance reactions elicited by electrical stimulation of the hypothalamus in rabbits. *Behav. Brain. Res.* 81, 33 – 41

11-Dubinon JH, da Silva AA, Hall JE. 2010. Enhanced blood pressure and appetite responses to chronic central melanocortin-3/4 receptor blockade in dietary-induced obesity. *Hypertens.* 28(7): 1466–1470. doi:10.1097/HJH.0b013e328339f20e.

12-Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, Elmquist JK. Chemical characterization of leptin activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 423(2):261-281, 2000.

13-Fortuna MG, Stornetta RL, West GH, Guyenet PG. Activation of the retrotrapezoid nucleus by posterior hypothalamic stimulation. *J Physiol* 587.21 (2009) pp 5121–5138 5121.

14-Franklin KBJ & Paxinos G. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, 2004.

15-Fendt M, Burki H, Imobersteg S, Lingenhohl K, McAllister KH, Orain D, Uzunov DP, Chaperon F. Fear-reducing effects of intra-amygdala neuropeptide Y infusion in animal models of conditioned fear: an NPY Y1 receptor independent effect. *Psychopharmacology*. 206(2):291-301, 2009.

16-Guo, M., Lu, Y., Garza, J.C., Li, Y., Chua, S.C., Zhang, W., Lu, B., Lu, X.Y. 2012. Forebrain glutamatergic neurons mediate leptin action on depression-like behaviors and synaptic depression. *Transl Psychiatry* 2, e83.

17-Hall JE, Alexandre A. da Silva, Jussara M. do Carmo, John Dubinion, Shereen Hamza, Shankar Munusamy, Grant Smith, and David E. Stec. Obesity-induced Hypertension: Role of Sympathetic Nervous System, Leptin, and Melanocortins. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 17271–17276, 2010.

18-Håkansson M, de Lecea L, Sutcliffe JG, Yanagisawa M, Meister B. 1999. Leptin receptor- and STAT3-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurones of the lateral hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* Aug;11(8):653-63.

19-Haynes WG, Morgan DA, Djalali A, Sivitz WI & Mark AL (1999). Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic. *Hypertension* 33, 542–547.

20-Helena Hogberg H, Engblom L, Ekdahl A, Lidell V, Walum E, Alberts P. 2006. Temperature Dependence of O₂ Consumption; Opposite Effects of Leptin and Etomoxir on Respiratory Quotient in Mice. *OBESITY* Vol. 14 No. 4. 673-682.

21-Inyushkina EM, Merkulova NA, Inyushkin AN. Mechanisms of the Respiratory Activity of Leptin at the Level of the Solitary Tract Nucleus. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 40:7, 707-713, 2010.

22-Kuwaki T, Zhang WV. Orexin neurons and emotional stress. *Vitam Horm.* 89:135-58. 2012.

Kc P, Haxhiu MA, Trouth CO, Balan KV, Anderson WA, Mack SO. 2002. CO₂-induced c-Fos expression in hypothalamic vasopressin containing neurons. *Respiration Physiology* 129:289 – 296.

23-Laque A, Zhang Y, Gettys S, Nguyen T, Bui K, Morrison CD, Heike M. 2012. Leptin receptor neurons in the mouse hypothalamus are colocalized with the neuropeptide galanin and mediate anorexigenic leptin action. 2012. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* Published 1 May 2013 Vol. 304 no. E999-E1011 DOI: 10.1152/ajpendo.00643.2012

24-Leininger GM, Jo Y, Leshan RL, Louis GW, Yang H, Barrera JG, Wilson H., Opland DM, Faouzi1 MA, Gong Y, Jones JC, Rhodes CJ, Chua Jr. S, Diano S, Horvath TL., Seeley RJ, Becker JB, Münzberg H, Myers Jr MG. 2009. Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the

mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab.* 10(2): 89–98.
doi:10.1016/j.cmet.2009.06.011.

25-Li P, Cui B, Zhang L, Sun H, Liu T, Zhu G. 2013. Melanocortin 3/4 receptors in paraventricular nucleus modulate sympathetic outflow and blood pressure. *Exp Physiol* 98.2 pp 435-443.

26-Li N, Li A, Nattie E. Focal microdialysis of CO₂ in the perifornical – hypothalamic area increases ventilation during wakefulness but not NREM sleep 2013. *Respir Physiol Neurobiol.* 185(2):3 49 –55.

27-Malan A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respir Physiol* 17: 32-44, 1973.

28-McDowall LM, Horiuchi J, Dampney RAL. 2007. Effects of disinhibition of neurons in the dorsomedial hypothalamus on central respiratory drive. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1728–R1735.

29-Mark AL, Agassandian K, Morgan DA, Liu X, Cassell MD & Rahmouni K. Leptin signaling in the nucleus tractus solitarius increases sympathetic nerve activity to the kidney. *Hypertension*, 53[part 2]:375-380, 2009.

30-O'Donnell CP, Schaub CD, Haines AS, Berkowitz DE, Tankersley C, Schwartz AR, and Smith PL. Leptin prevents respiratory depression in obesity. *Am J Resp Crit Care Med* 159: 1477–1484, 1998.

31-O'Donnell CP, Tankersley CG, Polotsky VY, Schwartz AR, and Smith PL. Leptin, obesity, and respiratory function. *Respir Physiol* 119:163–170, 2000.

32-Polotsky, V.Y., Smaldone, M.C., Scharf, M.T., Li, J., Tankersley, C.G., Smith,

P.L., Schwartz, A.R., O'Donnell, C.P. 2004. Impact of interrupted leptin pathways on ventilatory control. *J Appl Physiol* 96, 991-998.

33-Polotsky VY, Marc C. Smaldone, Matthew T. Scharf, Jianguo Li, Clarke G. Tankersley, Philip L. Smith, Alan R. Schwartz, and Christopher P. O'Donnell. Impact of interrupted leptin pathways on ventilatory control. *J Appl Physiol* 96: 991–998, 2004.

34- Rahmouni, K. & Morgan, D.A. 2007. Hypothalamic arcuate nucleus mediates sympathetic and arterial pressure responses to leptin. *Hypertension* 49, 647-652.

35-Song N, Zhang G, Geng W, Liu Z, Jin W, Li L, Cao Y, Zhu D, Yu J, Shen L. 2012. Acid Sensing Ion Channel 1 in Lateral Hypothalamus Contributes to Breathing Control. PLoS ONE 7(7): e39982. doi:10.1371/journal.pone.0039982

36-Tankersley C, Kleeberger S, Russ B, Schwartz A, and Smith P. Modified control of breathing in genetically obese (*ob/ob*) mice. *J Appl Physiol* 81: 716–723, 1996. Tallam LS, da Silva AA, Hall JE. 2006. Melanocortin-4 receptor mediates chronic cardiovascular and metabolic actions of leptin. *Hypertension* 48: 58 – 64.

37-Thomas, M.R., Calaresu, F.R., 1972. Responses of single units in the medial hypothalamus to electrical stimulation of the carotid sinus nerve in the cat. *Brain Res.* 44, 49 – 62.

38-Wang TL, Hartzell DL, Rose BS, et al. 1999. Metabolic responses to intracerebroventricular leptin and restricted feeding. *Physiol Behav.* 65:839 – 48.

39-Williams, K.W., Zsombok, A., Smith, B.N. 2007. Rapid Inhibition of Neurons in the Dorsal Motor Nucleus of the Vagus by Leptin. *Endocrinology* 148, 1868–1881.

40-Williams RH, Jensen LT, Verkhatsky A, Fugger L, Burdakov D. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. *Pnas*, vol.104, n.25, 10685–10690.

41-Wirth MM, Olszewska PK, Yu C, Levine AS, Giraudo SQ. 2001. Paraventricular hypothalamic α -melanocyte-stimulating hormone and MTII reduce feeding without causing aversive effects. *Peptides* 22, 129-134.

42-Yeh ER, Erokwu B, LaManna JC, Haxhiu MA. 1997. The paraventricular nucleus of the hypothalamus influences respiratory timing and activity in the rat. *Neurosci Lett* 232: 63– 66.

43-Zhang Z and Felder RB. Melanocortin receptors mediate the excitatory effects of blood-borne murine leptin on hypothalamic paraventricular neurons in rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R303–R310. 2004.

12. Trabalhos desenvolvidos durante a Iniciação Científica

- 1- Publicação no American Journal of Physiology, Como colaboradora:
Hindbrain mineralocorticoid mechanisms on sodium appetite.
- 2- Publicação em andamento como co-autora: Melanocortin system: a mediator of leptin effects on energy balance and blood pressure can also modulate the central chemorespiratory response.

13.Anexos

Manuscrito

Melanocortin system: a mediator of leptin effects on energy balance and blood pressure can also modulate the central chemorespiratory response

Bassi M¹, Nakamura NB¹, Furuya WI¹, Colombari DS¹, Menani JV¹,
do Carmo JM², da Silva AA², Hall JE², Colombari E¹.

1-Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

2-Department of Physiology and Biophysics, University of Mississippi Medical Center, Jackson, Mississippi, USA.

Corresponding Author:

Mirian Bassi, PhD.

Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), 1680 Humaita St., Araraquara, SP, Brazil, 14801-903.

Fax/Phone: (55) 16-33016488.

E-mail: mbassi@foar.unesp.br

Running Title: Melanocortin system mediated leptin effects on chemoreception

Sources of research support: FAPESP, CNPq and Capes.

Abstract

Melanocortin receptor (MC3/4R) plays a pivotal role in mediated metabolic and cardiovascular actions of leptin and may also be able to modulate leptin effects on chemoreception. To tested this hypothesis we treated male Holtzman rats daily with i.c.v. microinjections of leptin (5 μ g/3 μ l/day), SHU9119 - MC3/4R antagonist (0.6 nm/3 μ l/day) or combined treatment (SHU+LEP) into the lateral ventricle for 7 days. After i.c.v. treatments we measured tidal volume (V_T), respiratory frequency (f_R) and pulmonary ventilation (V_E) via whole-body plethysmography during normoxia or hypercapnia, medial arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) through arterial catheter and metabolic rate by indirect calorimetric. In addition, we measured V_E in wild-type mice (WT), in LepR-nestin cre and LepR^{flox/flox}/POMC-cre both mutant mice with leptin receptors deletion and in knockout MC4R^{-/-} mice. The results showed that leptin i.c.v. reduced body weight (~17%), increased V_E -CO₂ (Δ 1335 $\pm$ 79 ml.min⁻¹.kg⁻¹ vs. saline: Δ 779 $\pm$ 81 ml.min⁻¹.kg⁻¹) and MAP (130 $\pm$ 2 mmHg vs. saline: 106 $\pm$ 3 mmHg) (P<0.05). Contrary, SHU treatment increased body weight (~18%) and slightly reduced V_E -CO₂ (Δ 515 $\pm$ 28 ml.min⁻¹.kg⁻¹ vs. saline Δ 779 $\pm$ 81 ml.min⁻¹.kg⁻¹) without change MAP. Combined treatment with SHU+LEP prevented the leptin's effect on body weight, on V_E -CO₂ (Δ 772 $\pm$ 106 ml.min⁻¹.kg⁻¹ vs. leptin Δ 1335 $\pm$ 79 ml.min⁻¹.kg⁻¹) and on MAP (102 $\pm$ 3 mmHg vs. leptin: 130 $\pm$ 2 mmHg) (P<0.05). Transgenic mice have attenuated VE-CO₂ compared to WT mice. These results suggest that central MC3/4R mediated the leptin effects on central chemoreception.

Abstract word count: 247 words.

Keywords: Leptin, melanocortin system, central chemoreception

Introduction

Previous studies indicate that leptin, an adipocyte derived cytokine, can be an important mediator for breathing control. Centrally leptin administration not only reduces body weight and increases sympathetic nervous system (SNS) activity but also raises baseline and chemorespiratory response to carbon dioxide (CO₂) (Bassi et al., 2012, Hall et al., 2010, Inyushkina et al., 2010). Although the mechanisms involved in mediating the effects of leptin on breathing control have not been elucidated, it was previously demonstrated that activation of proopiomelanocortin (POMC) neurons in the arcuate nucleus (ARC) of hypothalamus play a key role in mediation of leptin action on energy balance and blood pressure (Carlyle et al., 2002, Haynes et al., 1999). Once activated, the POMC neuron promotes the release of alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) which in turn activates the melanocortin receptors (MC3/4R) in many nuclei of hypothalamus promoting an increased sympathetic nerve activity and inhibits food intake (Haynes et al., 1999, Rahmouni et al., 2007). In addition, chronic blockade of the brain MC3/4R by intracerebroventricular (i.c.v.) infusion of the antagonist, SHU-9119 completely prevents the effects of leptin to reduce food intake and to raise arterial pressure and heart rate (da Silva et al., 2004). However, the participation of central melanocortin system in mediating the effects of leptin on ventilatory control is unclear.

Previous study showed that obese agouti yellow mice, a model lacking a functional MC4-R receptor in whole body have attenuated ventilatory response to CO₂ (Polotsky et al. 2004), suggesting that impairment of MC4R could impact on hypercapnic responsiveness at the level of the hypothalamus, the medulla,

or potentially other respiratory-sensitive areas inside or outside of the central nervous, like peripheral respiratory chemical control (carotid body). Nevertheless, no studies evaluated the potentially contribution of central MC3/4R for leptin to exert its effects on breathing.

Despite the broad anatomic distribution of CNS melanocortin receptors, MC4R are mainly expressing in the neurons of hypothalamus that are viewed as the mainly site of leptin action on food intake as well as the energy expenditure control (Wirth et al., 2001). Previous studies demonstrated that microinjection of MC3/4R agonist melanotan II (MTII) into the paraventricular nuclei (PVN) increased the renal sympathetic nerve activity and blood pressure (Li et al., 2013) as well reduced food intake (Balthasar et al., 2005). In addition, the leptin administration into the lateral ventricle promotes an increased of blood pressure and heart rate that can be attenuated after MC3/4R antagonist treatment (SHU9119) (da Silva et al., 2004).

Given the potential importance of MC3/4-R role in regulating leptin actions in hypothalamus, we hypothesized that melanocortin system may mediated the increased chemical ventilatory response promoted by leptin and that chronic blockade of the MC3/4-R may attenuate the leptin effect on ventilation. To test this hypothesis we chronically inhibited the central MC3/4-R in Holtzman rats and evaluated the effects of this blocked on leptin stimulatory effects on ventilation under resting condition and during central chemoreflex activation by hypercapnia. The cardiovascular and metabolic parameters also were evaluated. In addition, we also measured V_E in wild-type mice (WT), in mutant mice with leptin receptors deletion (LepR-*nestin* cre and LepR^{flox/flox}/POMC-cre) and in a knockout MC4R^{-/-} mice.

METHODS

The experimental procedures and protocols of this study conformed to the Animal Experimentation Ethics Committee of São Paulo State University - UNESP, Brazil (Proc. nº. 04/2010) and also conformed to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the University of Mississippi Medical Center Institutional Animal Care and Use Committee.

Animals

Male 9-weeks-old Holtzman rats ($n = 24$) from São Paulo State University, Brazil and male 20-week-old C57BL/6J wild-type ($n = 5$), MC4^{-/-} ($n = 5$), LepR^{flox/flox}/POMC-Cre ($n = 3$) and LepR-Nestin cre ($n = 3$) mice were used of these studies. The mice, LepR^{flox/flox}/POMC-Cre mice were generated by crossing POMC-Cre mice that express Cre-recombinase specifically in POMC neurons on a Friend Virus B background (generously provided by Dr. Joel Elmquist, Southwestern Texas University, Dallas, TX) with LepR^{flox/flox} (129-C57Bl/6J× Friend Virus B N2) mice (generously provided by Dr Jeffrey Friedman, Rockefeller University, New York, NY). Specificity of Cre expression in POMC neurons and selective deletion of LepR in POMC neurons have been reported previously (Baltasar et al., 2004, do Carmo et al., 2011). MC4R^{-/-} mice were generated as previously described from MC4R-deficient breeding pairs obtained from Dr. Roger Cone, Oregon Health Sciences University (Tallam et al., 2006). The LepR-Nestin cre and wild-type mice were purchased from the Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine USA.

All the procedures describe below was performed in rats, except the measurements of pulmonary ventilation that also was made in mice.

Intracerebroventricular cannula implantation

The rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg of body weight; Cristalia, Itapira, SP, Brazil) combined with xylazine (7 mg/kg of body weight; Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brazil) intraperitoneally and immobilized in a stereotaxic apparatus (Kopf, Tujunga, CA, USA). Under aseptic conditions a unilateral stainless steel cannula (10 x 0.7 mm) was implanted into the right lateral ventricle (LV) using the following stereotaxic coordinates: - 0.4 mm caudal to bregma, - 4.0 mm below the dura-mater and - 1.6 mm from the midline (Franklin & Paxinos 2004). The guide cannula was anchored to the skull with stainless steel screws and dental acrylic resin. A metal stylet was inserted to seal the guide cannula when not in use.

At the end of the surgery the animals received an intramuscular injection of benzylpenicillin – 80.000 IUs plus streptomycin – 33 mg; Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, Brazil (0.2 ml/rat) and a subcutaneous injection of analgesic/anti-inflammatory Ketoprofen 1%, Ketoflex, Mundo Animal, São Paulo, Brazil (0.03 ml/rat). The animals were allowed to recovery for 7 days after the surgery. The accuracy of the cannula placement was tested by measuring the dipsogenic response (immediate drinking of at least 5 mL of water in 10 min) to one i.c.v. injection of angiotensin II (50 ng/ 1 µl).

Vein and arterial catheter implantation

One day before the experiments the rats were anesthetized with ketamine and xylazine (same dose describe above). Under aseptic conditions the femoral vein and femoral artery were isolated and cannulated with a polyethylene tube (PE-10 connected to a PE-50) filled with saline fixed and exteriorized on the back of the animal to posterior record of baseline mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR).

i.c.v. daily microinjections

Leptin (5 μ g/3 μ l) from National Hormone & Peptide Program, CA, USA or melanocortin receptor antagonist SHU9119 (0.6 nmol/3 μ l) from Phoenix Pharmaceuticals, CA, USA were administrated into the VL of Holtzman rats once a day for 7 consecutive days. For combined treatment, the rats received two microinjections a day, first containing SHU9119 following by a second injection of leptin administrated 30 minutes after. A control group received daily i.c.v. microinjections with vehicle (3 μ l of phosphate buffer saline, PBS pH=7.4). The i.c.v. microinjections were performed between 11:00 and 12:00 am using a Hamilton syringe (5 μ l) coupled with a polyethylene tubing (PE-10) connected to a needle (0.3 mm diameter and 12 mm in length). These doses of leptin and SHU9119 were chosen based on previous studies (Choi et al., 2003, Fendt et al, 2009, Inyushkin et al., 2010; Mark et al., 2009).

Ventilation Measurements

Pulmonary ventilation (V_E) was measured using whole-body plethysmography as previously described (Malan, 1973; Bassi et al 2012). Briefly, rats or mice were acclimated to the plethysmography chamber, 5L for rats and 1L for mice, at room temperature (25°C) for ~30 minutes and the ports for gas exit or entrance in the chamber were closed to produce an internal constant volume. Then, signals of breathing frequency (f_R) and tidal volume (V_T) were measured by changes in the pressure inside the chamber caused by inspiratory and expiratory temperature fluctuations. A spirometer (model ML141 (AD Instruments, Colorado, USA) was used for measurements and the signals were analyzed using PowerLab software. The system was calibrated with injections of 1 mL for rats and 0.2 mL for mice of room air with the animal inside the plethysmography chamber. V_E was calculated as the product of f_R and V_T .

Measurements of metabolic rate

Oxygen consumption (VO_2), carbon dioxide production (VCO_2) and respiratory quotient ($RQ=VCO_2/VO_2$) were calculated using a calorimetric indirect method. Briefly, after i.c.v. treatments the rats were acclimated to the plethysmography chamber (5 L) at room temperature (25°C) for ~30 minutes. The chamber was connected to a gas analyzer (model ADInstruments - ML206) to measure the variation of the O_2 and CO_2 inside the chamber during 1 minute.

Experimental protocol in rats

After recover from i.c.v. cannula implantation (7 days) only the rats that drinking water after angiotensin II dipsogenic test were housed individually in standard metabolic cages for the duration of the study. Food intake and drinking water were measured daily while body weight was evaluated only before and after i.c.v. treatments for 7 days. The experiments were performed in four different groups of rats, wherein the first group received daily vehicle-PBS microinjections, the second group received leptin, and third SHU9119 and the last group of rats received combined treatment with SHU9119+LEP (see details above in i.c.v. daily microinjections). After 6 days of i.c.v. treatments we analyzed the metabolic rate (VO_2 , VCO_2 and RQ) and pulmonary ventilation under resting condition and during central chemoreflex activation by hypercapnia (5 minutes breathing a gas mixture containing 21% O_2 plus 7% CO_2). Following the surgery to vein and arterial catheter implantation was taken to posterior record (24 h) of baseline mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR), conducted on the seventh day of i.c.v. treatments.

Experimental protocol in mice

The mice were acclimatized in the plethysmography chamber for measurements of pulmonary ventilation as describe in ventilation measurements.

Statistical Analyses

The results are presented as mean $\pm$ SEM. One-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test was used for comparisons, using GraphPad Prism 5 software. Statistical significance was accepted at the level of $p < 0.05$.

RESULTS

Effects of i.c.v. leptin treatment on metabolic and cardiorespiratory responses

Chronic i.c.v. leptin treatment (5 $\mu\text{g/day/7 days}$) in rats promotes a reduced food intake ($\sim 70\%$) and body weight ($\sim 17\%$) without significantly change in water intake and urine excretion, however leptin reduces Na^+ ($688 \pm 93 \mu\text{Eq}$ vs. vehicle: $1294 \pm 85 \mu\text{Eq}$) and K^+ ($1293 \pm 166 \mu\text{Eq}$ vs. vehicle: $3379 \pm 666 \mu\text{Eq}$) urine excretion (Figure 1). Leptin enhances baseline ventilation ($783 \pm 36 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ vs. vehicle: $570 \pm 53 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$) due to increased V_T ($7.8 \pm 0.4 \text{ ml.kg}^{-1}$ vs. vehicle: $5.9 \pm 0.6 \text{ ml.kg}^{-1}$) ($P < 0.05$) without significantly changes in baseline f_R (Figure 2-A). In addition, leptin facilitated the 7% CO_2 -induced increase in V_E ($\Delta = 1335 \pm 79 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ vs. vehicle: $779 \pm 81 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$) due to increased V_T ($\Delta = 4.4 \pm 0.4 \text{ ml.kg}^{-1}$ vs. vehicle: $3.1 \pm 0.5 \text{ ml.kg}^{-1}$) and f_R ($\Delta = 73 \pm 9 \text{ breaths.min}^{-1}$ vs. vehicle: $49 \pm 5 \text{ breaths.min}^{-1}$) (Figure 2-B). The values of metabolic rate (VCO_2 and VO_2) were similar between leptin and vehicle treated groups, however leptin attenuated the RQ ($0.73 \pm 0.02 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ vs. vehicle: $0.86 \pm 0.04 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $P < 0.05$) (Table 1). Moreover, leptin promoted a significantly increase in MAP ($130 \pm 2 \text{ mmHg}$ vs. vehicle: $106 \pm 2 \text{ mmHg}$, $P < 0.05$) and a slightly increased in HR ($409 \pm 11 \text{ bpm}$ vs. vehicle: $369 \pm 24 \text{ bpm}$) (Figure 3).

Effects of i.c.v. SHU9119 treatment on metabolic and cardiorespiratory responses

The i.c.v. MC3/4-receptor blocking (SHU9119, 1 nmol/day/7days) antagonizes the effects of leptin on food intake and body weight, promoting an increase of ~27% and ~13% respectively (Figure 1 and Table 1). There are no significant changes in water intake, but urine excretion was higher after SHU9119 (23.6 ± 1.2 mL vs. vehicle: 14.3 ± 2.1 mL, $P < 0.05$). The urine excretion of Na^+ and K^+ was similar to control vehicle group, but it was higher than leptin treated group (1760 ± 241 μEq vs. leptin: 688 ± 93 μEq and 6473 ± 607 μEq vs. leptin: 1293 ± 116 μEq respectively, $P < 0.05$). The values of baseline ventilation after SHU9119 treatment was similar to control vehicle treated group, however the ventilatory response to CO_2 tended to be attenuated ($\Delta 515 \pm 28$ $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ vs. saline: 779 ± 81 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) due to decreased tidal volume ($\Delta 2.2 \pm 0.2$ $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ vs. saline: 3.1 ± 0.5 $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$). When compared to leptin treatment, the ventilatory response to CO_2 was markedly attenuate after SHU9119 ($\Delta 515 \pm 28$ $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ vs. leptin: $\Delta 1335 \pm 79$ $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) due to attenuated V_T ($\Delta 2.2 \pm 0.2$ $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ vs. leptin: 4.4 ± 0.4 $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$) ($P < 0.05$) once f_R does not change. Respiratory quotient (RQ) after daily i.c.v treatment with MC3/4-receptor blocking was similar to control vehicle group but was higher when compared to leptin treatment (0.92 ± 0.01 $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ vs. leptin: 0.73 ± 0.02 $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $P < 0.05$) (Table 1). Likewise, the treatment did not alter the MAP and HR if compared to values of vehicle treated group (Figure 3).

Effects of i.c.v. combined SHU9119 + LEP treatment on metabolic and cardiorespiratory responses

Similar to SHU9119 alone, the combined treatment with SHU9119 and leptin antagonizes the effects of leptin alone on food intake and body weight (Figure 1 and Table 1). There are no significant changes in water intake compared to vehicle group, but urine excretion was higher after SHU9119+LEP (22 ± 2.6 mL vs. vehicle: 14.3 ± 2.1 mL, $P < 0.05$). The urine excretion of Na^+ and K^+ was similar to control vehicle group, but it was higher than leptin treated group (2342 ± 278 μEq vs. leptin: 688 ± 93 μEq and 7010 ± 738 μEq vs. leptin: 1293 ± 166 μEq respectively, $P < 0.05$). SHU9119+LEP treatment does not promote any changes in baseline ventilation or in ventilatory response to CO_2 (Figure 2-A). However, in SHU9119+LEP group occurs the smaller increase of VE-CO_2 compared to increases promoted by leptin alone ($\Delta 772 \pm 106$ $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ vs. leptin: 1335 ± 79 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, $P < 0.05$) due to decreased tidal volume ($\Delta 3.7 \pm 0.7$ $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ vs. leptin: 4.4 ± 0.4 $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$, $P < 0.05$) and f_R ($\Delta 41 \pm 6$ $\text{breaths} \cdot \text{min}^{-1}$ vs. leptin: 73 ± 9 $\text{breaths} \cdot \text{min}^{-1}$, $P < 0.05$), suggesting that SHU9119 blocked the leptin effects on ventilation (Figure 2). Similar to SHU9119 alone, SHU9119+LEP promotes an increase in RQ compared to leptin alone treatment (0.83 ± 0.04 $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ vs. leptin: 0.73 ± 0.02 $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $P < 0.05$) (Table 1). MAP and HR were similar to control vehicle group, however the MAP was different from leptin group (102 ± 3 mmHg vs. leptin: 130 ± 2 mmHg, $P < 0.05$ (Figure 3).

Baseline ventilation and ventilatory response to CO₂ in wild-type, *LepR-nestin cre*, *LepR^{flox/flox}/POMC-cre* and *MC4R^{-/-}* mice

The results of pulmonary ventilation measurements in transgenic mice strongly support our hypothesis that melanocortin system can mediated the effects of leptin on ventilation (Figure 4). Despite of the baseline ventilation values were similar among groups (*LepR-Nestin cre*: $1620 \pm 174 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, *MC4^{-/-}*: $1473 \pm 124 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, *POMC-cre Lep flox*: $1197 \pm 95 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ vs. WT: $2221 \pm 170 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$), the mutant mice presented small values of V_T (*LepR-Nestin cre*: $5.56 \pm 0.2 \text{ ml.kg}^{-1}$, *MC4^{-/-}*: $7.26 \pm 0.2 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, *POMC-cre Lep flox*: $8.8 \pm 0.9 \text{ ml.kg}^{-1}$ vs. WT: $12.7 \pm 0.7 \text{ ml.kg}^{-1}$, $P < 0.05$) and f_R (*LepR-Nestin cre*: $137 \pm 7 \text{ breaths.min}^{-1}$, *POMC-cre Lep flox*: $137 \pm 7 \text{ breaths.min}^{-1}$ vs. WT: $186 \pm 12 \text{ breaths.min}^{-1}$, $P < 0.05$) with only the exception for f_R in *MC4^{-/-}* mice that was similar to WT (*MC4^{-/-}*: $203 \pm 19 \text{ breaths.min}^{-1}$) (Figure 4-A). The ventilatory responses to CO₂ were markedly attenuated in mutant mice group compared to WT (Δ *LepR-Nestin cre*: $950 \pm 44 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, Δ *MC4^{-/-}*: $1370 \pm 107 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, *POMC-cre Lep flox*: $2726 \pm 206 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ vs. WT: $5605 \pm 407 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, $P < 0.05$) due to smaller V_T (Δ *LepR-Nestin cre*: $2.07 \pm 0.1 \text{ ml.kg}^{-1}$, Δ *MC4^{-/-}*: $3.33 \pm 0.3 \text{ ml.kg}^{-1}$, *POMC-cre Lep flox*: $7.4 \pm 0.9 \text{ ml.kg}^{-1}$ vs. WT: $11.6 \pm 0.6 \text{ ml.kg}^{-1}$, $P < 0.05$) (Figure 4-B). The f_R during CO₂ stimulation was similar between the groups except in the *MC4^{-/-}* group that present smaller values compared to WT (Δ *MC4^{-/-}*: $67 \pm 9 \text{ breaths.min}^{-1}$ vs. WT: $142 \pm 16 \text{ breaths.min}^{-1}$, $P < 0.05$) (Figure 4-B).

DISCUSSION

There are two major findings in this study. First, we demonstrated that chronic administration of leptin into the lateral ventricle promotes increased baseline ventilation and potentiates the central chemorespiratory response, suggesting that leptin can contribute to breathing control by action in hypothalamic areas. Second, we shown that the ability of leptin to improve ventilation was completely abolished after MC3/4-receptor blocking, with suggest that central melanocortin system can mediate this effect of leptin on ventilation. Moreover, we also demonstrated that transgenic mice, with leptin receptor deletion or impaired MC4R, have attenuated ventilatory response to CO₂ which strongly supports the idea of participation of melanocortin system in mediated leptin effects on ventilation.

Accord to previous studies, leptin is a potent stimulator of ventilatory response and appears to act in brainstem areas responsible for the breathing control such as nucleus of solitary tract (NTS) and retrotrapezoid nuclei (RTN) (Bassi et al., 2012 e 2013, Inyushkina et al., 2010, Ciriello et al., 2012). Here we demonstrated that in parallel with this role of leptin in medullary areas, leptin can also contributed to breathing modulation via activation of hypothalamic centers (forebrain?).

It was a consensus that ventilatory responses to chemical stimulation like hypercapnia and hypoxia (hyperventilation) results from an over activity not only of the medullary neuronal network responsible for the generation and maintenance of the basic respiratory rhythm. Since 60s to 70s it was demonstrated that hypoxia or hypercapnia, as well as the electrical stimulation

of the carotid sinus nerve can activate the caudal hypothalamic region (Cross, 1963, Thomas, 1972). Further, it was recently identified the acid-sensing ion channels (ASICs) in the caudal lateral hypothalamus area (LHA) (Song et al., 2012). In addition, more rostral hypothalamic nuclei can also mediate the ventilatory responses once electrical stimulation of the paraventricular nucleus (PVN) promotes an increased in ventilation (Duan et al., 1997, Yeh, 1997) and elevated CO₂ marked increase c-Fos positive cells in PVN (Prabaha et al., 2002). Moreover, the disinhibition of neurons in the dorsomedial hypothalamus (DMH) promotes an increased in discharge of phrenic nerve activity (PNA) (Mc Dowall et al., 2007).

Considering the participation of hypothalamic centers and the role of leptin on ventilatory response, we can speculated some potentially mechanisms for leptin modulation of ventilation via hypothalamus. First, leptin have a knowledge action on proopiomelanocortin (POMC) neurons in the arcuate nuclei. Once activated, the POMC neurons stimulated the secretion of MC3/4-R in lateral hypothalamus (Elias et al., 1998 e 1999, Leininger et. al, 2009, da Silva et al., 2004), that also appears to mediated the secretion of orexin, an important mediator of hypercapnic ventilatory response (Dias et al., 2009, Willians, 2007). Therefore, the results of the present study suggest that MC3/4R probably of hypothalamic areas can play an important role in mediated the leptin effects on VE-CO₂. In addition we can speculate that maybe leptin also contributes to VE-CO₂ due to stimulate orexin release in LHA, however our results can not evaluate the role of leptin on production of orexin.

Furthermore, a second possible mechanism by the way leptin can contribute to improvement of ventilatory responses via action in the

hypothalamus can be the activation of the perifornical region (PeF), that has a considerably number of leptin receptors (Hakansson et al., 1999, Laque et al., 2013) and previous studies associated this area with regulating of breathing during sleep, stress and exercise (Dimicco et al. 2002; McDowall et al. 2007, Li et al., 2013). Furthermore, recent studies demonstrated that PeF stimulation with gabazine increased blood pressure, phrenic nerve discharge (PND) and the firing rate of retrotrapezoid neurons, an important chemorespiratory region (Fortuna et al, 2009). However the pathways that mediate RTN activation when the posterior hypothalamus is stimulated are still too hypothetical. Further studies are necessary to evaluate the role of leptin in this area.

Our results of blood pressure corroborated to previous data that demonstrated the involvement of MC3/4R in mediating the leptin actions on cardiovascular function. Our results indicated that leptin into the LV promotes an increase in MAP that was blunted after SHU9119 combined treatment. On the others hands, contrary to the previous reports, in ours results SHU9119 alone did not promotes reduction in MAP with values similar to control-PBS group. One possible explanation for this can be the unique daily i.c.v. microinjection of SHU9119 used in this study versus the continuous infusion via osmotic mini-pump performed in previous studies (da Silva et al., 2009). For the same reason we can say that leptin does not promotes significantly changes in the HR. However with only one i.c.v. microinjection a day of leptin or SHU9119 we observed clear the effects on food intake and V_E .

As expected, after daily leptin treatment occurs a decreased in food intake and consequently of body weight, without significantly changes in urine excretion but with Na^+ and K^+ retention. These results were also observed in

previous studies after chronic leptin administration and appear to be related to the role of leptin on development of hypertension (Bettowisk et al., 2005). Interesting, the SHU9119 block this effects of leptin on ions excretion, confirming the participation of melanocortin system on cardiovascular leptin effects.

Related to metabolic rate, previous studies demonstrated that leptin decreased the RQ in ob/ob mice (Hogberg et al., 2005), obese (fa/fa) Zucker rats (Wang et al., 1998) and Sprague-Dawley rats (Dubinon et al., 2010, Wang et al., 1999). In corroboration with this data, our results demonstrated that leptin decreased RQ due to a decreased VCO_2 that can be justified by less meals with consequent deducted of substrates oxidation that will be produced less CO_2 . Therefore, we can suggest that the effects of leptin on ventilation occur due to activation of respiratory pathways and not due to metabolic changes, once leptin improved the ventilatory response despite of reduction of VCO_2 .

In conclusion, the results of the present study contributes to the understanding of the action of leptin on the mechanisms of breathing control, suggesting that leptin can also mediated the ventilatory responses, at least in part, by action probably in hypothalamic areas with participation of MC3/4R. Additional studies are necessary to further examine specific nuclei in hypothalamus that mediate the actions of leptin on respiratory function.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to FAPESP and CNPq for financial support.

CONFLICT OF INTEREST

We have no any actual or potential conflict of interest.

REFERENCES

Baltasar N, Coppari R, McMinn J, Liu SM, Lee CE, Tang V, Kenny CD, McGovern RA, Chua SC, Elmquist JK, Low BB. 2004. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron*;42:983–991.

Balthasar N, TD Louise, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang C, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist LK, Lowell B. 2005. Divergence of Melanocortin Pathways in the Control of Food Intake and Energy Expenditure. *Cell*, vol 123, 493-505.

Bassi, M., Giusti, H., Leite, C.M., Anselmo-Franci, J.A., do Carmo, J.M., da Silva, A.A., Hall, J.E., Colombari, E., Glass, M.L. 2012. Central leptin replacement enhances chemorespiratory responses in leptin-deficient mice independent of changes in body weight. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 464, 145-153.

Betowski J, Jamroz-Więciewska A, Borkowska E, Nazar J, Marciniak A. 2005. Antioxidant treatment normalizes renal Na⁺ ,K⁺-ATPase activity in leptin-treated rats. *Pharmacology Reports*, 57, 219-228.

Carlyle M, Jones OB, Kuo JJ, Hall JE. 2002. Chronic cardiovascular and renal actions of leptin: role of adrenergic activity. *Hypertension* 39:496 –501.

Choi Y, Li CL, Page K, Westby A, Della-Fera MA, Lin J, Hartzell DL, Baile CA. 2003. Melanocortin receptors mediate leptin effects on feeding and body weight but not adipose apoptosis. *Physiology & Behavior* 79, 795 – 801.

Cross, B.A., Silver, I.A., 1963. Unit activity in the hypothalamus and the sympathetic response to hypoxia and hypercapnia. *Exp. Neurol.* 7, 375 – 393.

da Silva, Kuo JJ, Hall JE. 2004. Role of hypothalamic melanocortin3/4 receptors in mediating chronic cardiovascular, renal and metabolic actions of leptin. *Hypertension* . 43:1312–1317.

Dias MB, Li A, Nattie EE. 2009. Antagonism of orexin receptor-1 in the retrotrapezoid nucleus inhibits the ventilatory response to hypercapnia predominantly in wakefulness. *J Physiol* 587.9, pp 2059–2067.

DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV. 2002. The dorso-medial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 469 – 480.

do Carmo JM, da Silva AA, Cai Z, Lin S, Dubinon JH, Hall JE. 2011. Receptors in Proopiomelanocortin Neurons Control of Blood Pressure, Appetite, and Glucose by Leptin in Mice Lacking Leptin. *Hypertension*; 57:918-926

Duan, Y.F., Winters, R., McCabe, P.M., Green, E.J., Huang, Y., Schneiderman, N., 1996. Behavioral characteristics of defence and vigilance reactions elicited by electrical stimulation of the hypothalamus in rabbits. *Behav. Brain. Res.* 81, 33 – 41

Dubinon JH, da Silva AA, Hall JE. 2010. Enhanced blood pressure and appetite responses to chronic central melanocortin-3/4 receptor blockade in dietary-induced obesity. *Hypertens.* 28(7): 1466–1470. doi:10.1097/HJH.0b013e328339f20e.

Elias, C.F., Kelly, J.F., Lee, C.E., Ahima, R.S., Drucker, D.J., Saper, C.B., Elmquist, J.K. 2000. Chemical characterization of leptin activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 423(2), 261-281.

Fendt M, Burki H, Imobersteg S, Lingenhohl K, McAllister KH, Orain D, Uzunov DP, Chaperon F. 2009. Fear-reducing effects of intra-amygdala neuropeptide Y infusion in animal models of conditioned fear: an NPY Y1 receptor independent effect. *Psychopharmacology*. 206(2):291-301.

Fortuna MG, Stornetta RL., West GH, Guyenet PG. 2009. Activation of the retrotrapezoid nucleus by posterior hypothalamic stimulation. *J Physiol* 587.21 (2009) pp 5121–5138.

Franklin KBJ & Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 2004.

Guo, M., Lu, Y., Garza, J.C., Li, Y., Chua, S.C., Zhang, W., Lu, B., Lu, X.Y. 2012. Forebrain glutamatergic neurons mediate leptin action on depression-like behaviors and synaptic depression. *Transl Psychiatry* 2, e83.

Håkansson M, de Lecea L, Sutcliffe JG, Yanagisawa M, Meister B. 1999. Leptin receptor- and STAT3-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurones of the lateral hypothalamus. *J Neuroendocrinol*. Aug;11(8):653-63.

Hall, J.E., da Silva, A.A., do Carmo, J.M., Dubinon, J., Hamza, S., Munusamy, S., Smith, G., Stec, D.E. 2010. Obesity-induced Hypertension: Role of Sympathetic Nervous System, Leptin and Melanocortins. *J Biological Chemistry* 285(23), 17271-17276.

Haynes WG, Morgan DA, Djalali A, Sivitz WI & Mark AL (1999). Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic. *Hypertensio n*33, 542–547.

Helena Hogberg H, Engblom L, Ekdahl A, Lidell V, Walum E, Alberts P. 2006. Temperature Dependence of O₂ Consumption; Opposite Effects of Leptin and Etomoxir on Respiratory Quotient in Mice. *OBESITY* Vol. 14 No. 4. 673-682.

Inyushkin, A.N., Inyushkina, E.M., Merkulova, N.A. 2009. Respiratory Responses to Microinjections of Leptin into the Solitary Tract Nucleus. *Neurosc Behav Physiol* 39(3), 231-240.

Inyushkina, E.M., Merkulova, N.A., Inyushkin, A.N. 2010. Mechanisms of the Respiratory Activity of Leptin at the Level of the Solitary Tract Nucleus. *Neurosc Behav Physiol* 40(7), 707-713.

Kc P, Haxhiu MA, Trough CO, Balan KV, Anderson WA, Mack SO. 2002. CO₂-induced c-Fos expression in hypothalamic vasopressin containing neurons. *Respiration Physiology* 129:289 – 296.

Laque A, Zhang Y, Gettys S, Nguyen T, Bui K, Morrison CD, Heike M. 2012. Leptin receptor neurons in the mouse hypothalamus are colocalized with the neuropeptide galanin and mediate anorexigenic leptin action. 2012. *American*

Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism Published 1 May 2013
Vol. 304 no. E999-E1011 DOI: 10.1152/ajpendo.00643.2012

Leininger GM, Jo Y, Leshan RL, Louis GW, Yang H, Barrera JG, Wilson H., Opland DM, Faouzi MA, Gong Y, Jones JC, Rhodes CJ, Chua Jr. S, Diano S, Horvath TL., Seeley RJ, Becker JB, Münzberg H, Myers Jr MG. 2009. Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab.* 10(2): 89–98. doi:10.1016/j.cmet.2009.06.011.

Li P, Cui B, Zhang L, Sun H, Liu T, Zhu G. 2013. Melanocortin 3/4 receptors in paraventricular nucleus modulate sympathetic outflow and blood pressure. *Exp Physiol* 98.2 pp 435-443.

Li N, Li A, Nattie E. Focal microdialysis of CO₂ in the perifornical – hypothalamic area increases ventilation during wakefulness but not NREM sleep 2013. *Respir Physiol Neurobiol.* 185(2):3 49 –55.

McDowall LM, Horiuchi J, Dampney RAL. 2007. Effects of disinhibition of neurons in the dorsomedial hypothalamus on central respiratory drive. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1728–R1735.

Malan, A. 1973. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respir Physiol* 17, 32-44.

Mark, A.L., Agassandian, K., Morgan, D.A., Liu, X., Cassel, M.D., Rahmouni, K. 2009. Leptin signaling in the nucleus tractus solitarii increases sympathetic nerve activity to the kidney. *Hypertension* 53, 375-380.

Polotsky, V.Y., Smaldone, M.C., Scharf, M.T., Li, J., Tankersley, C.G., Smith, P.L., Schwartz, A.R., O'Donnell, C.P. 2004. Impact of interrupted leptin pathways on ventilatory control. *J Appl Physiol* 96, 991-998.

Rahmouni, K. & Morgan, D.A. 2007. Hypothalamic arcuate nucleus mediates sympathetic and arterial pressure responses to leptin. *Hypertension* 49, 647-652.

Song N, Zhang G, Geng W, Liu Z, Jin W, Li L, Cao Y, Zhu D, Yu J, Shen L. 2012. Acid Sensing Ion Channel 1 in Lateral Hypothalamus Contributes to Breathing Control. *PLoS ONE* 7(7): e39982. doi:10.1371/journal.pone.0039982

Tallam LS, da Silva AA, Hall JE. 2006. Melanocortin-4 receptor mediates chronic cardiovascular and metabolic actions of leptin. *Hypertension* 48: 58 – 64.

Thomas, M.R., Calaresu, F.R., 1972. Responses of single units in the medial hypothalamus to electrical stimulation of the carotid sinus nerve in the cat. *Brain Res.* 44, 49 – 62.

Wang TL, Hartzell DL, Rose BS, et al. 1999. Metabolic responses to intracerebroventricular leptin and restricted feeding. *Physiol Behav.* 65:839 – 48.

Williams, K.W., Zsombok, A., Smith, B.N. 2007. Rapid Inhibition of Neurons in the Dorsal Motor Nucleus of the Vagus by Leptin. *Endocrinology* 148, 1868–1881.

Williams RH, Jensen LT, Verkhatsky A, Fugger L, Burdakov D. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. *Pnas*, vol.104, n.25, 10685–10690.

Wirth MM, Olszewska PK, Yu C, Levine AS, Giraud SQ. 2001. Paraventricular hypothalamic α -melanocyte-stimulating hormone and MTII reduce feeding without causing aversive effects. *Peptides* 22, 129-134.

Yeh ER, Erokwu B, LaManna JC, Haxhiu MA. 1997. The paraventricular nucleus of the hypothalamus influences respiratory timing and activity in the rat. *Neurosci Lett* 232: 63– 66.

Zhang, Z. & Felder, R.B. 2004. Melanocortin receptors mediate the excitatory effects of blood-borne murine leptin on hypothalamic paraventricular neurons in rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, 303–310.

Table 2: Effects of 6 days of i.c.v. treatment in a control-PBS group, leptin, SHU-9119 or SHU-9119 combined with leptin on metabolic rate of Holtzman rats.

	PBS	LEP	SHU	SHU + LEP
VCO₂ (ml.kg⁻¹.min⁻¹)	12.9 ± 1	10.9 ± 0.7	12.7 ± 0.5	11.3 ± 0.5
VO₂ (ml.kg⁻¹.min⁻¹)	15.1 ± 1	15.1 ± 0.6	13.8 ± 0.6	13.7 ± 0.3
RQ (VCO₂/VO₂)	0.86 ± 0.04	0.73 ± 0.02 ^α	0.92 ± 0.01 ^β	0.83 ± 0.04 ^β
Rectal Temperature (°C)	36.7 ± 0.2	36.8 ± 0.2	36.6 ± 0.2	36.7 ± 0.1
Body Weight (g)	342 ± 8	286 ± 9 ^α	375 ± 7 ^{αβ}	386 ± 12 ^{αβ}

Values are means ± SE of metabolic rate after 6 days of i.c.v. treatments (n = 6/group). ^α different from PBS-treated group and ^β different from leptin-treated group. ANOVA one-way (P < 0.05).

Figure legends

Figure 1: (A) Daily food intake and water intake, (B) Changes in body weight and urine excretion (UV, urine volume, UNaV, amount of sodium excreted and UKV, amount of potassium excreted) in a control period and after i.c.v. treatments with PBS (control), leptin, SHU-9119 or SHU-9119 combined with leptin (n = 6/group). α different from control-PBS group. β different from leptin-treated group ($p < 0.05$).

Figure 2: fR, respiratory frequency, VT, tidal volume and VE, ventilation. (A) baseline and ventilatory response to 7% CO₂ and (B) delta of responses before and after i.c.v. treatments in a control-PBS group, leptin, SHU-9119 or SHU-9119 combined with leptin (n=6/group). α different from control-PBS group, β different from leptin-treated group ($p < 0.05$).

Figure 3: Baseline mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) in Holtzman rats after daily i.c.v. microinjections of PBS-control, leptin, SHU-9119 ou SHU-9119 combined with leptin per 7 days. (n = 6/group). α different from control-PBS group and β different from leptin-treated group ($p < 0.05$).

Figure 4: fR, respiratory frequency, VT, tidal volume and VE, ventilation. (A) baseline and ventilatory response to 7% CO₂ and (B) delta of responses in wild-type (n=5) and in different mutant mice (n=3/group), LepR-Nestin cre, a mutant mice with leptin receptor deletion, MC4-/- knockout to MC4 receptors and POMC-cre Lep flox deletion of leptin receptors in POMC neurons. θ different from control-wild-type group and γ from LepR-Nestin cre group ($p < 0.05$).

Figure 1

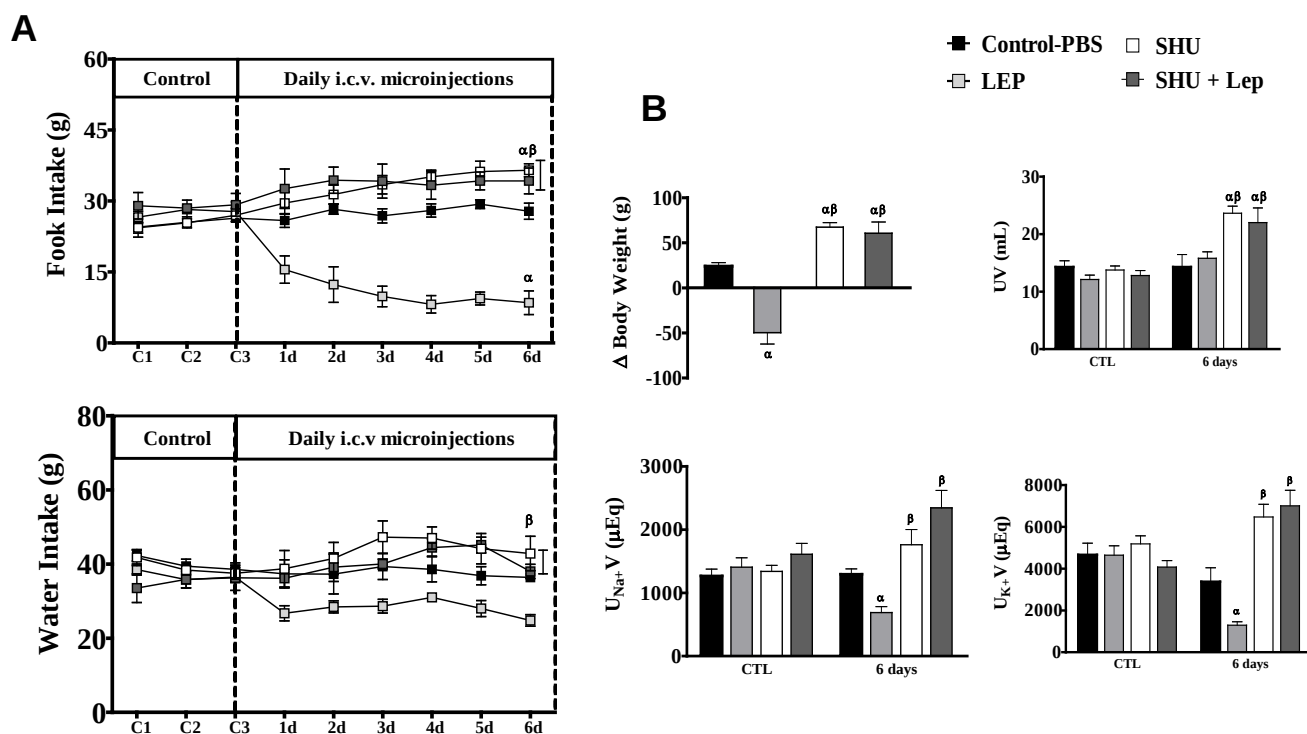


Figure 2

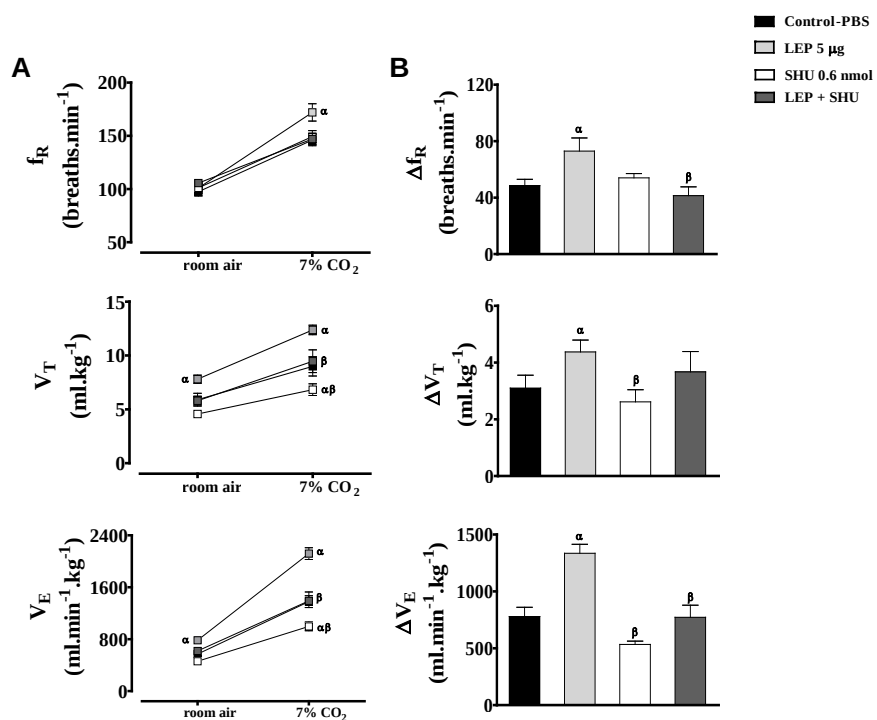
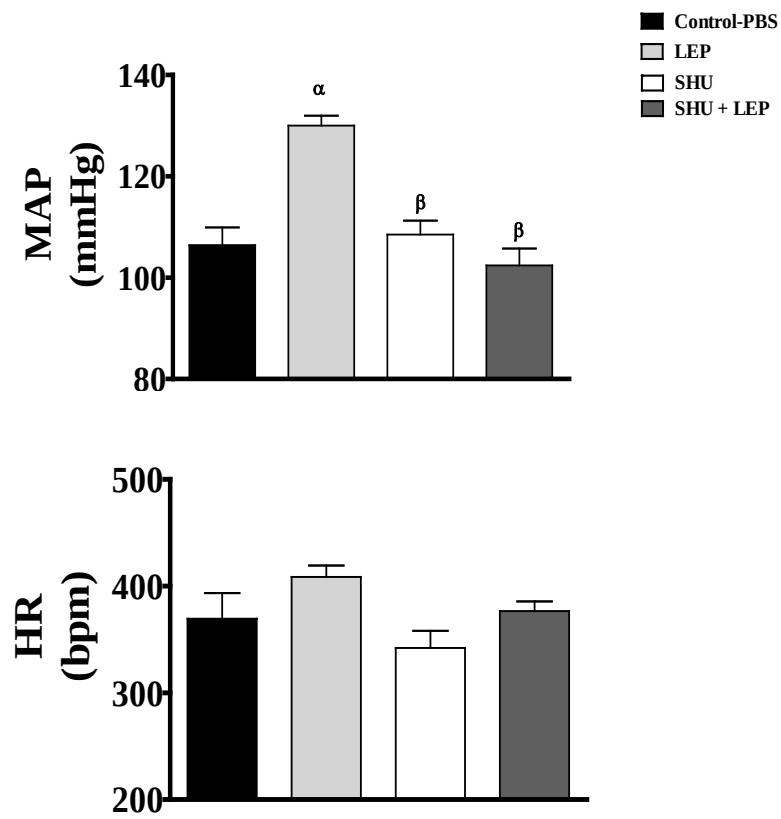


Figure 3



14. Folha de Assinaturas

Araraquara, 24 de Junho de 2014

Estou de acordo com o Trabalho de Conclusão de Curso,

Natalia Borges Nakamura

(Aluna)

Eduardo Colombari

(docente)