

MÁRCIO PEREIRA DA SILVA

***EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO FRIO SOBRE A EXPRESSÃO
DE PROTEÍNAS HIPOTALÂMICAS E A PARTICIPAÇÃO DO
HORMÔNIO CONCENTRADOR DE MELANINA (MCH) NO
CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR, PESO CORPORAL,
TERMOGÊNESE E AÇÃO MOLECULAR DA INSULINA***

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

CAMPINAS

2004

MÁRCIO PEREIRA DA SILVA

***EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO FRIO SOBRE A EXPRESSÃO
DE PROTEÍNAS HIPOTALÂMICAS E A PARTICIPAÇÃO DO
HORMÔNIO CONCENTRADOR DE MELANINA (MCH) NO
CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR, PESO CORPORAL,
TERMOGÊNESE E AÇÃO MOLECULAR DA INSULINA***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Clínica Médica, área de Ciências
Básicas.*

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

CAMPINAS

2004

NIDADE	BC
CHAMADA	TI/UNICAMP
	Si38e
EX	
IMBO BC/	66480
LOC.	6-00086-06
C	☐
D	☒
RECO	11,00
IATA	30/11/05
CPD	

BIB ID: 373878

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Si38e Silva, Márcio Pereira da
Efeito da exposição ao frio sobre a expressão de proteínas hipotalâmicas e a participação do hormônio concentrador de melanina (MCH) no controle da ingestão alimentar, peso corporal, termogênese e ação molecular da insulina / Márcio Pereira da Silva. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Lício Augusto Velloso
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. * Hormônios hipotalâmicos – análise. 2. Metabolismo energético. 3. * Insulina - ação. I. Lício Augusto Velloso. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: PROF. DR. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO

Membros:

1. Prof. Dr. Mário José Abdala Saad _____
 2. Prof. Dr. José Antonio R. Gontijo _____
 3. Profa. Dra. Eliete Luciano _____
 4. Prof. Dr. José Cipolla Neto _____
-

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas, da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

DEDICO:

Aos meus pais

Urubatan e Lucinete,

Aos meus avós

Otávio (in memoriam) e Dulcinéia (in memoriam)

Adney e Maria José

Aos meus irmãos Fábio, Otávio, Adney e Flávio

E a toda minha família

DEDICO:

A Rosa e Gabriel

*Os grandes amores de minha vida
queridos pela paciência e compreensão
durante os breves momentos em que estivemos juntos
ao longo desta etapa de nossas vidas*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Ao amigo Lício Augusto Velloso
pela serenidade e disposição com que conduziu a orientação,
pela inestimável contribuição à minha formação acadêmica,
pela oportunidade de poder retribuir à confiança
conferida na realização deste trabalho,*

*Aos grandes amigos
Luís Guilherme e Alcyane,
Paulo, Solange e Natasha,
Júlio e Edna,
Dona Maria, Fatiminha, Luís, São, Zé e Marlene,
por estarem ao nosso lado e
pelo carinho e apoio
nos momentos em que precisamos,
Eu, a Rosa e o Gabriel,*

*Aos meus amigos
Cláudio (Cafu) e Alessandra,
um especial abraço pela constante disponibilidade
e presteza na realização dos trabalhos,
pelas discussões acadêmicas,
pela agradável companhia
e por sua amizade.*

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Aos amigos de laboratório, Márcio Torsoni, Zé Barreto, Brahma, Henrique, Eli, Wilson, Hugo, Eduardo, Eliana, Fernanda, Vivian, Daniela, Maristela, Graziela, Érika, Talita, Rachel, Miriam, Patrícia, Paty Carol, Mônica, Maria Helena, Rosângela e Emiko, pelos momentos de convívio harmônico, pela descontração, pelas discussões e colaborações prestadas.

Ao Prof. Dr. Mário José Abdala Saad, por disponibilizar o espaço de seu laboratório, pelas contribuições em discussões acadêmicas, pela oportunidade de poder desfrutar de seus ensinamentos e agradável convivência.

Aos professores Antonio Carlos Boschero, Everardo Magalhães, Maria Cristina C. G. Marcondes, Kleber Franchini e Ariovaldo P. Cruz-Neto, por cederem seus laboratórios para a realização de algumas etapas desta tese.

Aos alunos e funcionários dos laboratórios dos professores Kleber Franchini, Antônio Carlos Boschero e Everardo Carneiro, pela solidariedade na permuta de equipamentos e produtos.

A Viviane D. Augusto e Gislaine Ventrucci pela colaboração em protocolos fora de nosso laboratório.

Ao Departamento de Educação Física da Unesp de Rio Claro, nas pessoas de Clarice Sybuia e Maria Alice Rostom de Mello, somos gratos pela possibilidade de realização dos primeiros pilotos referentes ao projeto do doutorado.

Aos técnicos, Luís Janeri e Jósimo, demais funcionários do laboratório, e aos funcionários do biotério, em especial ao Márcio, muito obrigado pelo auxílio e disponibilidade.

Aos colegas de Pós-Graduação da Unesp de Rio Claro, Gica, Osmar, Anderson, Cláudio, Isaura, Sandra, Gleber, Alaércio, Alexandre, Patrícia, Ana Clara, Dalton, Sidney, Carmen e Herbert, Nelson, Edson, Glay, Ray e Eliana, pelo incentivo e apoio.

Aos funcionários da Pós-Graduação e Biblioteca, pela assistência e apoio técnico requisitados.

Aos amigos de catarse do futebol do “Bolão” e do Grêmio Recreativo em Rio Claro, pelos momentos de descontração dentro e fora das quatro linhas.

Aos amigos de São Luís do Maranhão (Paulo, Gilson e Aurenildes, Buana e Ana Elvira, Barcelos, Sálvio e Leles), presentes em lembranças muito vivas dos tempos de Colégio Marista, atletismo, Faculdade de Odontologia, curso de Ed. Física, atuação em academias e escolas, encontros/jogos nas praias, reggae, pescarias, boa comida maranhense, etc.

A Capes e FAPESP pelo auxílio financeiro.

	PÁG.
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xvi
1-INTRODUÇÃO.....	19
2-OBJETIVOS.....	25
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1-Métodos empregados na caracterização do modelo animal.....	28
3.1.1-Animais experimentais.....	28
3.1.2-Determinação de glicose.....	28
3.1.3-Determinação de ácidos graxos livres (AGL).....	28
3.1.4-Determinação da insulina.....	29
3.1.5-Determinação da leptina.....	29
3.1.6-Determinação de TSH.....	29
3.1.7-Determinação de corticosterona.....	29
3.1.8-Determinação de glicogênio.....	29
3.1.9-Determinação da composição corporal.....	29
3.2-Métodos empregados na canulação e protocolos de injeções ICV.....	30
3.2.1-Cirurgia Extereotóxica para implante de cânula.....	30
3.2.2-Infusão intracerebro-ventricular (ICV) de oligonucleotídeo sense ou antisense para MCH.....	30
3.2.3-Infusão ICV do hormônio MCH ou oligonucleotídeo antisense paraMCH.....	31
3.2.4-Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Teste de Tolerância à Insulina (ITT).....	31
3.3-Métodos empregados na realização do <i>cDNA macroarray</i>	31
3.3.1-Obtenção de RNA.....	31
3.3.2-Síntese da sonda a partir de RNA total.....	32
3.3.3-Hibridização.....	32

3.3.4-Detecção e análise das imagens.....	33
3.4-Análise da Expressão Gênica de MCH por RT-PCR.....	33
3.5-Calorimetria Indireta.....	34
3.6-Análise de proteínas por <i>Western blot</i> e <i>dot-blot</i>	35
3.7-Determinação dos níveis hipotalâmicos de MCH por RIA.....	36
3.8-Análise estatística.....	37
4- RESULTADOS.....	38
4.1-Características metabólicas, bioquímicas e hormonais de ratos expostos ao frio.....	39
4.2-Análise por <i>cDNA macroarray</i>	45
4.3-Seleção do MCH entre os genes modulados pela exposição ao frio e confirmação dos resultados do <i>cDNA macroarray</i>	45
4.4-Papel da hiper-expressão de MCH pela exposição ao frio sobre parâmetros metabólicos e bioquímicos.....	47
4.5-Papel do MCH sobre a ação insulínica.....	54
5. DISCUSSÃO.....	63
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
7-ANEXO.....	82
Hypothalamic Melanin-Concentrating Hormone is Induced by Cold Exposure and Participates in the Control of Energy Expenditure in Rats. Pereira-da-Silva M. et al. <i>Endocrinology</i> , 144: 4831-4840, 2003.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH	hormônio estimulador melanocítico α
AGL	ácido graxo livre
AGRP	peptídeo relacionado ao agouti
Akt	proteína quinase B
ARC	núcleo arqueado
BAT	tecido adiposo marrom
CART	peptídeo regulado pela cocaína e anfetamina
CCK	colecistoquinina
cDNA	ácido desoxiribonucleico complementar
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
dATP	trifosfato de adenosina
DEPC	dietilpirocarbonato
DMH	núcleo hipotalâmico dorso-medial
dNTP	2'-deoxynucleoside 5'triphosphate
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
GTT	teste de tolerância à glicose
ICV	intracerebro-ventricular
IMC	índice de massa corporal
ITT	teste de tolerância à insulina
KOH	hidróxido de potássio
LH	núcleo hipotalâmico lateral
MCH	hormônio concentrador de melanina
MMLV	murine Maloney leukemia virus
NPY	neuropeptídeo Y
PCR	reação em cadeia da polimerase
PMSF	fluoreto de fenilmetil sulfona
PVN	núcleo hipotalâmico para-ventricular

QR	quociente respiratório
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
RNAses	enzimas degradadoras de RNA
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase antecedida por transcrição reversa
SDS	duodecil sulfato de sódio
TE	tampão a base de tris-HCL e EDTA
Tris	tri (hidroximetil)-aminometano
UCP-1	proteína desacopladora mitocondrial 1
VMH	núcleo hipotalâmico ventro-medial
WAT	tecido adiposo branco

RESUMO

A exposição de animais homeotérmicos à baixa temperatura promove alterações fisiológicas que refletem o desvio do fluxo de energia para a produção de calor. A perda do controle coordenado sobre a ingestão alimentar e o gasto energético constitui mecanismo central no desenvolvimento da obesidade, um dos mais prevalentes problemas de saúde pública da atualidade. Uma vez que, sob exposição ao frio, alta ingestão alimentar está associada à elevada termogênese, perda de peso e baixos níveis de insulina, utilizou-se uma análise por cDNA- macroarray visando a identificação de proteínas hipotalâmicas que fossem moduladas em resposta à exposição ao frio (4 °C). Esta análise revelou um aumento na expressão do neuropeptídeo orexigênico MCH (hormônio de concentração da melanina) em ratos expostos ao frio. Para avaliar o efeito da hiper-expressão hipotalâmica do MCH sobre a temperatura corpórea, a ingestão de alimentos e a variação de peso corpóreo em ratos expostos ao frio, foi utilizado um oligonucleotídeo antisense específico para bloqueio da síntese protéica de MCH, o qual não alterou a ingestão alimentar nem a temperatura corporal desses animais. Tal bloqueio promoveu queda significativa no peso corporal dos mesmos, bem como redução no glicogênio hepático e gordura epididimal, aumento relativo na gordura corporal, hipertrofia do tecido adiposo marrom com aumento na expressão de UCP1 (proteína desacopladora mitocondrial 1) neste tecido, além de aumento no consumo da massa corporal isenta de gordura. Deste modo, o aumento na expressão hipotalâmica de MCH em ratos expostos ao frio parece participar do processo que permite a utilização eficiente de energia para produção de calor durante a adaptação termogênica ao frio. Na parte final deste estudo avaliou-se o papel do MCH sobre produção e ação periférica da insulina e sobre etapas intermediárias fundamentais na transdução do sinal molecular deste hormônio em animais mantidos em temperatura ambiente. O estímulo com MCH exógeno promoveu aumento nos níveis de glicose tanto em condições basais quanto durante o GTT, sem alteração nos níveis de insulina, enquanto o tratamento com oligonucleotídeo antisense não alterou estes parâmetros. Assim, o tratamento com MCH parece contribuir para um comprometimento da resposta funcional à insulina. O tratamento com MCH induziu redução na ativação da Akt em músculo, sem modificação na resposta molecular à insulina nos demais tecidos, sugerindo que o MCH *per se*, e através de um efeito central, possa atuar de maneira primária sobre a modulação na ação periférica da insulina, por mecanismos que exerçam interferência na sinalização da insulina em tecidos chave na

captação de glicose. O tratamento com MCH promoveu ainda redução na fosforilação da ERK induzida por insulina em tecido adiposo branco, enquanto o tratamento com oligonucleotídeo antisense MCH levou a um aumento na sua fosforilação em tecido adiposo marrom. Os resultados aqui apresentados trouxeram importantes informações não apenas no que se refere ao controle da ingestão alimentar e termogênese como também no controle central da ação periférica da insulina. Por fim, os resultados apresentados revelam o papel do neurotransmissor MCH como potencial alvo terapêutico na terapia da obesidade e diabetes mellitus tipo2.

ABSTRACT

The exposure of homeothermic animals to cold environment leads to physiological adaptations that are required to maintain a stable body temperature. Among these adaptations, the increase of food consumption accompanied by weight loss reflects the deviation of energy flow toward heat production. Loss of coordinated control of food ingestion and energy expenditure represents a central mechanism in the development of obesity, one of the most prevalent public health problems at the present time. Because, under cold exposure, high food consumption is associated with increased thermogenesis, weight loss and decreased insulin and leptin levels, an analysis of cDNA-microarray was employed to identify hypothalamic proteins that are modulated in response to cold exposure (4 °C). The cDNA microarray analysis, confirmed by RT-PCR, immunoblot, and RIA, revealed that the hypothalamic expression of the appetite-stimulating neuropeptide, melanin-concentrating hormone (MCH), was increased by exposure of rats to cold environment. To investigate effects of elevated MCH hypothalamic expression on body temperature, food ingestion and body weight variation in cold exposed rats, a MCH antisense oligonucleotide was used to inhibit MCH synthesis. The inhibition of hypothalamic MCH expression in cold exposed rats promoted no changes in food intake and body temperature. However, MCH inhibition led to a significant drop in body weight, which was accompanied by decreased liver glycogen and epididymal fat, increased relative body fat, increased absolute and relative interscapular brown adipose tissue mass, increased uncoupling protein 1 expression in brown adipose tissue and increased consumption of lean body mass. Thus, increased hypothalamic MCH expression in rats exposed to cold may participate in the process that allows for efficient use of energy to heat production during thermogenic adaptation to cold. In the second part of this work the effect of intracerebro ventricular infusion of MCH and antisense oligonucleotide to MCH was evaluated upon peripheral glucose homeostasis, insulin action and key steps of the insulin signal transduction pathway in liver, skeletal muscle, white and brown adipose tissues in rats maintained in thermoneutrality. MCH but not antisense oligonucleotide MCH treatment led to significant increase of glucose levels during a glucose tolerance test, no changes in insulin levels were detected. MCH treatment promoted a significant reduction of Akt serine phosphorylation in skeletal muscle and reduction of ERK tyrosine phosphorylation in white adipose tissue. On the other hand, antisense oligonucleotide MCH treatment promoted

increased ERK tyrosine phosphorylation in brown adipose tissue. Thus, the present study provides evidence that MCH participates in the central control of energy expenditure and potentially affects insulin action in peripheral tissues. This data supports the role of MCH as a candidate target for therapy in obesity and diabetes mellitus.

1-INTRODUÇÃO

Obesidade e diabetes mellitus estão entre os mais importantes problemas de saúde pública na atualidade (KOPELMAN, 2000). Conforme dados obtidos em recentes levantamentos epidemiológicos, há elevada prevalência destas doenças em várias regiões do planeta (DEITEL, 2002; KOPELMAN, 2000). Estima-se que perto de 1 bilhão de adultos em todo o mundo apresentem obesidade ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) ou sobrepeso (IMC entre 25 e 30 kg/m^2), o que equivale a aproximadamente 28 % da população mundial (KOPELMAN, 2000).

Na América do Norte, cerca de 23 % dos americanos e 15 % dos canadenses em idade adulta são obesos, enquanto, respectivamente, 55 e 48 % apresentam sobrepeso, números que vêm sofrendo incremento ao longo das últimas décadas não somente entre os países com economias de mercado estabelecidas, como também em países da Ásia, África e América Latina (DEITEL, 2002). Desta forma, calcula-se que no Brasil, mantendo-se o atual cenário, obesidade possa se manifestar em aproximadamente 30 % da população até o ano de 2020 (KOPELMAN, 2000).

A obesidade constitui importante fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças também altamente prevalentes na sociedade moderna tais como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, doença arterial coronariana, colecistopatia calculosa crônica, dislipidemias, certos tipos de câncer, doenças osteoarticulares e distúrbios circulatórios, entre outras (JUNG, 1997; KOPELMAN, 2000; WILLETT *et al.*, 1999).

Por sua associação a vários distúrbios clínicos, os quais pioram a qualidade e reduzem a expectativa de vida do paciente, a obesidade custa caro ao sistema de saúde (KOPELMAN, 2000). Somente nos Estados Unidos, estima-se um gasto anual de 69 bilhões de dólares envolvendo custos com a assistência médica e custos indiretos (aposentadoria precoce e pensões por invalidez) (JUNG, 1997).

A perda do controle coordenado entre ingestão alimentar e gasto energético parece representar mecanismo central no desenvolvimento da obesidade (SPIEGELMAN e FLIER, 2001). Tal fenômeno sofre influência de uma complexa combinação de fatores como susceptibilidade genética, oferta indiscriminada de alimentos com alto teor calórico, e níveis reduzidos de atividade física. Entretanto, apesar da inquestionável importância dos fatores genéticos na etiopatogenia da obesidade, o rápido ritmo de crescimento na

prevalência da doença sugere que fatores ambientais e comportamentais desempenhem papel não menos importante.

Neste contexto, diversas abordagens terapêuticas envolvendo controle nutricional, atividade física, fármacos ou mesmo cirurgias têm sido empregadas, sem que se obtenha o êxito desejado. Desta forma, a busca por novos alvos terapêuticos para ação de fármacos de potencial uso no controle e tratamento da obesidade tornou-se fundamental para a criação de medidas terapêuticas mais eficazes.

Com base nos conceitos expostos acima, e considerando-se relatos de que a obesidade em mamíferos ocorre quando a ingestão calórica excede ao gasto energético (FLIER e MARATOS-FLIER, 1998), vários grupos têm optado por abordagens que visam identificar vias neurais que participam do controle da ingestão alimentar e do gasto energético, algumas das quais descrevendo o envolvimento de vários peptídeos hipotalâmicos sobre o estímulo ou inibição da alimentação (BERTHOUD, 2002; BERTHOUD, 2003; BESSESEN, 2003; DRUCE e BLOOM, 2003).

A homeostase entre ingestão e gasto calórico, bem como sua interferência sobre o peso corpóreo, dependem de uma complexa relação entre disponibilidade de alimentos, hábitos alimentares, níveis de atividade física, termogênese, e níveis sanguíneos e hipotalâmicos de hormônios e substratos envolvidos no gasto e armazenamento de energia. O isolamento e a caracterização do hormônio leptina, peptídeo de 16-kDa produzido pelas células do tecido adiposo branco, nos trouxeram recentes avanços na compreensão dos mecanismos de controle do peso e estoque de energia (ZHANG *et al.*, 1994). Em condições fisiológicas, a expressão e secreção de leptina são tanto maiores quanto maior for o percentual de tecido adiposo no organismo em questão. Entretanto, esta secreção não parece ser contínua e estável, sendo a mesma regulada pela ingestão alimentar, jejum prolongado, níveis de atividade física, temperatura corporal e níveis circulatórios de alguns hormônios e substratos (FRIEDMAN e HALAAS, 1998).

Dentre os hormônios e substratos que modulam a secreção de leptina, a insulina e a glicose parecem desempenhar um papel importante, uma vez que a insulina exerce, *in vivo*, uma ação estimulante sobre a secreção de leptina, embora o mecanismo pelo qual a insulina modula a produção de leptina não seja completamente conhecido.

Além disso, estudos utilizando clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico e hiperinsulinêmico-hipoglicêmico ou hiperglicêmico mostram que períodos prolongados de hiperinsulinemia resultam em elevação gradativa e considerável dos níveis circulantes de leptina, desde que os níveis de glicose sejam mantidos dentro da faixa de normalidade (BODEN *et al.*, 1997; KOOPMANS *et al.*, 1998; SCHMITZ *et al.*, 1997), visto que a hipoglicemia retarda e atenua a hiperleptinemia (SCHMITZ *et al.*, 1997) enquanto a hiperglicemia não altera a leptinemia (BODEN *et al.*, 1997).

Do ponto de vista funcional, a insulina estimula o armazenamento de substratos nos adipócitos, o que por sua vez leva a um aumento na expressão e secreção de leptina por estas células. A leptina agindo no hipotálamo aumenta a termogênese e inibe o apetite. Por outro lado, agindo na ilhota pancreática reduz a secreção de insulina. Desta forma, insulina e leptina participam de um sistema de controle endócrino, no qual o objetivo principal é manter estoques controlados de energia e regular os níveis circulatórios do principal substrato de uso imediato, a glicose. Para que ocorra um refinado controle sobre os estoques de energia, outros fatores desempenham papel importante, principalmente o controle sobre o apetite e a regulação do gasto energético através da termogênese (calor dissipado). Sabe-se hoje que, após a ingestão alimentar, ocorre um aumento nos níveis circulantes de leptina (FRIEDMAN e HALAAS, 1998), provocando um estímulo de saciedade, fazendo com que o animal deixe de procurar alimento. A ativação das vias de sinalização da leptina no hipotálamo também induz um estímulo ao tecido adiposo marrom (BAT), com aumento da expressão da UCP-1 (proteína desacopladora mitocondrial 1) e conseqüente aumento na termogênese (FRIEDMAN e HALAAS, 1998). Os receptores de leptina no hipotálamo foram descritos nos núcleos arqueado (ARC), ventro-medial (VMH), dorso-medial (DMH) e lateral (LH). Estudos recentes demonstram que um estímulo agudo com leptina injetada diretamente no ventrículo lateral leva a uma redução da ingestão alimentar da ordem de 20 a 25 %, entre 2 e 6 h após o tratamento, o que é acompanhado por uma redução de 20 a 50 % dos níveis de RNAm de neuropeptídeo Y (NPY) em ARC, DMH e PVN (núcleo para-ventricular), e por um aumento de 70 % no RNAm de UCP-1 em tecido adiposo marrom (WANG *et al.*, 1997). Além do efeito direto sobre os níveis hipotalâmicos de NPY e sobre a termogênese, a leptina induz ainda um aumento da expressão de hormônio estimulador melanocítico α (α -MSH), o qual sinaliza para o PVN

exercendo um efeito anorexígeno (KIM *et al.*, 2000), ou ainda induz a elevação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o qual também possui efeitos anorexígenos. Outros peptídeos envolvidos no controle da ingestão alimentar também parecem ter, ao menos em parte, sua expressão controlada pela leptina, a exemplo do peptídeo relacionado ao agouti (AGRP), da bombesina, da orexina, do peptídeo regulado pela cocaína e anfetamina (CART) e da colecistoquinina (CCK), os quais podem estar envolvidos no controle central exercido pela leptina sobre alimentação e estoque de energia (FRIEDMAN e HALAAS, 1998).

Estudos sobre regulação hipotalâmica induzida por leptina indicam que, em condições fisiológicas, sempre que ocorre uma elevação dos níveis de leptina, como após ingestão alimentar, observa-se uma subsequente queda dos níveis de NPY em neurônios do ARC e em axônios do PVN e DMH. O resultado desta queda é uma redução do apetite e aumento da termogênese. Portanto, em geral, aumento de apetite relaciona-se com elevação do NPY e redução da termogênese, enquanto que redução do apetite relaciona-se com redução do NPY e aumento de termogênese. Inúmeros autores sugerem que NPY é o mediador entre o sinal trazido da periferia pela leptina e a modulação da ingestão e gasto com termogênese (FRIEDMAN e HALAAS, 1998). Na situação de exposição ao frio, entretanto, parece haver um desacoplamento entre os níveis hipotalâmicos de NPY, o apetite e a indução de termogênese. Quando animais experimentais sofrem exposição à baixa temperatura ambiente (BING *et al.*, 1998), estes apresentam rápida queda dos níveis circulantes de leptina, o que se faz acompanhar por aumento da ingestão de alimento. Entretanto, diferentemente do que ocorre em situações fisiológicas em que a temperatura ambiente é mantida em torno de 22 °C, sob baixa temperatura, o animal aumenta seu apetite e, enquanto houver disponibilidade de alimento, aumentará sua ingestão. Mais surpreendente é que todas estas alterações ocorrem mediante níveis inalterados de NPY (BING *et al.*, 1998).

Como exposto anteriormente, leptina e insulina estimulam vias hipotalâmicas que controlam a ingestão alimentar e a termogênese. Como animais homeotérmicos expostos ao frio são hiperfágicos e mantêm elevada termogênese mesmo sendo hipoleptinêmicos e hipoinsulinêmicos, acreditamos que a completa caracterização da sinalização hipotalâmica destes hormônios, em ratos expostos ao frio, possa contribuir para

compreensão de mecanismos independentes de controle da fome e do controle central do gasto energético.

Acreditamos que estudos em ratos expostos ao frio possibilitem a identificação de proteína (s) hipotalâmica (s) envolvida (s) na aparente dissociação que ocorre entre termogênese e fome mediante exposição à baixa temperatura, bem como a relação da (s) mesma (s) com a secreção e ação periférica da insulina, progredindo, dessa forma, na compreensão dos mecanismos centrais de controle do peso corpóreo e, provavelmente, apontando novo candidato a ser investigado para um papel na fisiopatologia da obesidade e distúrbios afins.

2-OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Avaliar o efeito da exposição ao frio sobre a expressão de proteínas potencialmente envolvidas com o controle da fome e da termogênese em hipotálamo de ratos, através de *cDNA macroarray*;
- Estudar o papel de uma das proteínas reveladas pelo *cDNA macroarray*, sobre a temperatura corpórea, a ingestão de alimentos, a variação de peso corpóreo de ratos e ação molecular da insulina em tecidos periféricos.

***3-MATERIAIS E
MÉTODOS***

3.1-MÉTODOS EMPREGADOS NA CARACTERIZAÇÃO DO MODELO ANIMAL

3.1.1-Animais experimentais

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar-Hannover, com oito semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP (CEMIB), os quais foram alimentados com ração comercial para roedores (Nuvilab CR-1) da Nuvital, oferecida *ad libitum*, assim como água. Os animais foram randomicamente divididos em 2 grupos: exposição à temperatura de 4 °C (T4 °C) em câmara fria por 2 h, 2 dias, 4 dias, 8 dias e 16 dias; e exposição à temperatura ambiente (23 ± 1 °C) por igual período (grupo controle [C]). Ciclos de luz de 12 h foram aplicados a todos os grupos. Foram ainda registrados, diariamente, o peso corporal, a ingestão alimentar e a temperatura retal dos animais, por todo o período do experimento. A ingestão alimentar foi medida através da diferença de peso do alimento oferecido e o alimento restante por gaiola. O peso dos animais foi obtido através de pesagem em balança de precisão e a temperatura retal através de termômetro eletrônico de alta sensibilidade.

Parâmetros bioquímicos e hormonais foram avaliados ao final dos períodos de 2 h, 2 dias, 4 dias, 8 dias e 16 dias de exposição às diferentes temperaturas, conforme os métodos abaixo:

3.1.2-Determinação de glicose

As concentrações da glicose sangüínea foram determinadas segundo o método da glicose oxidase-peroxidase (TRINDER, 1969).

3.1.3-Determinação de ácidos graxos livres (AGL)

Os ácidos graxos livres das amostras de soro foram dosados utilizando-se o kit comercial de ELISA segundo a indicação do fabricante (NEFA C – Wako Chemicals GmbH).

3.1.4-Determinação da insulina

A insulina plasmática das amostras de soro foi avaliada por radioimunoensaio, e a curva padrão determinada com insulina de rato (SCOTT *et al.*, 1981).

3.1.5-Determinação de leptina

A leptina das amostras de soro foi dosada utilizando-se o kit comercial de ELISA segundo a indicação do fabricante (Diagnostic System Laboratories Inc, Webster, Texas, USA).

3.1.6-Determinação de TSH:

O hormônio estimulante da tireóide das amostras de soro foi dosado utilizando-se kit de radioimunoensaio conforme a descrição do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech – BIOTRAK).

3.1.7-Determinação de corticosterona

Os níveis de corticosterona das amostras de soro foram dosados utilizando-se kit de radioimunoensaio conforme a descrição do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech – BIOTRAK).

3.1.8-Determinação de glicogênio

Os níveis de glicogênio das amostras de fígado e músculo gastrocnêmio, digeridas em KOH aquecido, foram precipitados por etanol, hidrolisados com ácido sulfúrico, e a determinação da glicose hidrolisada feita conforme descrito anteriormente (PIMENTA *et al.*, 1989).

3.1.9-Determinação da composição corporal

A composição corpórea foi obtida através de análise das carcaças, conforme descrito por (KUMAR *et al.*, 2002).

3.2-MÉTODOS EMPREGADOS NA CANULAÇÃO E PROTOCOLOS DE INJEÇÕES ICV

3.2.1-Cirurgia Estereotáxica para implante de cânula

Ratos Wistar machos (250-300 g) foram anestesiados através da administração intra-peritoneal de hidrocloreto de quetamina (10 mg/kg), e posicionados no aparelho de estereotaxia para implante de cânula no ventrículo lateral direito, seguindo as coordenadas (ântero-posterior: 0,2 mm; lateral: 1,5 mm e dorso-ventral ao bregma: 4,2 mm) obtidas no Atlas Estereotáxico Paxinos (PAXINOS *et al.*, 1980), conforme descrição prévia (DELLA-ZUANA *et al.*, 2002), após o que tiveram uma semana de recuperação antes de receberem infusões ICV.

3.2.2-Infusão intracerebro-ventricular (ICV) de oligonucleotídeos sense ou antisense para MCH

Após o período de recuperação, os animais foram colocados em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum*, e expostos a 23 ± 1 °C (C) ou a 4 ± 1 °C (T4 °C) por 4 dias. Os animais em cada situação experimental receberam 2- μ l (2nmoles/ μ l) ICV de oligonucleotídeos sense ou antisense para MCH [dissolvidos em tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)], após 24, 48 e 72-h de exposição às diferentes temperaturas. Todas as injeções foram administradas aos animais durante a fase clara do ciclo, com uma seringa Hamilton (50- μ l) acoplada, através de uma cânula plástica, a uma agulha (30-G), confeccionada de modo a ultrapassar o comprimento da cânula metálica cerca de 0,1-0,2 mm. Os ratos foram distribuídos randomicamente em 4 grupos, conforme as condições experimentais: controle sense (CS), controle antisense (CAS), expostos ao frio sense (T4 °C S) e anti-sense (T4 °C AS). Foram ainda registrados, diariamente, o peso corporal, a ingestão alimentar e a temperatura retal dos animais, por todo o período do experimento, conforme descrito no item 3.1.1.

3.2.3-Infusão ICV do hormônio MCH ou oligonucleotídeo antisense para MCH

Após recuperação da cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas individuais e mantidos a 23 ± 1 °C por cinco dias. Os animais em cada situação experimental receberam diariamente 2- μ l de MCH (2,5- μ g), oligonucleotídeo antisense para MCH (4,0-nmoles) ou TE, tal como descrito no item 3.2.2., e foram distribuídos randomicamente em 3 grupos: controle (C), antisense (AS) e MCH (M). Novamente foram registrados, diariamente, o peso corporal, a ingestão alimentar e a temperatura retal dos animais, conforme descrito no item 3.1.1.

Parâmetros bioquímicos e hormonais foram avaliados ao final dos períodos de 4 dias (protocolo de infusões ICV de oligonucleotídeos sense e antisense para MCH) e 5 dias (protocolo de infusões ICV de MCH, oligonucleotídeos antisense para MCH e TE), como anteriormente descrito, quais sejam; determinações de glicose, insulina, corticosterona, glicogênio e composição corporal. Além disso, realizaram-se determinações da gordura visceral e massa tecidual de tecido adiposo marrom (BAT), através de excisão e imediata pesagem, em balança de precisão, da gordura peri-epididimal e do BAT intraescapular, respectivamente.

3.2.4-Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

Ambos os testes foram realizados em animais dos grupos acima conforme descrição prévia (LUDWIG *et al.*, 2001), com a única diferença de que, para o ITT, as amostras sanguíneas foram colhidas antes da injeção de insulina (tempo 0) e 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a mesma.

3.3-MÉTODOS EMPREGADOS NA REALIZAÇÃO DO CDNA MACROARRAY

3.3.1-Obtenção de RNA

Após 4 dias de exposição a 23 ± 1 °C (C) ou a 4 ± 1 °C (T4 °C), os animais de ambos os grupos foram anestesiados para excisão do hipotálamo, que foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido e submetido à extração do RNA total com reagente TRIZOL, conforme recomendações do fabricante (GIBCO BRL- Gaithersburg, MD).

Aliquotas das amostras de RNA total obtidas foram diluídas em água DEPC, incubadas por 10 minutos em 55-60 °C e, posteriormente, quantificadas através de leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm em aparelho GENEQUANT. Conhecidas as concentrações de RNA em cada amostra, estas tiveram seus volumes ajustados para 5 µg/µL e a integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante, para visualização das unidades ribossomais 28 e 18 S, após coloração com brometo de etídeo. Constatada a presença dessas unidades, as amostras de RNA hipotalâmico foram tratadas com enzima DNase I (1U/µL, GIBCO BRL) e, novamente, quantificadas em aparelho GENEQUANT. A técnica de PCR foi utilizada para verificação de contaminação com DNA genômico. RNA total foi utilizado como molde na reação de PCR com *primers* para o gene da β -actina, cujo produto é de 745 pb após 35 ciclos de amplificação.

3.3.2-Síntese da sonda a partir de RNA total

A reação da MMLV transcriptase reversa foi realizada a 50 °C durante 30 minutos em 20,0 µL de uma mistura contendo 5X tampão de reação, 10X dNTP mix, [α -³³P] dATP, 100 mM de DTT, 5,0 µg de RNA total (*pool* de 3 animais), 2,0 µL de CDS Primer Mix, 4,0 µL de MMLV transcriptase reversa e água Milli-Q, para cada condição experimental (exposição ao frio e temperatura ambiente). Após obtenção da sonda de cDNA marcada com ³³P, esta foi purificada em coluna de cromografia e sua radioatividade foi checada através de leitura em contador beta, a partir de amostras contendo 2,0 µL de sonda purificada diluída em 5,0 mL de líquido de cintilação. Foram consideradas ideais para uso, as sondas sintetizadas a partir de RNA total que apresentavam leituras entre 2 e 10 x 10⁶ cpm.

3.3.3-Hibridização

Duas membranas de nylon contendo DNA foram inicialmente umedecidas em água Milli-Q estéril e posteriormente transferidas para frascos de vidro, onde seria realizada a hibridação. A seguir, foi adicionado, a cada frasco, 5,0 mL de solução de pré-hibridação (ExpressHyb™ hybridation solution) acrescida de 0,5 mg de DNA de esperma de salmão, a qual ficou em contato com a membrana por 30 min a 68 °C, sob agitação constante. A

solução de pré-hibridação foi removida e a solução de hibridação contendo a sonda marcada foi adicionada. As membranas permaneceram em incubação durante 12-14 horas a 68 °C, sob agitação contínua. Após remoção da solução de hibridação, as membranas foram lavadas 4 vezes com 200 mL de solução I (2X SSC, 1% SDS), 1 vez com 200 mL solução II (0,1X SSC, 0,5% SDS) durante 30 minutos a 68 °C. Nova lavagem com 200 mL de solução 2X SSC foi realizada durante 5 minutos em temperatura ambiente, após o que as membranas umedecidas foram retiradas dos frascos, envolvidas em plástico *magipack* e expostas diretamente em cassetes, onde permaneceram por cerca de 72 horas, para sensibilização do filme.

3.3.4-Detecção e análise das imagens

Os cassetes contendo as membranas foram analisados usando o sistema Storm 840 (Amersham Pharmacia Biotech) em *storage phosphor mode*. Os sinais de hibridação de cada gene foram normalizados em relação a genes de padrão interno utilizados como controle positivo, a intensidade dos mesmos foi quantificada através do Array Vision *software* e a identificação dos genes diferencialmente expressos obtida pela utilização do programa Microsoft™ Excel 97. Como resultado final foram selecionados somente os genes cujos sinais, mediante exposição ao frio, estivessem aumentados ou diminuídos pelo menos duas vezes em relação ao grupo controle.

3.4-ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MCH POR RT-PCR

Após preparação do RNA tal como descrito no item 3.1, cerca de 7 µg de cada RNA extraído de hipotálamo de ratos (C e T4 °C) foram submetidos à reação de transcrição reversa utilizando oligoDT *primers*. Para isto, foi adicionado em cada amostra tampão da enzima, DTT (100 mM), dNTP mix (10mM) e a enzima SuperScript II (200U - Invitrogen), e incubadas por 50 min a 42 °C para a reação, utilizando aparelho PTC -100 (MJ Research, Inc, Watertown, Mass). Todo o procedimento foi realizado sob condições estéreis e livres de RNases. A partir dos cDNAs obtidos foram realizadas as curvas de ciclos para os *primers* do MCH (sense 5'-TAC GGA GCA GCA AAC A-3' e antisense 5'-ACA GCC AGA CTG AGG G-3') e da β-actina (sense 5'-ACC ACA GCT GAG AGG GAA ATC

G-3' e antisense 5'-CAG TCC GCC TAG AAG CAT TTG C-3'), com o mínimo de 5 pontos para cada curva. Após obtenção das curvas os experimentos foram realizados com um número de ciclos equivalente a 20 % abaixo do ponto de saturação da reação (platô). Para estabelecer o ponto ótimo de amplificação na fase exponencial da curva de amplificação, amostras de cDNA do mesmo animal foram utilizadas para uma reação de amplificação, sendo utilizado tubos em duplicata que foram retirados da reação de amplificação a cada um ou dois ciclos, iniciando no ciclo 16 e terminando no ciclo 32. As condições de amplificação foram de 94 °C/5 minutos (denaturação inicial), 94 °C/1 minuto (denaturação), 50 e 57 °C/50 segundos (anelamento dos *primers* para MCH e β -actina, respectivamente), 72°C/1 minuto (extensão) e 72°C/7 minutos (extensão final). O produto final da reação de amplificação foi submetido à eletroforese em gel 1,5 % de agarose, corado posteriormente com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta através do aparelho TFX 35M UV Transluminator (Life Technologies, Inc, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). As intensidades das bandas foram quantificadas em relação a β -actina (padrão interno), através de densitometria digital (Scion Image software, ScionCorp), e os resultados expressos pela razão MCH/ β -actina $\pm$ sem, em unidades arbitrárias.

3.5-CALORIMETRIA INDIRETA

Após jejum prévio de 14 horas, os animais pertencentes aos grupos (CS), (CAS), (T4°C S) e (T4 °C AS) foram colocados individualmente em câmaras respiratórias de PVC (volume = 4 L), mantidas em gabinete com temperatura controlada. O ar foi direcionado a uma coluna contendo ascarite e gel sílica para remover o CO₂ e H₂O antes de chegar a um distribuidor com múltiplas saídas, o qual dividiu o fluxo total em quatro canais. Cada canal foi regulado para um fluxo de 1500 e 2500 mL/min de ar, dependendo da temperatura experimental. O fluxo constante foi checado periodicamente por fluxímetro modelo Cole-Palmer para detecção de oscilação menor que 1 % durante o experimento. Cada um dos 4 canais de fluxo alimentava um respirômetro, um dos quais não continha animal e foi usado como referência basal. O fluxo de ar de cada respirômetro foi direcionado para um multiplexer controlado por computador, onde quatro válvulas solenóides o direcionavam para um fluxímetro de massa (Sierra - modelo 840) controlado

por computador. O fluxímetro de massa foi ajustado para liberar um fluxo constante de 300 mL/min de ar, seguido de retirada da umidade do ar para análise de CO₂ (CA-2A, Sable System), novamente retirada da umidade e do CO₂ do ar total e finalmente análise de O₂ (CA-2A, Sable System). Uma interface do computador com um conversor A/D (UI-2, Sable System), controlado por um software de coleção de dados (Datacan V. 5, Sable System) regulou qual fluxo de gás deveria ser direcionado para o circuito de analisador de gás, controlou o fluxímetro de massa, leu e armazenou os resultados dos gases analisados. Para controlar resultados apropriados selecionados com o programa Datacan, coletaram-se continuamente e seqüencialmente amostras de ar de cada respirômetro. Amostras da câmara basal foram coletadas 10 minutos antes e depois das câmaras que continham animais. Durante 20 minutos, as câmaras contendo ratos foram avaliadas. Desse modo, o registro completo desse procedimento durou 80 minutos e esta seqüência foi repetida seis vezes durante o dia, totalizando 480 minutos, iniciando em torno de 10:00 h e finalizando por volta da 18:00 h. Plotaram-se VO₂ e VCO₂ em diferentes intervalos (5, 10 e 20 minutos) e decidiu-se pela sessão abaixo dos 10 minutos, utilizando-se uma média desses valores para calcular o VO₂ e VCO₂ para determinado animal em cada condição experimental. O VO₂ e o VCO₂ foram calculados pelo programa Datacan baseado na equação de Withers (WITHERS, 1977) e foram expressos como mL.h⁻¹.g⁻¹. Os animais foram pesados imediatamente antes e após as medidas metabólicas ($\pm 0,1$ g) e a média destas duas pesagens foi usada como valor da massa corporal nos cálculos. O quociente respiratório (QR) foi calculado como VCO₂/VO₂.

3.6-ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOT* E *DOT-BLOT*.

3.6.1-Análises envolvendo protocolos de exposição ao frio

A expressão de UCP-1 em BAT de animais submetidos ao protocolo de infusões ICV por 4 dias, pertencentes aos grupos (CS), (CAS), (T4 °C S), (T4 °C AS), controle sem oligonucleotídeo (CSO) e exposto ao frio sem oligonucleotídeo (T4 °C SO), foi analisada por *Western blot* conforme métodos previamente descritos (ARAUJO et al., 2002; LUCIANO et al., 2002), utilizando anticorpo policlonal específico para UCP-1. A intensidade das bandas identificadas nas auto-radiografias correspondentes à expressão de

UCP-1 foi quantificada por densitometria digital (Scion Image software). A expressão hipotalâmica de MCH em ratos expostos ou não ao frio (sem canulação prévia), e em ratos pertencentes aos mesmos grupos submetidos às medidas de UCP-1 acima, foi analisada após prévia purificação do homogenizado protéico utilizando filtros Microcon YN-3 e posterior utilização de *dot-blot*, método específico para detecção de peptídeos previamente descrito (NAGY *et al.*, 2002). O sinal obtido pelas bandas das auto-radiografias foi quantificado tal qual a UCP-1, utilizando-se MCH altamente purificado como controle.

3.6.2-Análises envolvendo protocolos de infusões ICV por 5 dias

Para avaliar a transmissão do sinal de insulina em tecidos periféricos, fragmentos de tecido adiposo branco (WAT) e marrom (BAT), de fígado e de músculo esquelético de ratos submetidos a infusões ICV por 5 dias, pertencentes aos grupos (C), (AS) e (M), foram extraídos em tempos pré-estabelecidos após injeção de salina ou insulina através da veia cava. Estes fragmentos foram homogeneizados em tampão de imunoprecipitação (1 % de Triton X 100, 100 mM de Tris [pH 7,4], 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C), centrifugados a 11.000 rpm por 20 min (4 °C) e os sobrenadantes submetidos à dosagem de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Após normalização protéica, os sobrenadantes foram solubilizados em tampão de Laemmli (100 mmol/L de DTT) (LAEMMLI, 1970; VELLOSO *et al.*, 1996) e então submetidos a *Western blot*, tal como descrito anteriormente (GASPARETTI *et al.*, 2003), utilizando anticorpos específicos para avaliar as expressões de p-Akt e p-ERK em todos os tecidos, além das expressões de UCP-1 em BAT e UCP-3 em músculo.

3.7-DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS HIPOTALÂMICOS DE MCH POR RIA

Após dissecação do hipotálamo de animais pertencentes aos grupos citados no item 3.6.1., este foi imediatamente homogeneizado em aproximadamente 10 volumes de tampão de extração (100 mM Tris [pH 7.4] contendo 100 mM de pirofosfato de sódio; 100 mM de fluoreto de sódio; 10 mM de ortovanadato de sódio; 2 mM PMSF e 0.1 mg de aprotinina/mL) a 4 °C com “Polytron PTA 20S Generator” (Brinkmann Instruments mode

PT 10/35). Ao homogeneizado foi adicionado 1 % de Triton-X 100, mantendo-se no gelo por 30 min. O extrato foi centrifugado a 11.000 rpm a 4 °C por 20 min para remover material insolúvel, e o sobrenadante submetido à dosagem de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Amostras contendo 2 mg/mL de proteínas foram separadas para avaliar a concentração de MCH utilizando-se kit de radioimunoensaio conforme a descrição do fabricante (Phoenix Pharmaceuticals, Inc) (MONDAL *et al.*, 2002).

3.8-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os resultados dos *blots* foram apresentados como comparação direta das bandas ou *dots* obtidos nas auto-radiografias e quantificados por densitometria. Quando comparados dois grupos, foi utilizado teste *t* de *Student* para dados não pareados. Quando necessário, utilizou-se análise de variância (ANOVA), seguida de análise *post hoc* de significância (Bonferroni). Foi adotado o nível de significância $p < 0,05$.

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

4-RESULTADOS

4.1-CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS, BIOQUÍMICAS E HORMONAIS DE RATOS EXPOSTOS AO FRIO.

A exposição de animais homeotérmicos à baixa temperatura promove várias adaptações fisiológicas que permitem a sobrevivência frente à condição adversa que se impõe. Através de mecanismos centrais comandados pelo hipotálamo, há aumento de ingestão alimentar, acompanhado de perda incipiente de peso e manutenção da temperatura corpórea (BAFFI e PALKOVITS, 2000; CHEN *et al.*, 1998; FERREIRA *et al.*, 1999; MELNYK e HIMMS-HAGEN, 1998; YAHATA e KUROSHIMA, 1989). Ocorrem ainda modificações hormonais, com redução de níveis circulatórios de insulina e leptina e resistência tecido-específica à ação do hormônio pancreático (GASPARETTI *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos com a caracterização do modelo experimental empregado neste estudo encontram-se resumidos nas Tabelas 1 e 2 e Figuras 1, 2 e 3, os quais, tomados em conjunto, se equivalem a resultados obtidos em outros modelos de exposição ao frio previamente descritos (BAFFI e PALKOVITS, 2000; CHEN *et al.*, 1998; FERREIRA *et al.*, 1999; MELNYK e HIMMS-HAGEN, 1998; YAHATA e KUROSHIMA, 1989), conferindo credibilidade ao modelo experimental aqui empregado e validando a utilização do mesmo no presente trabalho.

Dentre os resultados encontrados, destacamos o aumento na ingestão alimentar dos animais expostos ao frio, ao longo de todo o período experimental, comparada à do grupo controle, atingindo valor aproximadamente 70 % maior ($T4\ ^\circ\text{C} = 33,00 \pm 0,72$ vs. $C = 19,47 \pm 0,49$ g/dia, $p < 0,05$) ao final de 16 dias. Ressalta-se ainda, que embora tenha ocorrido breve (2 horas iniciais) e discreta ($\cong 34,5\ ^\circ\text{C}$) queda na temperatura corpórea mediante exposição ao frio, a mesma foi re-equilibrada e mantida similar à do grupo controle até o 16º dia do período avaliado, não sendo detectada mudança significativa entre os grupos ($T4\ ^\circ\text{C} = 36,11 \pm 0,06$ vs. $C = 36,04 \pm 0,07\ ^\circ\text{C}$) ao final do experimento. Em contrapartida, neste mesmo período, observou-se queda inicial no peso dos animais expostos ao frio, a qual se estabilizou entre o 2º e 4º dias e voltou a se recuperar a partir do 6º dia, porém sem evitar variação negativa no peso corporal cumulativo (-4 ± 2 g), enquanto os animais do grupo controle apresentaram variação positiva em seu peso ($+23 \pm 5$ g).

Durante oito dias de exposição às diferentes temperaturas, os animais T4 °C mantiveram níveis séricos de insulina significativamente menores (2 hs = $0,194 \pm 0,05$; 2 d = $0,253 \pm 0,15$ e 8 d = $1,416 \pm 0,18$ ng/mL) que os animais controles (2 hs = $1,360 \pm 0,31$; 2 d = $0,884 \pm 0,11$ e 8 d = $2,420 \pm 0,12$ ng/mL). Comportamento semelhante foi observado em relação aos níveis séricos de leptina, os quais se mantiveram baixos até o 2º dia de exposição ao frio (T4 °C: 2 hs = $465,06 \pm 120,15$ e 2 d = $711,42 \pm 195,20$ pg/mL; C: 2 hs = $2013,58 \pm 293,25$ e 2 d = $2751,37 \pm 453,98$ pg/mL), não havendo diferença significativa entre os grupos ao final do 8º dia (T4 °C = $2013,60 \pm 252,95$ e C = $2545,42 \pm 292,00$ pg/mL).

Quanto aos níveis séricos de glicose, estes se mostraram mais baixos no período de 2 horas de exposição ao frio (T4 °C = $85,33 \pm 5,08$ e C = $110,42 \pm 5,33$ g/L), após o que se mantiveram estáveis até o 16º dia de experimento. Os níveis de AGL, por sua vez, assim como os níveis de TSH e corticosterona, não foram significativamente diferentes entre os grupos ao longo de todo o período experimental.

Por fim, após oito dias de exposição ao frio, os animais do grupo T4 °C apresentaram maior nível de glicogênio hepático (T4 °C = $17,773 \pm 3,984$ e C = $7,488 \pm 0,531$ mg/100mg), sem diferença significativa quanto ao glicogênio muscular, além de menor teor de gordura corporal (T4 °C = $6,526 \pm 0,536$ e C = $12,354 \pm 0,933$ % de peso da carcaça) e maior teor de massa isenta de gordura (T4 °C = $93,474 \pm 0,536$ e C = $87,645 \pm 0,932$ % de peso da carcaça) quando comparados aos animais controles.

Tabela 1-Characterização do modelo animal

Parâmetros	Controle	T +4 °C
Ingestão Alimentar (g/dia)	19,47±0,49	33,00±0,72 *
Temperatura (°C)	36,04±0,07	36,11±0,06
Glicose (mg/dL)	91,06±0,35	92,29±0,31
Insulina (ng/mL)	2,420±0,12	1,416±0,18 *
Leptina (pg/mL)	2545,42±292,00	2013,60±252,95
TSH (ng/mL)	13,27±1,31	13,32±1,53
Corticosterona (ng/mL)	102,43±15,57	112,91±12,35
Glicogênio Muscular (mg/100mg)	0,558±0,084	0,553±0,103
Glicogênio Hepático (mg/100mg)	7,488±0,531	17,773±3,984 *
Gordura Corporal (% de peso da carcaça)	12,354±0,933	6,526±0,536 *

*p<0.05 vs. Controle

Tabela 2-Varição cumulativa do peso corporal (g).

	Média de peso no dia 0 (g)	Dia 1	Dia 4	Dia 8	Dia 16
Controle	218±7	+2±1	+4±1	+7±2	+23±5
T +4 °C	222±8	-10±2*	-13±3*	-9±3*	-4±2*

*p<0.05 vs. Controle

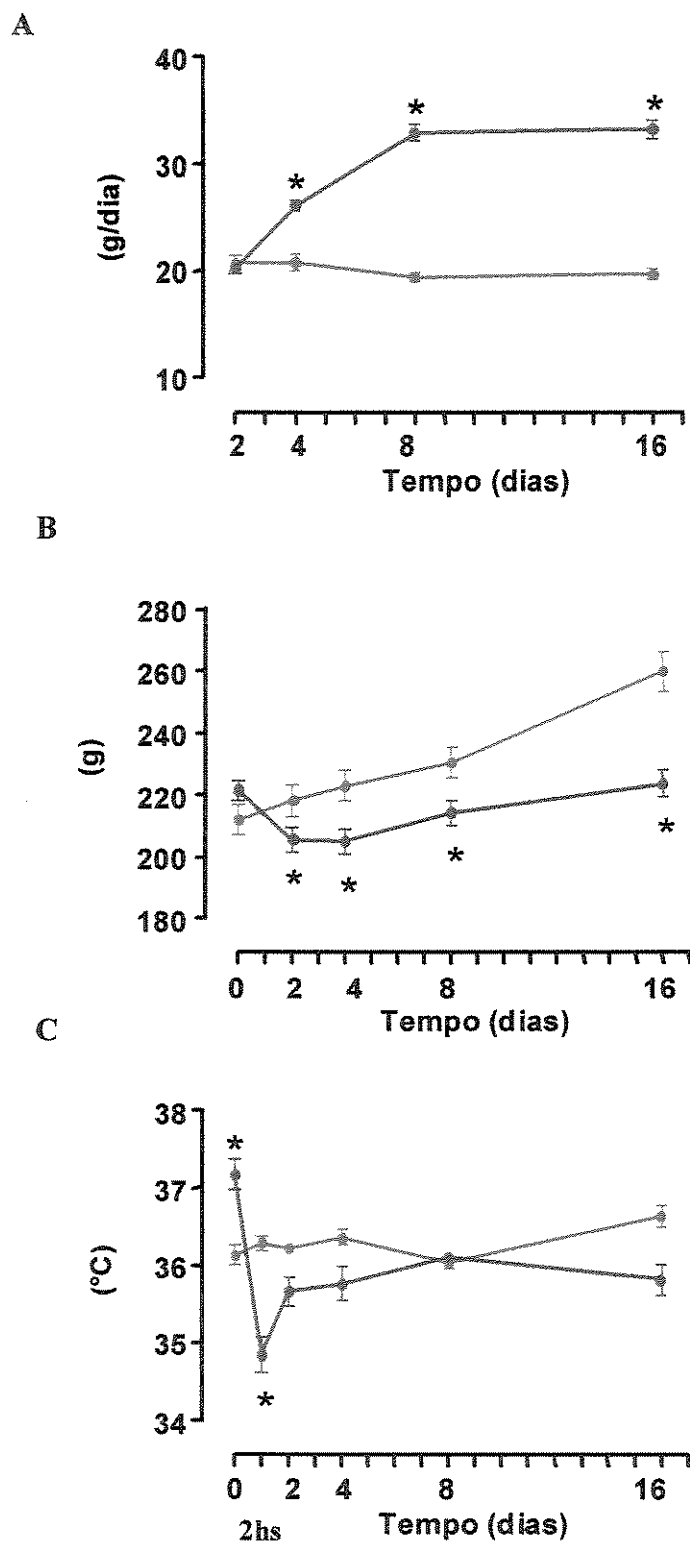
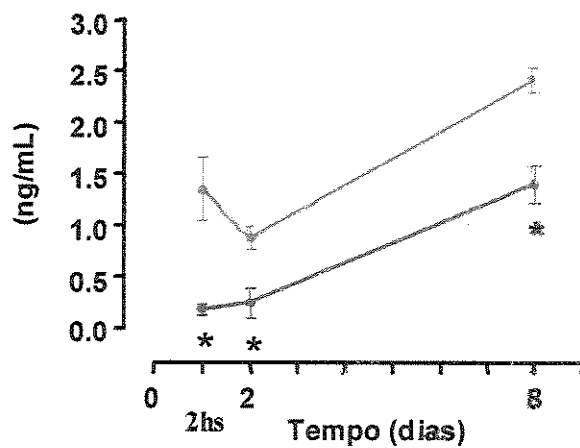
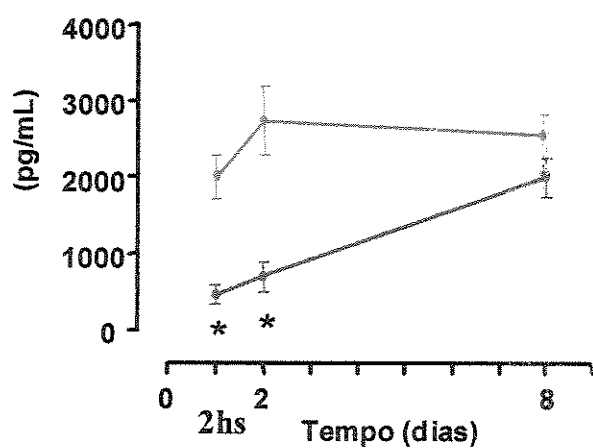


Figura 1-Avaliação da ingestão alimentar (A), peso corporal (B) e temperatura retal (C) de animais expostos ao frio (círculos vermelhos) ou temperatura ambiente (círculos azuis). Para todos os experimentos $n = 8$ a 12 e $*p < 0,05$.

A



B



C

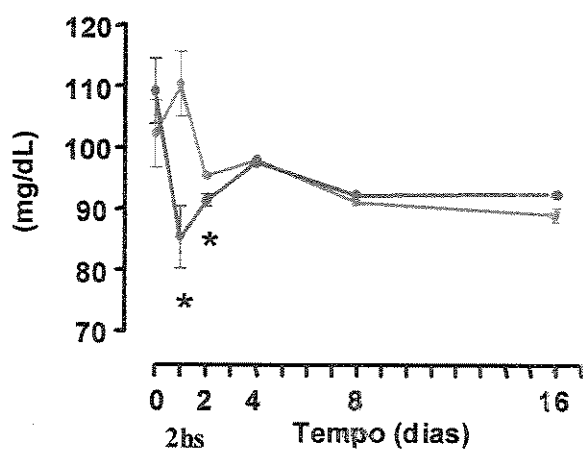


Figura 2-Avaliação dos níveis séricos de insulina (A), leptina (B) e glicose (C) de animais expostos ao frio (círculos vermelhos) ou temperatura ambiente (círculos azuis). Para todos os experimentos $n = 8$ a 12 e $*p < 0,05$.

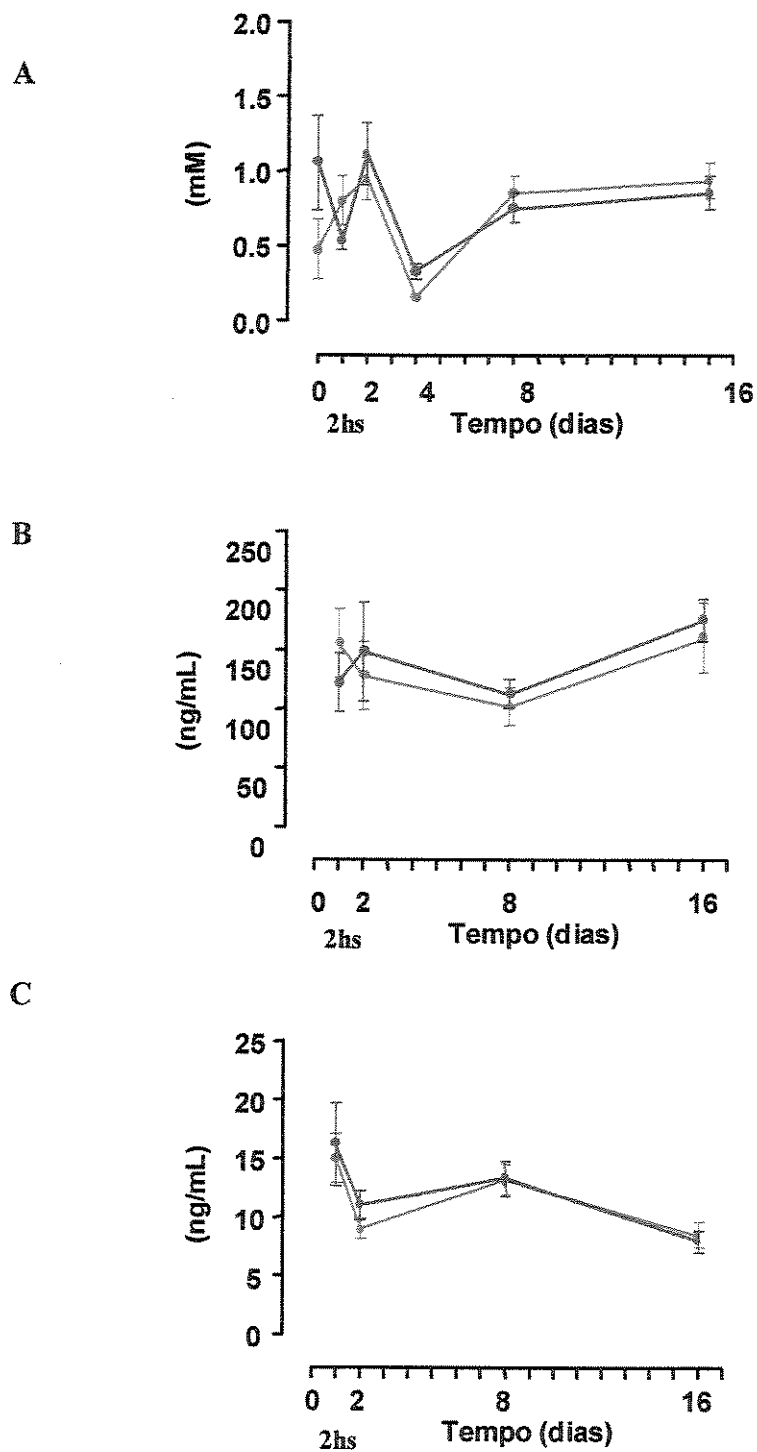


Figura 3-Avaliação dos níveis séricos de AGL (A), corticosterona (B) e TSH (C) de animais expostos ao frio (círculos vermelhos) ou temperatura ambiente (círculos azuis). Para todos os experimentos n = 8 a 12.

4.2-ANÁLISE POR CDNA MACROARRAY

Na tentativa de se detectar alterações na expressão gênica de proteínas potencialmente envolvidas no processo de controle do peso corpóreo, a partir de sua relação com a ingestão alimentar, dispêndio de energia (termogênese) e/ou ação insulínica, utilizou-se a técnica de *cDNA macroarray*, em que RNAm do hipotálamo de ratos expostos ao frio ou de controles mantidos em temperatura ambiente foi convertido em cDNA e marcado com [α -³³P] dATP, e em seguida submetido a hibridação contra membranas de nylon contendo seqüências de 1176 diferentes genes de rato. Após normalização em relação a genes de padrão interno, utilizados como controle positivo, a intensidade dos sinais de hibridação foi quantificada, e para minimizar padrões de expressão específicos para cada animal, foram combinadas quantidades iguais de RNA proveniente de 3 diferentes animais e analisados seis independentes sinais de hibridação de três diferentes *arrays* para cada condição experimental. A Tabela 3 descreve as 56 diferentes especificidades de RNAm (correspondendo a diferentes proteínas) que foram significativamente moduladas, positiva ou negativamente, após exposição ao frio.

4.3-SELEÇÃO DO MCH ENTRE OS GENES MODULADOS PELA EXPOSIÇÃO AO FRIO E CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS DO CDNA MACROARRAY

Dentre os genes que tiveram sua expressão modulada pela exposição ao frio (neurotransmissores, receptores de membrana, proteínas envolvidas com transcrição e tradução, canais iônicos de membrana e outros), alguns dos quais provavelmente importantes na manutenção da homeostase energética, foi selecionado o neurotransmissor MCH (hormônio concentrador de melanina), expresso em neurônios da área hipotalâmica

Tabela 3-Resultados do cDNA macroarray

RNAs mensageiros com expressão hipotalâmica aumentada pela exposição ao frio	
•	40S ribosomal protein S12 (RPS12)
•	60S ribosomal protein L21 (RPL21)
•	Acetylcholine receptor , nicotinic, alpha 4
•	Adenomatous polyposis coli protein (APC)
•	ADP-ribosylation factor 3 (ARF3)
•	A-RAF proto-oncogene
•	Calbindin D28; avian-type vitamin D-dependent; calcium-binding protein (CABP); spot 35 protein; CALB1
•	Carboxypeptidase E (CPE); CPH
•	Cathepsin L
•	Chymotrypsinogen B
•	Colipase (CLPS)
•	Dipeptidylpeptidase 6 (DPP6)
•	Elastase 2
•	Growth-accentuating protein 43 (GAP43); neuromodulin
•	Guanine nucleotide-binding protein G(I) alpha 1 subunit (GNAI1); BPGTPB
•	Guanine nucleotide-binding protein G(O) alpha subunit (GNAO; GNA0)
•	Guanine nucleotide-binding regulatory, alpha subunit
•	Heat shock 90-kDa protein beta (HSP90-beta); HSP84; HSPCB
•	Mak; male germ cell-associated kinase; highly expressed at and after meiosis
•	Melanin-concentrating hormone (PMCH; MCH)
•	Mitochondrial ATP synthase beta subunit (ATP5B)
•	Mitogen-activated protein kinase 2 (MAP kinase 2; MAPK2; PRKM2); MAPK1; extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2); ERK1
•	Muscle phosphofructokinase (PFKM)
•	Myelin basic protein (MBP)
•	Myelin proteolipid protein (PLP); lipophilin; DM20
•	Neuronal acetylcholine receptor protein beta 2 subunit (NACHRB2); cholinergic receptor nicotinic beta polipeptide 2 (CHRN2B)
•	N-methyl-D-aspartate receptor subtype 2B (NMDAR2B; NR2B); glutamate receptor subunit epsilon 2B (GRIN2B)
•	Non-muscle cofilin (CFL1)
•	Non-processed neurexin II beta major; non-processed neurexin II alpha
•	Nucleoside diphosphate kinase A (NDP kinase A; NDKA); tumor metastatic process-associated protein; metastasis inhibition factor NM23; NME1
•	Pancreatic cholesterol esterase (CHOLE); bile salt-activated lipase (BAL); bile salt-stimulated lipase (BSSL); carboxyl ester lipase; steroid esterase
•	pancreatic lysophospholipase
•	Pancreatic Triacylglycerol lipase
•	Pheochromocytoma-derived protein tyrosine phosphatase-like protein
•	Potassium channel RCK4, subunit, putative
•	Potassium voltage-gated channel shaker-related subfamily member 1 (KV1.1); KCNA1; RBK1
•	Proteasome component C3
•	Protein kinase C beta I (PKC-beta I; PRKCB1; PKCB); PKC-beta II (PRKCB2)
•	Protein kinase C delta type (PKC-delta ; PRKCD)
•	Ribosomal protein L13
•	Secretogranin II (SGII; SCG2); chromogranin C (CHGC)
•	Serine-threonine protein phosphatase 3 catalytic subunit alpha isoform (PPP3CA); PPP2B; calmodulin-dependent calcineurin A alpha (CALNA; CNA1)
•	Sertoli cell cytochrome c oxidase polypeptide I (COX1)
•	Sodium/potassium-transporting ATPase alpha 1 subunit (Na+/K+ ATPase alpha 1)
•	Sodium/potassium-transporting ATPase beta 1 subunit (ATP1B1)
•	Soluble superoxide dismutase 1 (SOD 1)
•	Synaptotagmin XI (SYT11)
•	Syntaxin 1B (STX1B)
•	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2)
•	Tyrosine 3 monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon polypeptide (YWHAE); 14-3-3 protein epsilon; protein kinase inhibitor protein 1 (KCIP1); mitochondrial import stimulation factor L subunit
•	Tyrosine 3 monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide (YWHAZ); 14-3-3 protein zeta/delta; protein kinase inhibitor protein 1 (KCIP1); mitochondrial import stimulation factor S1 subunit
•	Tyrosine 3 monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein eta polypeptide (YWHAH); 14-3-3 protein eta; protein kinase C inhibitor protein 1 (KCIP1)
•	Ubiquitous mitochondrial creatine kinase (U-MTCK; CKMT1); acidic-type mitochondrial creatine kinase (MIA-CK)
RNAs mensageiros com expressão hipotalâmica reduzida pela exposição ao frio	
•	25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP25); super protein (SUP)
•	Brain fatty acid-binding protein (B-FABP); FABP7; brain lipid-binding protein (BLBP)
•	Casein kinase I delta; CKId; 49-kDa isoform
•	Corticotropin-releasing hormone (CRH)

lateral, cuja avaliação por *cDNA macroarray* revelou significativo aumento em sua expressão. De acordo com alguns estudos (QU *et al.*, 1996; SHIMADA *et al.*, 1998), o MCH parece desempenhar importante papel no controle do comportamento alimentar, uma vez que apresenta um potente efeito orexigênico e tem sua expressão suprimida após tratamento com leptina. Portanto, considerando-se estas informações e os resultados obtidos com a caracterização do modelo experimental empregado neste trabalho, optou-se por, inicialmente, confirmar a hiper-expressão do MCH mediante exposição ao frio e, em seguida, avaliar o papel do mesmo neste contexto.

Para confirmar os resultados obtidos pelo *cDNA macroarray*, ratos foram mantidos, em gaiolas individuais, a 23 ou a 4 °C durante 4 dias, após o que tiveram seus hipotálamos removidos para análise protéica ou extração de RNA. A expressão protéica de MCH foi analisada por *dot-blot*, usando anticorpo específico para o mesmo, e por RIA, enquanto os níveis de RNAm foram determinados por RT-PCR, usando *primers* também específicos para o MCH.

Como resultados, observou-se que a exposição ao frio promoveu um aumento de aproximadamente 60 % ($p < 0,05$) na expressão protéica do MCH, tanto por *dot-blot* quanto por RIA (Fig. 4 A), e de aproximadamente 80 % ($p < 0,05$) na expressão de seu RNAm, ratificando, portanto, os resultados obtidos pelo *cDNA macroarray*.

4.4-PAPEL DA HIPER-EXPRESSÃO DE MCH PELA EXPOSIÇÃO AO FRIO SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS

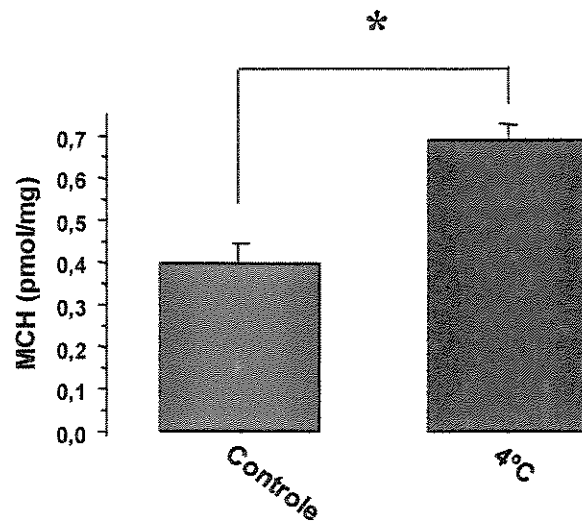
Infusão ICV de MCH ou a sua hiper-expressão hipotalâmica através de metodologia recombinante promovem aumento significativo da ingestão alimentar e ganho de peso corporal (DELLA-ZUANA *et al.*, 2002; LUDWIG *et al.*, 2001). A exposição de animais homeotérmicos a baixas temperaturas promove significativo aumento da ingestão alimentar, conforme observado no modelo experimental empregado neste trabalho, sendo tal fenômeno regulado por eventos hipotalâmicos ainda pouco conhecidos. Para avaliar a participação do MCH no controle da ingestão alimentar, do peso corpóreo e da termogênese em animais expostos ao frio, avaliaram-se ratos mantidos em temperatura ambiente ou expostos ao frio e tratados por via ICV com oligonucleotídeo sense ou antisense para MCH

quanto à variação de alguns parâmetros metabólicos (ingestão alimentar, peso corporal, temperatura retal, e medida indireta do gasto energético) e bioquímicos (avaliação dos teores hepático e muscular de glicogênio, análise da gordura da carcaça e visceral), bem como medidas relativas à função do BAT (expressão de UCP-1 e massa tecidual).

4.4.1-Bloqueio da síntese protéica de MCH por oligonucleotídeo antisense específico

Para avaliar o papel da hiper-expressão hipotalâmica de MCH durante a exposição ao frio, foi realizado bloqueio em sua síntese protéica utilizando oligonucleotídeo antisense fosfotiolado, construído a partir da sequência de RNAm específica para o MCH de ratos, acessado através do GenBank. Três diferentes seqüências de oligonucleotídeos antisense e respectivos oligonucleotídeos sense foram desenhados e injetados ICV por 3 dias (1 dose/dia; 2,0 μ L/dose; 2,0 nmol/ μ L) em animais expostos a 23 °C ou a 4 °C. A expressão de MCH foi avaliada através da análise de extratos protéicos hipotalâmicos por *dot-blot* e RIA. A seqüência 5'-ACA GCC AGA CTG AGG-3' (antisense) foi a que apresentou resultados mais efetivos e reprodutíveis quanto ao bloqueio da expressão do MCH, reduzindo-a em aproximadamente 25 % ($p < 0,05$) nos animais mantidos em temperatura ambiente e 45 % ($p < 0,05$) nos animais expostos ao frio, sendo, portanto, utilizada em todos os demais experimentos paralelamente ao uso de sua respectiva seqüência sense como controle (Fig. 4 B).

A



B

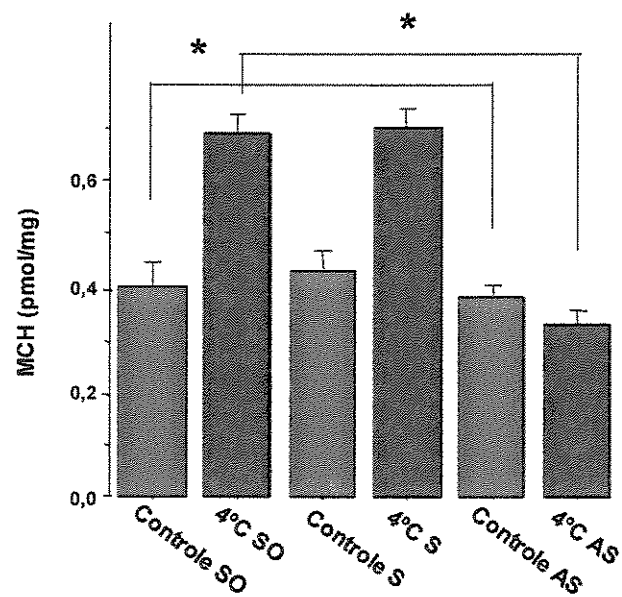


Figura 4-Efeitos da exposição ao frio (A) e do tratamento com oligonucleotídeo antisense (AS) (B) sobre a expressão de MCH em hipotálamo de ratos expostos ao frio (4 °C) ou mantidos em temperatura ambiente (Controle). Em ambos os experimentos n = 4 e *p<0,05.

4.4.2-Efeitos do bloqueio da síntese de MCH sobre a ingestão alimentar, peso e temperatura corporais:

Não se observaram variações significativas na ingestão alimentar e temperatura corporal induzidas pelo bloqueio do MCH, em qualquer temperatura. Por outro lado significativa queda no peso corporal de animais expostos ao frio foi detectada após o bloqueio da síntese de MCH ($\cong 100\%$). Surpreendentemente, mesmo os animais mantidos em temperatura ambiente apresentaram significativa queda no peso corpóreo após o tratamento com oligonucleotídeo antisense para o MCH ($p < 0,05$) (Fig. 5).

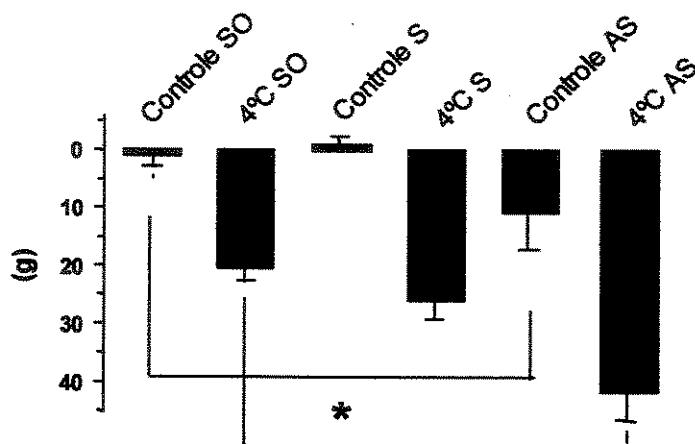


Figura 5-Efeito da inibição da expressão de MCH através do tratamento com oligonucleotídeo antisense (AS) sobre a variação do peso corpóreo de animais expostos ao frio (4 °C) ou mantidos em temperatura ambiente (Controle), onde $n = 4$, * $p < 0,05$ vs. 4 °C SO e # $p < 0,05$ vs. Controle SO.

4.4.3-Efeitos do bloqueio da síntese de MCH sobre o glicogênio muscular e hepático e composição corporal

Uma vez que o bloqueio da síntese hipotalâmica de MCH nos animais expostos ao frio promoveu significativa perda de peso sem maiores variações na ingestão alimentar e temperatura corporal dos mesmos, avaliou-se a quantidade relativa de glicogênio, gordura subcutânea e visceral, além da massa corporal isenta de gordura tanto em animais controles quanto expostos ao frio, durante quatro dias, tratados ou não com oligonucleotídeo antisense para MCH.

A exposição ao frio levou ao aumento no conteúdo de glicogênio hepático ($\cong 400$ %, $p < 0,05$). Entretanto, sob tratamento com oligonucleotídeo antisense para MCH, animais expostos ao frio apresentaram menores níveis de glicogênio hepático ($\cong 120$ %, $p < 0,05$) quando comparados àqueles sem bloqueio, havendo tendência a um mesmo comportamento em relação ao glicogênio muscular ($\cong 20$ %), porém não significativo (Fig. 6).

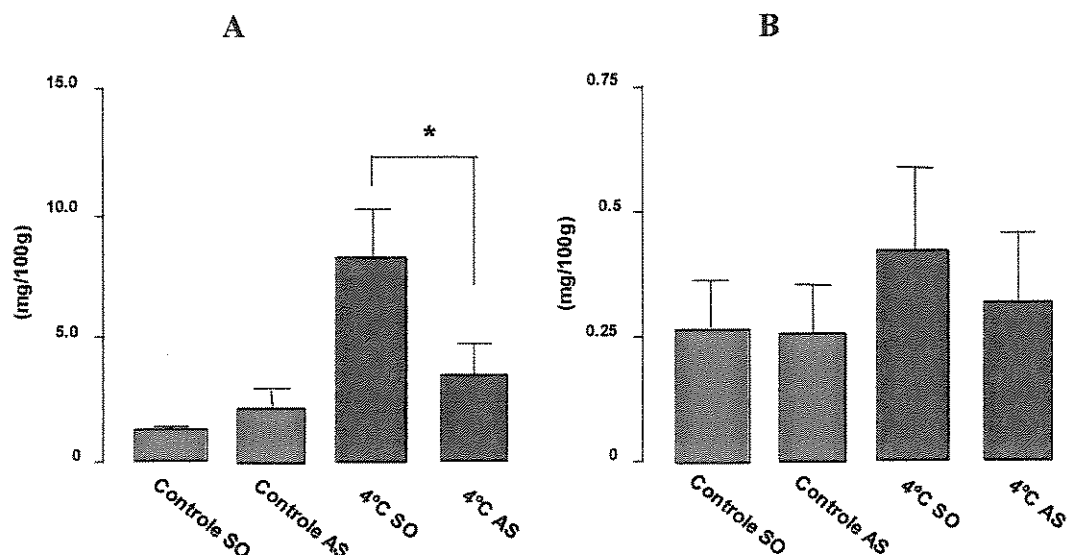


Figura 6-Efeito da inibição da expressão de MCH através do tratamento com oligonucleotídeo antisense (AS) sobre os níveis de glicogênio hepático (A) e muscular (B) de animais expostos ao frio (4 °C) ou mantidos em temperatura ambiente (Controle). Em ambos os experimentos $n = 4$ e $*p < 0,05$.

Os níveis de gordura subcutânea, por sua vez, foram significativamente reduzidos nos animais expostos ao frio ($5,35 \pm 0,93$ %) em comparação aos controles ($13,34 \pm 1,28$ %), não havendo mudanças na massa isenta de gordura. Entretanto, após o tratamento com oligonucleotídeo antisense para MCH, animais mantidos a 4 °C apresentaram maiores quantidades de gordura ($6,84 \pm 1,49$ %, $p < 0,05$) e menor massa isenta de gordura ($p < 0,05$) que aqueles não tratados com oligonucleotídeo antisense (Fig. 7 A e B).

Quanto aos níveis de gordura visceral, tanto a exposição ao frio quanto o tratamento com oligonucleotídeo antisense para MCH promoveram redução da gordura epididimal (Fig. 7 C).

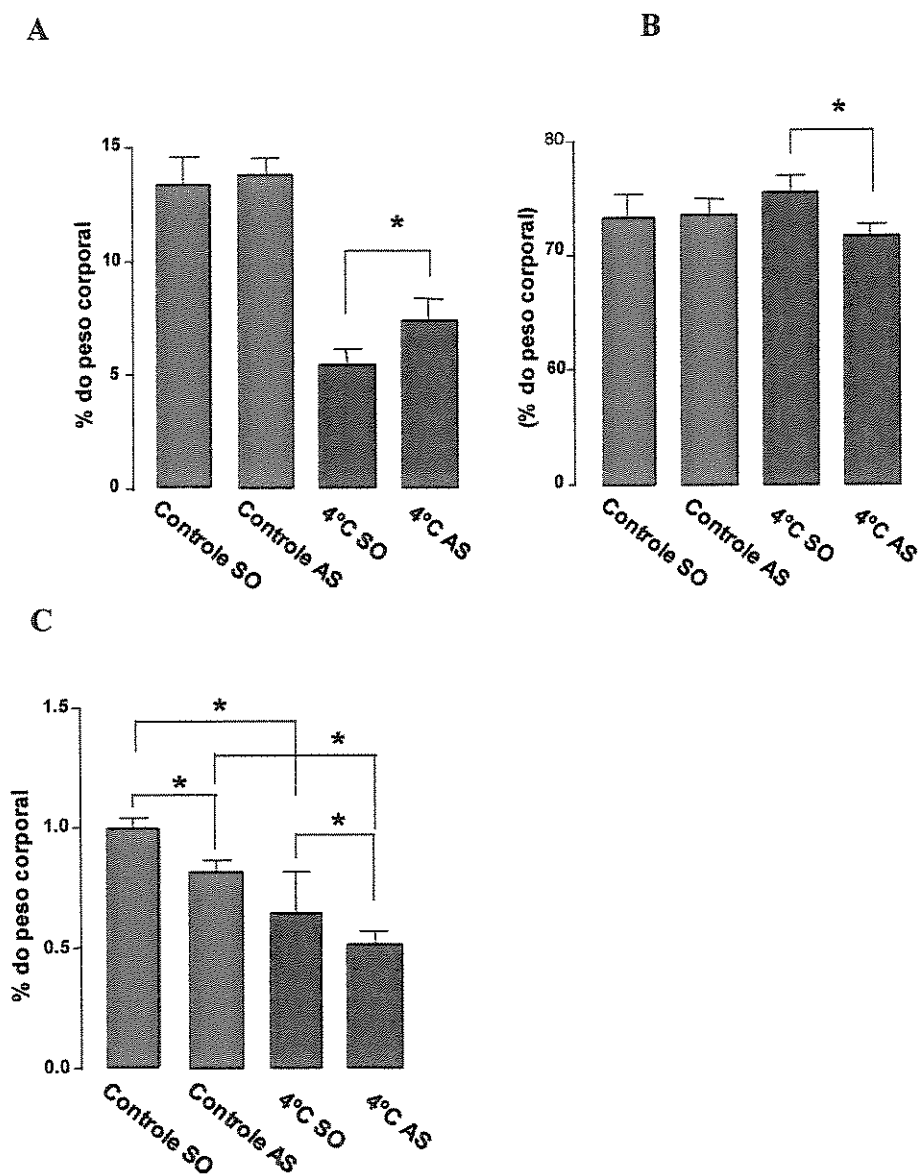


Figura 7-Efeito da inibição da expressão de MCH através do tratamento com oligonucleotídeo antisense (AS) sobre os níveis de gordura corporal (A), massa magra (B) e gordura epididimal (C) de animais expostos ao frio (4 °C) ou mantidos em temperatura ambiente (Controle). Em todos os experimentos n = 4, em A e B *p<0,05 vs. 4 °C SO.

4.4.4-Efeitos do bloqueio da síntese de MCH sobre o consumo de oxigênio, a produção de dióxido de carbono e o QR

Animais expostos ao frio apresentaram consumo de O₂ e produção de CO₂ ($3,24 \pm 0,26$ e $2,50 \pm 0,22$ mL/g·h, respectivamente) significativamente maiores que os animais controles ($1,54 \pm 0,02$ e $1,21 \pm 0,04$ mL/g·h, respectivamente) ($p < 0,05$ para consumo de O₂ e produção de CO₂), enquanto nenhuma variação no QR foi observada entre os grupos ($0,77 \pm 0,01$ vs. $0,78 \pm 0,03$ para animais expostos ao frio e controles, respectivamente). O bloqueio da expressão de MCH pelo tratamento com oligonucleotídeo antisense não promoveu alterações significativas em nenhum desses parâmetros entre os grupos estudados.

4.4.5-Efeitos do bloqueio da síntese de MCH sobre a expressão de UCP-1 no BAT

A sobrevivência de animais homeotérmicos em condições de baixa temperatura depende de mecanismos eficientes que mantenham sua temperatura corporal estável, função esta que, em roedores, é exercida pelo BAT, localizado em maior proporção no espaço interescapular e na região perirenal. Neste tecido, a produção de calor é dependente da expressão de um membro da família das proteínas desacopladoras da mitocôndria (UCPs), especificamente a UCP-1.

Para avaliar a participação do MCH sobre a expressão de UCP-1 induzida pelo frio, análises da expressão de UCP-1 interescapular por *Western blot* foram realizadas em ratos expostos ao frio por quatro dias tratados com oligonucleotídeos antisense para MCH, e comparadas às de seus respectivos controles. A exposição ao frio promoveu um aumento de aproximadamente 30 % ($p < 0,05$) na expressão de UCP-1 no BAT, aumento este intensificado pelo bloqueio do MCH hipotalâmico nesta condição experimental ($p < 0,05$ em relação aos animais não tratados com oligonucleotídeos). Mesmo entre os animais mantidos em temperatura ambiente, o uso de oligonucleotídeo antisense para MCH induziu um aumento na expressão de UCP-1 no BAT, embora não significativa, em comparação aos seus controles (Fig. 8). Por fim, durante este mesmo período, o bloqueio do MCH promoveu aumento significativo no peso relativo do BAT entre os animais expostos ao frio

($0,099 \pm 0,004$ vs. $0,083 \pm 0,003$ % para animais tratados ou não com oligonucleotídeo antisense, respectivamente).

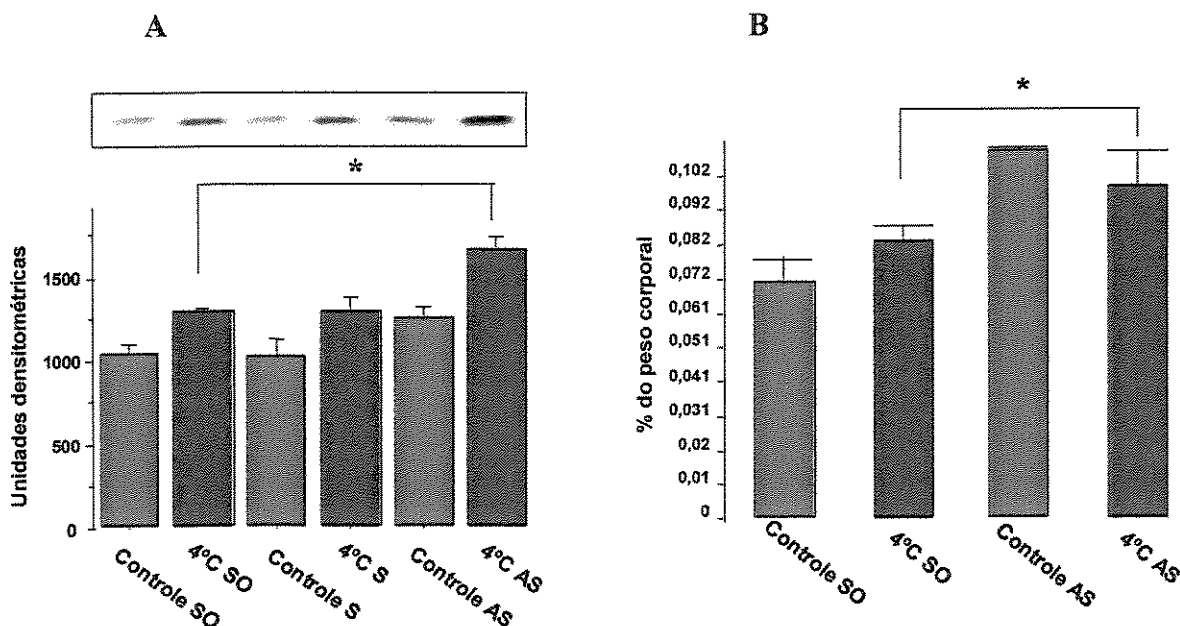


Figura 8-Avaliação da expressão de UCP-1 (A) e da massa tecidual de tecido adiposo marrom (B) em ratos expostos ao frio (4 °C) ou mantidos em temperatura ambiente (Controle), tratados ou não com oligonucleotídeos antisense (AS) para MCH. Em todos os experimentos n = 4 e *p<0,05 vs. 4 °C SO.

4.5-PAPEL DO MCH SOBRE A AÇÃO INSULÍNICA

Uma vez que a exposição ao frio promove regulação tecido-específica nas vias de sinalização da insulina (GASPARETTI *et al.*, 2003) e está associada com a hiper-expressão hipotalâmica do MCH, conforme evidenciado pelo modelo experimental empregado no presente trabalho, passou-se a avaliar o papel do MCH sobre: (1) a secreção de insulina, (2) a sensibilidade de tecidos periféricos à mesma e (3) a transmissão do sinal de insulina em tecidos periféricos de ratos submetidos a infusões ICV do hormônio MCH ou do oligonucleotídeo antisense MCH por 5 dias, durante os quais foram realizadas também medidas da ingestão alimentar e peso corporal, além da mensuração dos níveis basais de glicose, insulina e corticosterona.

4.5.1-Efeitos do tratamento com MCH e do bloqueio da expressão de MCH sobre a ingestão alimentar, peso corporal e níveis séricos basais de glicose e insulina

A ingestão cumulativa ao longo de 5 dias de infusões ICV com MCH ($43,55 \pm 2,25$ g) ou oligonucleotídeo antisense para MCH ($40,81 \pm 7,41$ g) não apresentou diferença significativa em relação aos animais controles ($42,44 \pm 8,16$ g), o mesmo acontecendo em relação à variação do peso corporal. Os níveis basais de glicose foram maiores nos ratos tratados com MCH ($90,75 \pm 2,25$ mg/dL) que nos ratos controle ($80,8 \pm 2,13$ mg/dL) ($p < 0,05$). Entretanto não houve diferença entre a glicose sanguínea do grupo controle e do grupo tratado com oligonucleotídeo antisense MCH ($83,25 \pm 2,93$ mg/dL). Não houve alteração significativa nos níveis de insulina basal quer pelo tratamento com MCH ($0,640 \pm 0,111$ ng/mL) quer pela inibição de sua expressão com oligonucleotídeo antisense MCH ($0,655 \pm 0,346$ ng/mL) em relação ao grupo controle ($0,934 \pm 0,234$ ng/mL).

4.5.2-Efeitos do tratamento com MCH e do bloqueio da expressão de MCH sobre consumo de glicose e secreção de insulina medidos por GTT, e sobre a sensibilidade à insulina medida por ITT

No quarto dia de infusões ICV com MCH, oligonucleotídeo antisense ou TE (animais controles), após 12 horas de jejum prévio, foi avaliada a secreção de insulina durante a realização de um GTT intraperitoneal (i.p. GTT). As concentrações de glicose sérica dos animais que receberam infusões de MCH mantiveram-se sempre mais elevadas que as dos animais tratados com oligonucleotídeo antisense e controles, atingindo um pico máximo de $211,88 \pm 10,02$ mg/dL aos 30 minutos, valor este que foi significativamente superior às concentrações máximas alcançadas pelos animais infundidos com oligonucleotídeo antisense ($146,40 \pm 7,798$ mg/dL, $p < 0,05$) ou TE ($153,09 \pm 14,50$ mg/dL, $p < 0,05$) neste mesmo tempo. Aos 60 minutos do teste, a concentração de glicose dos animais infundidos com MCH ($176,11 \pm 11,53$ mg/dL) permaneceu mais alta que a dos animais controles ($116,66 \pm 8,5$ mg/dL, $p < 0,05$) ou oligonucleotídeo antisense ($143,62 \pm 7,46$ mg/dL, NS), enquanto aos 120 minutos, embora mantida esta tendência, não houve diferença significativa nas concentrações de glicose entre os grupos (Fig. 9 A). Portanto, contrariamente ao que se observa durante a exposição ao frio, situação na qual a

hiper-expressão de MCH no hipotálamo coincide com captação mais eficiente de glicose durante o GTT, o estímulo com MCH exógeno em ratos mantidos em temperatura ambiente promoveu uma mobilização de glicose menos eficiente durante o GTT. Além disso, as maiores concentrações de glicose apresentadas pelos animais tratados com MCH estiveram associadas a níveis de insulina ligeiramente mais baixos, porém não significativos, durante o GTT (Fig.9 B). De acordo com o ITT o tratamento com MCH e o bloqueio da expressão de MCH pelo uso de oligonucleotídeos antisense MCH não promoveram modificação significativa da velocidade de consumo de glicose, de tal forma que o Kitt foi estatisticamente similar nos três grupos testados (Fig. 9 C).

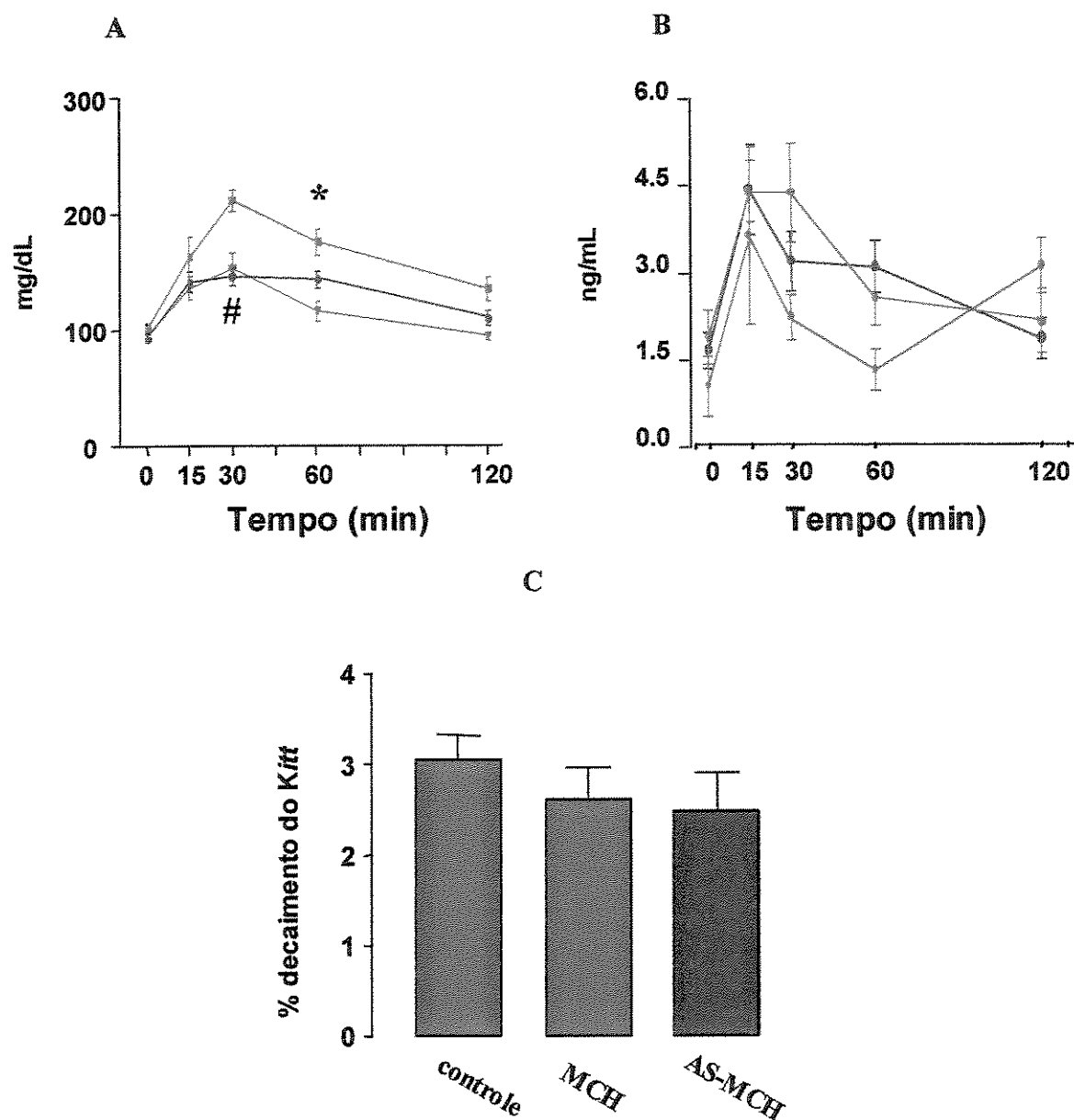


Figura 9-Glicose (A) e insulina (B) durante o GTT, e constante de decaimento da glicose (Kitt) durante o ITT (C) em ratos tratados com veículo [(Controle) em azul], com MCH (em verde) ou com oligonucleotídeos antisense para MCH [(AS-MCH) em vermelho]. Em todos os experimentos $n = 4$. Em A $*p < 0,05$ para MCH vs. Controle e $\#p < 0,05$ para MCH vs. Controle.

4.5.3-Efeitos do tratamento com MCH e do bloqueio da expressão de MCH sobre a transdução do sinal de insulina

O fluxo de glicose para o BAT, o WAT e o músculo esquelético de ratos expostos ao frio encontra-se significativamente aumentado em relação a animais mantidos em temperatura ambiente, enquanto que para o fígado este fluxo se mantém inalterado (GASPARETTI *et al.*, 2003). Por outro lado, no presente trabalho, a hiper-expressão hipotalâmica de MCH resultante da exposição ao frio ocorreu em paralelo ao aumento na expressão de UCP-1 no BAT, intensificada pelo bloqueio na síntese protéica de MCH, bem como a significativa redução da gordura corporal e a elevação do glicogênio hepático, efeitos estes atenuados de maneira significativa pelo tratamento com oligonucleotídeo antisense para MCH. Em razão desses resultados, decidiu-se avaliar etapas intermediárias fundamentais das vias de sinalização da insulina no fígado, músculo esquelético, BAT e WAT, assim como os níveis de UCP-1 e UCP-3 no BAT e músculo esquelético, respectivamente, em animais tratados ICV com doses diárias de MCH, oligonucleotídeo antisense para MCH ou tampão TE, ao longo de 5 dias.

No fígado, a fosforilação em serina 473 da Akt induzida pela insulina, não foi alterada pelos tratamentos com MCH e oligonucleotídeo antisense MCH. Igualmente, a fosforilação em tirosina induzida por insulina das isoformas 42 e 44 kDa da ERK não foi afetada pelos tratamentos com MCH ou antisense MCH (Fig. 10).

Em músculo esquelético o tratamento com MCH promoveu redução significativa da fosforilação em serina 473 da Akt induzida por insulina ao passo que a inibição da expressão de MCH pelo tratamento com oligonucleotídeo antisense levou a um discreto aumento (não significativo) da ativação da Akt. A fosforilação em tirosina induzida por insulina das isoformas de 42 e 44 kDa da ERK não foi afetada pelos tratamentos com MCH ou antisense MCH (Fig. 11).

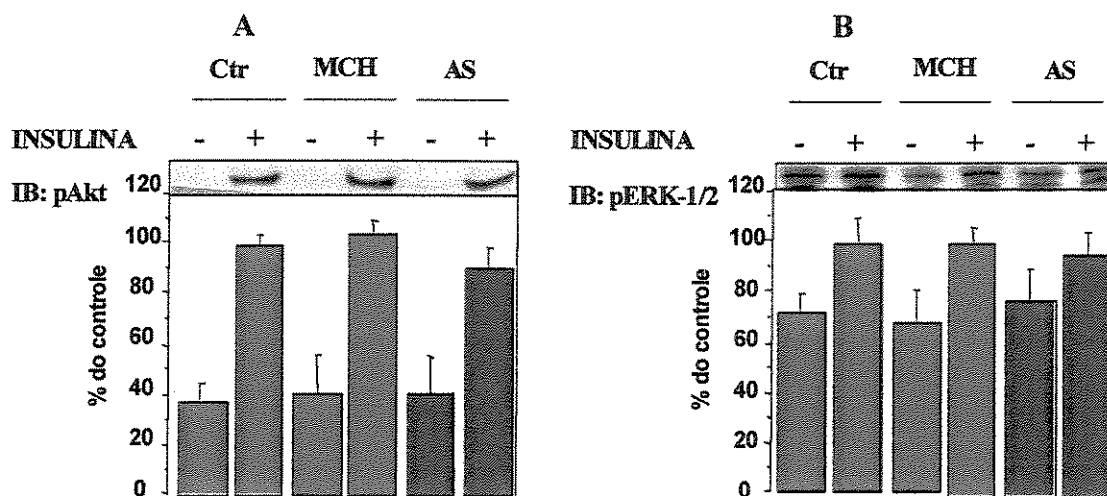


Figura 10-Imunoblot com anticorpos anti-[Ser⁴⁷³]Akt (A) e anti-fosfo-ERK (B), obtidos de fígado de ratos controle (Ctr), tratados com MCH ou com oligonucleotídeo antisense MCH (AS) e estimulados (+) ou não (-) com insulina. Em todas as situações n = 4.

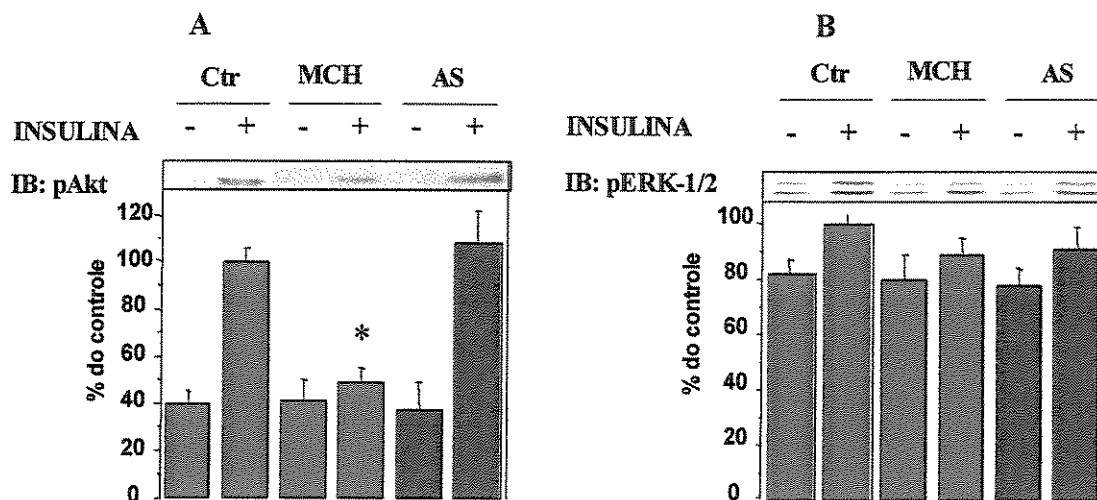


Figura 11-Imunoblot com anticorpos anti-[Ser⁴⁷³]Akt (A) e anti-fosfo-ERK (B), obtidos de músculo esquelético de ratos controle (Ctr), tratados com MCH ou com oligonucleotídeo antisense MCH (AS) e estimulados (+) ou não (-) com insulina. Em todas as situações n = 4, *p<0,05 vs. Ctr+.

Em tecido adiposo branco a fosforilação em serina 473 da Akt induzida por insulina não foi significativamente modulada quer pelo tratamento com MCH quer pela inibição de sua expressão com oligonucleotídeo antisense MCH. Por outro lado, o tratamento com MCH, mas não com oligonucleotídeo antisense MCH promoveu redução significativa da fosforilação em tirosina das isoformas de 42 e 44 kDa da ERK induzida por insulina (Fig. 12).

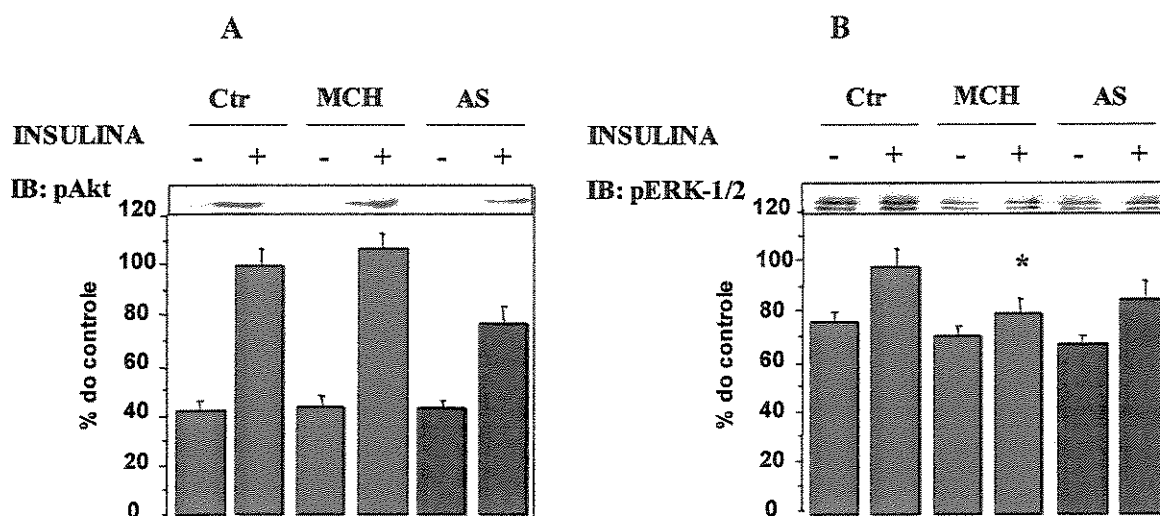


Figura 12-Imunoblot com anticorpos anti-[Ser⁴⁷³]Akt (A) e anti-fosfo-ERK (B), obtidos de tecido adiposo branco de ratos controle (Ctr), tratados com MCH ou com oligonucleotídeo antisense MCH (AS) e estimulados (+) ou não (-) com insulina. Em todas as situações n = 4, *p<0,05 vs. Ctr+.

Em tecido adiposo marrom, a fosforilação em serina 473 da Akt induzida pela insulina não sofreu modulação pelo tratamento com MCH ou pela inibição da expressão do MCH pelo tratamento com oligonucleotídeo antisense MCH. A fosforilação em tirosina das isoformas 42 e 44 kDa da ERK induzida pela insulina não foi alterada pelo tratamento com MCH, mas sofreu discreta elevação pela inibição da expressão de MCH através do tratamento com oligonucleotídeo antisense MCH (Fig. 13).

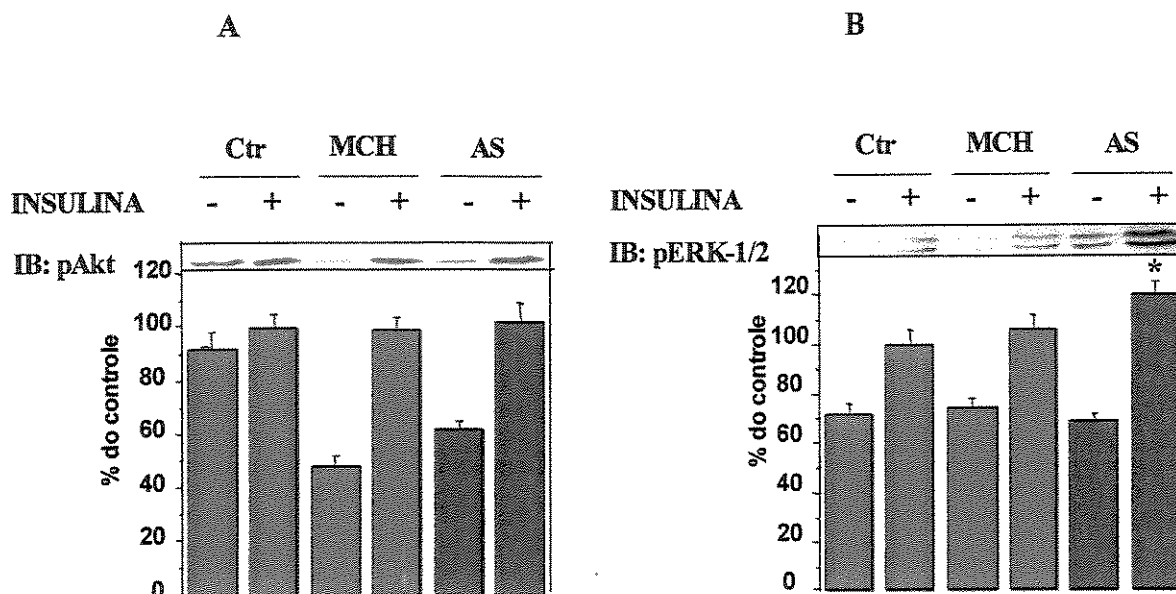


Figura 13-Imunoblot com anticorpos anti-[Ser⁴⁷³]Akt (A) e anti-fosfo-ERK (B), obtidos de extratos totais de tecido adiposo marrom de ratos controle (Ctr), tratados com MCH ou com oligonucleotídeo antisense MCH (AS) e estimulados (+) ou não (-) com insulina. Em todas as situações n = 4, *p<0,05 vs. Ctr+.

Finalmente, o tratamento com MCH e com oligonucleotídeo antisense MCH não promoveu alterações significativas na expressão de UCP-1 em tecido adiposo marrom e de UCP-3 em músculo esquelético. Especificamente em tecido adiposo marrom houve interessante tendência de redução da expressão da UCP-1 pelo MCH e de aumento da expressão desta proteína pela inibição da expressão do MCH (Fig. 14).

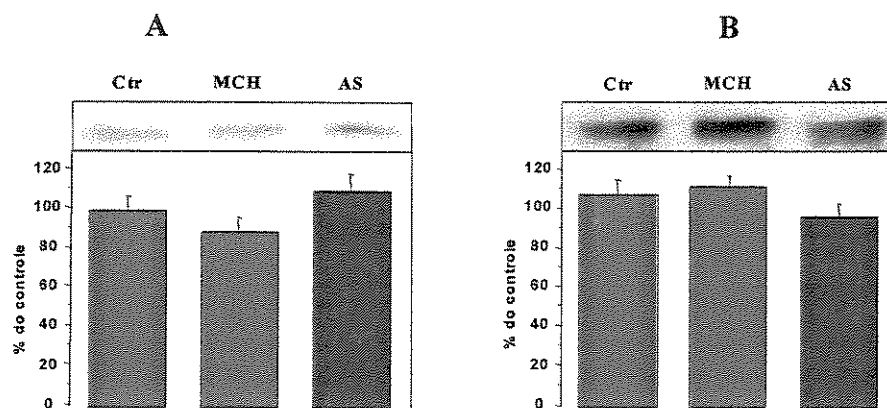


Figura 14-Imunoblot com anticorpos anti-UCP-1 (A) e anti UCP-3 (B), a partir, respectivamente, de extratos protéicos de tecido adiposo marrom e músculo esquelético obtidos de ratos controle (Ctr), tratados com MCH ou com oligonucleotídeo antisense MCH (AS). Em todas as condições n = 4.

4.5.4-Efeitos sobre os níveis séricos de corticosterona

Os níveis de corticosterona analisados por RIA mostraram-se discretamente elevados nos animais tratados com MCH ($51,051 \pm 4,802$ ng/mL) em relação aos animais controle ($44,411 \pm 3,701$ ng/mL) (não significativo), enquanto os animais sob bloqueio da expressão de MCH apresentaram valores reduzidos de corticosterona ($34,209 \pm 4,487$ ng/mL) tanto em comparação ao grupo MCH ($p > 0,05$) quanto ao grupo controle (sem diferença significativa) (Fig. 15).

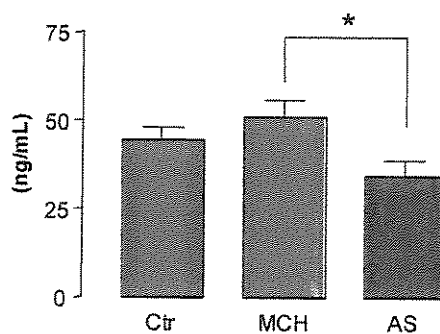


Figura 15-Níveis sanguíneos de corticosterona detectados por RIA em ratos controle (Ctr), tratados com MCH ou com oligonucleotídeo antisense MCH (AS), onde n = 6 e * $p < 0,05$.

5-DISCUSSÃO

O aumento da prevalência de obesidade e diabetes mellitus em populações de diversas regiões do planeta é o resultado da associação de uma série de fatores ambientais como, por exemplo, modificações no hábito alimentar e redução da atividade física, que agem sobre indivíduos com predisposição genética, para levar ao fenótipo final (GUY-GRAND, 2003; KOPELMAN, 2000; SPIEGELMAN e FLIER, 2001). Obesidade e diabetes mellitus têm consequências importantes tanto em saúde pública, pois interferem com a produtividade profissional, e acarretam gastos para o sistema; como também numa esfera individual, pois comprometem a qualidade de vida, além de reduzirem a auto-estima e contribuir para a redução da longevidade.

Diferentes abordagens foram utilizadas numa tentativa de se encontrar conexões entre o desenvolvimento de obesidade e diabetes mellitus. Dentre estas abordagens destaca-se a realização de estudos envolvendo modelos animais com mutações espontâneas que resultam no desenvolvimento de obesidade, a exemplo de camundongos *ob/ob* e *db/db*, e ratos Zucker (*fa/fa*), nos quais a ausência de leptina ou a perda da funcionalidade dos seus receptores estão associadas a anormalidades endócrinas e metabólicas, como intolerância à glicose e distúrbios da secreção de insulina. Por outro lado, a hiper-expressão da enzima 11 β -hidroxi-esteróide dehidrogenase tipo 1 (11 β -HSD1) em adipócitos de camundongos incrementa a atividade de glicocorticóides nestes órgãos resultando em obesidade visceral e diabetes tipo 2 (STULNIG e WALDHAUSL, 2004; TOMLINSON e STEWART, 2002). O processo de envelhecimento está associado ao desenvolvimento de obesidade, provavelmente como consequência de mecanismos centrais de descontrole da fome e termogênese (SEALS e BELL, 2004), sendo, portanto, mais um importante modelo utilizado em estudos que visam caracterizar o desenvolvimento de obesidade e diabetes mellitus (CARVALHO *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 2001). A exposição de animais homeotérmicos ao frio constitui situação fisiológica única em que se observa elevada termogênese independentemente do estado alimentar. Durante a exposição ao frio há aumento da ingestão alimentar que se acompanha de reduzidos níveis sanguíneos de insulina e leptina, hormônios estes que modulam sinais hipotalâmicos de saciedade. Desta forma, a utilização da exposição ao frio como modelo para avaliação do controle da ingestão alimentar, aumento da termogênese e controle do fluxo de substratos para órgãos e tecidos, voltados especialmente à manutenção da homeostase da glicose, bem como a

realização de estudos sobre mecanismos moleculares responsáveis por tais adaptações, devem oferecer a possibilidade de se alcançar avanços na compreensão dos mecanismos centrais de controle do peso corpóreo e controle central e periférico da ação da insulina.

Como mencionado acima, a exposição de animais homeotérmicos à baixa temperatura promove várias adaptações fisiológicas necessárias para manter a estabilidade da temperatura corporal (ARANCIBIA *et al.*, 1996; HORVATH *et al.*, 1999; VINTER *et al.*, 1988). Dentre tais adaptações, o aumento na ingestão alimentar juntamente com a queda inicial do peso seguida de um reduzido ritmo de ganho no peso corporal refletem desvio do fluxo energético para produção de calor, através do processo de termogênese adaptativa sem-calafrio (BING *et al.*, 1998; MELNYK e HIMMS-HAGEN, 1998; YAHATA e KUROSHIMA, 1989).

No presente estudo, a exposição de ratos ao frio foi utilizada como modelo para que, num primeiro momento se investigasse o controle da expressão de RNAs mensageiros codificadores de diferentes proteínas em hipotálamo, as quais pudessem ter participação nos mecanismos centrais de regulação da fome e termogênese, e num segundo momento avaliar a possível participação de alguma destas proteínas no controle central da ação periférica da insulina.

De forma similar a estudos pregressos (BING *et al.*, 1998), foi observado no presente modelo um aumento na ingestão alimentar acompanhado de perda inicial no peso corporal e menor ganho de peso pelos animais expostos ao frio, o que pode estar relacionado a aumento na termogênese, pois embora tenha havido breve e discreta queda na temperatura corporal desses animais, a mesma retornou à normalidade e manteve-se estável até o fim do período experimental. Por outro lado, a manutenção de baixas concentrações de insulina ao longo do período de exposição ao frio não foi acompanhada por hiperglicemia ou redução dos níveis circulantes de AGL conforme verificado em outro estudo (HOO-PARIS *et al.*, 1988). Isto pode ser explicado pelo fato de que neste estudo os animais foram mantidos em hipotermia, o mesmo não acontecendo no atual trabalho onde a temperatura corporal dos animais expostos ao frio manteve-se estável.

Embora a exposição ao frio seja utilizada em alguns estudos como modelo experimental de estresse, a ausência de alterações nos níveis circulantes de TSH e corticosterona observada no presente trabalho exclui a possibilidade dos demais resultados

refletirem respostas a uma condição de estresse. Por outro lado, glicocorticóides estão associados à redução na termogênese e atividade do BAT, provavelmente por estimular diretamente a expressão de NPY no núcleo arqueado (STRACK *et al.*, 1995). Portanto, é provável que a não elevação nos níveis de corticosterona seja um dos fatores necessários para que haja aumento da termogênese e conseqüente sobrevivência mediante exposição prolongada ao frio.

Diante do menor peso corporal apresentado pelos animais expostos ao frio, foram avaliados os estoques corporais de energia, constatando-se maior mobilização da gordura corporal evidenciada pelo menor percentual de massa gorda associada a aumento na massa magra e elevação nos níveis hepáticos de glicogênio.

Uma vez obtidas evidências de que o presente modelo animal se equivale a outros já descritos na literatura, iniciaram-se estudos visando a identificação de RNAs mensageiros codificadores de proteínas hipotalâmicas reguladas pela exposição ao frio. *Gene arrays* são ferramentas metodológicas que possibilitam uma análise dinâmica da expressão de inúmeros genes permitindo um rápido ganho de conhecimento quanto à resposta de um determinado tecido frente a um estímulo experimental (CHEUNG e SPIELMAN, 2002).

Como descrito nos resultados, 56 dentre 1176 genes expressos no hipotálamo foram modulados pela exposição ao frio, dentre os quais alguns neurotransmissores, receptores de membrana, proteínas envolvidas com transcrição e tradução, canais iônicos de membrana e outros. Potencialmente, muitos destes genes podem participar diretamente das adaptações centrais que ocorrem no frio. Entretanto, conforme já mencionado, selecionou-se o neurotransmissor MCH (hormônio concentrador de melanina), cuja expressão mostrou-se significativamente aumentada através do *cDNA macroarray*, para que fossem avaliadas sua expressão e ação sobre parâmetros metabólicos relacionados ao gasto energético e ingestão alimentar, uma vez que o mesmo exerce reconhecidas propriedades moduladoras sobre o controle alimentar e o peso corpóreo (LUDWIG *et al.*, 2001; QU *et al.*, 1996; SHIMADA *et al.*, 1998). Com este fim, a expressão hipotalâmica de MCH em animais expostos ou não ao frio foi parcialmente bloqueada pela utilização ICV de oligonucleotídeos antisense para MCH, por 3 dias, durante os quais foram avaliadas medidas de parâmetros metabólicos, bioquímicos e hormonais.

O MCH, neuropeptídeo de 19 aa, inicialmente identificado na hipófise de salmão, é expresso em neurônios da área hipotalâmica lateral e, em mamíferos, tem sua importância associada principalmente ao controle do comportamento alimentar, apresentando potente efeito orexigênico e tendo sua expressão suprimida após tratamento com leptina (QU *et al.*, 1996; SHIMADA *et al.*, 1998). Além disso, o MCH interfere na regulação do peso corporal, pois sua superexpressão em camundongos pode ocasionar obesidade e mesmo resistência à insulina (LUDWIG *et al.*, 2001).

Muitos estudos, a partir do trabalho inicial de QU e colaboradores (QU *et al.*, 1996), atribuem ao MCH a propriedade de aumentar a ingestão alimentar em animais experimentais. Entretanto, o bloqueio parcial em sua síntese, promovido pela infusão ICV de oligonucleotídeo antisense, não resultou em modulação significativa da ingestão quer nos animais mantidos a 4 °C quer nos controles, o que juntamente com outras evidências encontradas na literatura, referentes aos efeitos do MCH sobre o comportamento alimentar, demonstram que isto não representa simples relação causa-efeito. Na verdade, doses agudas de MCH administradas via ICV promovem aumento significativo na ingestão alimentar (CLEGG *et al.*, 2003; DELLA-ZUANA *et al.*, 2002; QU *et al.*, 1996; ROSSI *et al.*, 1997), enquanto infusões crônicas de MCH não elevam significativamente a ingestão calórica quando ratos são mantidos sob dieta regular, embora ocorra elevação da ingestão caso estes sejam tratados com dieta hiperlipídica (GOMORI *et al.*, 2003; ITO *et al.*, 2003). Do mesmo modo, estímulo à atividade hipotalâmica do MCH através de infusões ICV (ROSSI *et al.*, 1997) ou bloqueio da mesma utilizando antagonista específico para o MCH1-R (BOROWSKY *et al.*, 2002) exercem, agudamente, efeitos evidentes sobre a alimentação e moderado ou nenhum efeito após tratamento crônico. A hiper-expressão por mecanismos recombinantes de MCH também resulta em hiperfagia e obesidade, embora a magnitude de aumento na ingestão seja menor que aquela apresentada por animais tratados agudamente com MCH (LUDWIG *et al.*, 2001).

Por outro lado, a ablação do MCH produz um fenótipo de baixo peso associado à hipofagia e aumento no consumo de oxigênio (SHIMADA *et al.*, 1998), enquanto a ausência de receptores para o MCH promove baixo peso e redução da massa gorda, especialmente como consequência de hiperatividade e metabolismo alterado, mesmo diante de quadro de hiperfagia (CHEN *et al.*, 2002; MARSH *et al.*, 2002). Em recente estudo

(SEGAL-LIEBERMAN *et al.*, 2003), demonstrou-se, através de ablação do MCH em camundongos *ob/ob* (os quais hiper-expressam MCH), uma atenuação do fenótipo de obesidade (magreza secundária a maior gasto energético), apesar de sustentada hiperfagia, bem como melhoria de outras anormalidades metabólicas e endócrinas associadas à deficiência de leptina (melhor resposta à exposição ao frio, menor nível de corticosterona plasmática, melhoria na tolerância à glicose).

Diante destas informações, sugere-se que os efeitos orexigênicos do MCH no hipotálamo sejam dependentes de fatores como duração do estímulo, dieta adotada, tipo de receptor bem como do modelo experimental, além do fato de que algumas abordagens usadas para modular a ação do MCH promovem mudanças consideráveis no peso corporal sem similar regulação da ingestão alimentar.

O bloqueio da síntese de MCH por quatro dias também não promoveu alteração significativa sobre a temperatura corporal dos animais submetidos a qualquer das condições experimentais de temperatura, o que está de acordo com prévias abordagens farmacológicas e associadas à tecnologia recombinante, envolvendo o estudo da função do MCH no hipotálamo (BOROWSKY *et al.*, 2002; CLEGG *et al.*, 2003; DELLA-ZUANA *et al.*, 2002; QU *et al.*, 1996).

O peso corporal, ao contrário dos parâmetros previamente avaliados, foi significativamente modulado pelo bloqueio parcial do MCH. No presente trabalho, observou-se que a exposição ao frio resulta em queda inicial do peso corporal, a qual é seguida de gradual recuperação, embora os animais submetidos ao frio não obtenham a mesma taxa de ganho de peso que aqueles mantidos em temperatura ambiente. Somado a isso, os animais expostos ao frio que estavam sob bloqueio da síntese de MCH tiveram perda de peso significativamente maior que seus respectivos controles, o mesmo acontecendo com os animais mantidos em temperatura ambiente que foram tratados com oligonucleotídeo antisense, porém nestes em menor magnitude.

Considerando-se que o bloqueio da expressão de MCH resultou em significativa perda de peso não acompanhada por mudanças na ingestão alimentar e peso corporal, avaliaram-se a seguir os estoques corporais de energia, consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono, QR e expressão de UCP-1 no BAT, com o propósito de

estimar, mesmo que indiretamente, o fluxo da energia perdida pelos animais submetidos a bloqueio do MCH, e a participação do BAT nas adaptações termogênicas estimuladas pelo frio e pela interferência na sinalização do MCH. Em resposta ao bloqueio da expressão do MCH, houve redução nos conteúdos hepático e muscular de glicogênio, assim como da gordura epididimal, aumento relativo na massa gorda e redução da massa magra entre os animais expostos ao frio. Além disso, a quantidade de UCP-1 no BAT, que foi significativamente aumentada pela exposição ao frio, confirmando relatos anteriores da literatura (BING *et al.*, 1998), sofreu significativo incremento sob bloqueio do MCH, acompanhado de aumento no peso relativo do BAT. Em contrapartida, todas essas alterações ocorreram sem que houvesse maiores mudanças no consumo de O₂, produção de CO₂ e QR.

O BAT é um órgão especializado que participa ativamente na produção de calor. Sua atividade é estimulada por neurônios hipotalâmicos através de impulso simpático. Considerando-se que conexões simpáticas innervando o BAT têm origem no PVN, LH, área preforínica e núcleo reticulatório (OLDFIELD *et al.*, 2002), e o fato de ser o MCH um dos neurotransmissores predominantes no LH, é possível que este neuropeptídeo participe do controle da expressão de UCP-1 e da atividade termogênica do BAT. Os resultados aqui apresentados sugerem que, durante exposição ao frio, a expressão de UCP-1 em níveis adequados, a qual é imprescindível à plena atividade termogênica do BAT, depende da hiper-expressão hipotalâmica do MCH. Frente a um bloqueio da expressão do MCH observa-se um aumento na quantidade de UCP-1. Tal fenômeno pode refletir a perda da capacidade dos animais em ajustar adequadamente o gasto energético necessário à produção de calor.

É possível que o gasto energético promovido pela atividade motora represente ainda outro mecanismo envolvido no controle ponderal dependente do MCH. De acordo com relato da literatura (MARSH *et al.*, 2002), a ausência da efetividade do MCH1-R resulta em magreza, hiperatividade motora e hiperfagia. Aparentemente, grande parte do aumento na taxa metabólica observada neste modelo animal está relacionada à hiper-atividade observada durante a fase escura de seu ciclo claro-escuro. Em contrapartida, a maior ativação de neurônios que expressam MCH durante o estado de sono paradoxal ou sono REM sugere importante participação do MCH como fator hipnogênico associado à

ausência total de tônus muscular observada durante esta fase do sono (VERRET *et al.*, 2003). Talvez estas observações possam contribuir para explicar porque em muitos estudos que se propuseram a caracterizar o papel da sinalização hipotalâmica de MCH sobre o controle da ingestão alimentar e peso corporal, não se encontrou forte correlação entre variações na ingestão calórica e peso corpóreo. Isso se aplica também ao presente estudo, no qual a ausência de modificações no consumo de O₂, produção de CO₂ e QR pode ser justificada por tal observação, uma vez que os animais foram mantidos confinados durante a realização dessas medidas.

A hipótese de que o MCH tem importante papel no controle do gasto energético é reforçada ainda por dois recentes estudos (SHIMOKAWA *et al.*, 2002; SEGAL-LIEBERMAN *et al.*, 2003;). No primeiro deles, o tratamento de roedores com um inibidor da enzima ácido-graxo sintase, C75, induziu um quadro de hipofagia acompanhado por uma perda de peso não proporcional, ou seja, os animais tratados com C75 perderam menos peso que animais mantidos em jejum, embora nenhum dos grupos tenha ingerido calorias. Tais animais apresentaram menor expressão hipotalâmica de NPY e AGRP e maior expressão de POMC e CART do que os controles, enquanto, surpreendentemente, expressaram níveis hipotalâmicos de MCH mais elevados. No segundo estudo, o *knockout* do MCH em camundongos *ob/ob*, os quais hiper-expressam MCH, promoveu acentuada redução na gordura corporal apesar de sustentada hiperfagia, secundariamente a um grande aumento no gasto energético decorrente de elevação tanto do gasto energético de repouso quanto da atividade motora, além de conservar a massa magra.

Os resultados apresentados até o momento sugerem que mediante condições promotoras do catabolismo, um aumento na expressão hipotalâmica de MCH é necessário para que mecanismos capazes de regular o gasto energético possam minimizá-lo frente à condição adversa, a exemplo do que ocorre durante a exposição ao frio.

Na parte final deste estudo, avaliou-se o papel do MCH sobre produção e ação periférica da insulina e sobre etapas intermediárias fundamentais na transdução do sinal molecular deste hormônio. Uma vez que distúrbios do controle do gasto energético são comuns em pacientes e modelos animais com obesidade e, considerando-se a freqüente associação entre obesidade e diabetes mellitus, decidimos testar a hipótese de um possível papel do MCH no controle da ação do único hormônio hipoglicemiante. Para tal, ratos

foram tratados com MCH ou com oligonucleotídeo antisense MCH e comparados a controles que receberam infusões de tampão TE, uma vez que os resultados obtidos pela utilização do mesmo não diferem daqueles decorrentes do tratamento com oligonucleotídeo sense MCH.

O tratamento com MCH assim como a inibição da expressão do MCH não promoveu alteração significativa nos níveis basais da insulina, enquanto os níveis basais de glicose foram aumentados pelo tratamento com MCH. Durante o GTT, ratos tratados com MCH apresentaram elevação significativa dos níveis de glicose enquanto o tratamento com oligonucleotídeo antisense não promoveu mudanças significativas neste parâmetro. Os níveis de insulina durante o GTT não diferiram entre os grupos. Assim, o tratamento com MCH parece contribuir para um comprometimento da resposta funcional à insulina. Entretanto, durante o ITT tal tendência não foi confirmada.

A análise dos efeitos dos tratamentos com MCH e oligonucleotídeo antisense MCH sobre a ativação de duas proteínas envolvidas em etapas chaves da sinalização da insulina foi de encontro aos achados funcionais apresentados acima. As proteínas Akt e ERK foram selecionadas por participarem de etapas da sinalização celular da insulina que direcionam o sinal para vias de controle de fenômenos metabólicos (Akt) ou de crescimento (ERK) (BRAZIL *et al.*, 2002; PAGES e POUYSSEGUR, 2004). Ao se avaliar a ativação da Akt, medida pela fosforilação em serina 473 após estímulo com insulina, observou-se que somente em músculo esquelético o tratamento com MCH promoveu uma redução na resposta molecular à insulina. Nos demais tecidos analisados o tratamento com MCH não induziu modificações significativas. Da mesma forma, o tratamento com oligonucleotídeo antisense MCH não foi capaz de induzir modificações significativas do padrão de ativação molecular da Akt em nenhum dos tecidos avaliados.

Com relação à ERK, o tratamento com MCH promoveu uma redução da resposta molecular à insulina em tecido adiposo branco, enquanto o tratamento com oligonucleotídeo antisense MCH levou a um aumento de sua ativação molecular em tecido adiposo marrom. Nos demais tecidos, ambos os tratamentos foram incapazes de provocar modificações significativas no padrão de resposta da ERK à insulina.

A hiper-expressão hipotalâmica de MCH em animais transgênicos torna-os susceptíveis ao desenvolvimento de obesidade e secundariamente a um quadro de resistência à insulina e intolerância à glicose (LUDWIG *et al.*, 2001), enquanto a supressão de MCH em animais que hiper-expressam este neuropeptídeo resulta em atenuação do fenótipo de obesidade associada à melhoria na sensibilidade à insulina e subsequente melhor regulação na homeostase da glicose (SEGAL-LIEBERMAN *et al.*, 2003). Em ambas as condições, as alterações na sensibilidade à insulina foram atribuídas às modificações nos níveis de adiposidade dos animais. Entretanto, considerando-se que o tratamento com MCH induziu redução na ativação da Akt em músculo e aumento nos níveis basais de glicose, decorrente possivelmente de uma menor demanda de combustível por esse tecido, pode-se sugerir que o MCH *per se*, e através de um efeito central, possa desencadear mecanismos que exerçam interferência sobre a sinalização da insulina em tecidos chave na captação de glicose, como o próprio músculo, e que, portanto, a modulação na ação periférica da insulina observada nestes estudos (LUDWIG *et al.*, 2001; SEGAL-LIEBERMAN *et al.*, 2003) represente consequência não apenas das alterações na adiposidade dos animais como também da ação primária do MCH.

O bloqueio da expressão do MCH em animais expostos ao frio está associado a aumento da expressão de UCP-1 em BAT, enquanto em animais não expostos ao frio este mesmo bloqueio da expressão de MCH promove aumento da ativação da ERK. Uma vez que a ERK tem importante participação no controle da transcrição gênica, participando inclusive do controle de diferenciação de BAT e controle da expressão de UCP-1 (PORRAS *et al.*, 1998), é possível que a mesma represente uma das ligações celulares entre o sinal gerado no hipotálamo pelo bloqueio da expressão de MCH e o controle da expressão da UCP.

O presente estudo permitiu a identificação de proteínas hipotalâmicas potencialmente envolvidas no controle da ingestão alimentar e termogênese e a avaliação mais detalhada de uma destas proteínas, o MCH. Os resultados aqui apresentados trouxeram importantes informações não apenas no que se refere ao controle da ingestão alimentar e termogênese como também no controle central da ação periférica da insulina, tema ainda pouco explorado, porém de interesse crescente. Por fim, somado ao fato de que o MCH seja o único peptídeo hipotalâmico conhecido até o momento cuja ablação resulta

em magreza, os resultados apresentados neste trabalho revelam a potencialidade do neurotransmissor MCH como alvo terapêutico para identificação, geração e desenvolvimento de fármacos eficazes na terapia da obesidade e diabetes mellitus tipo2.

***6-REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- Arancibia, S., Rage, F., Astier, H., and Tapia-Arancibia, L. (1996). Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology*, 64, 257-267.
- Araujo, E. P., Amaral, M. E., Souza, C. T., Bordin, S., Ferreira, F., Saad, M. J., Boschero, A. C., Magalhaes, E. C., and Velloso, L. A. (2002). Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett*, 531, 437-442.
- Baffi, J. S., and Palkovits, M. (2000). Fine topography of brain areas activated by cold stress. A fos immunohistochemical study in rats. *Neuroendocrinology*, 72, 102-113.
- Berthoud, H. R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev.*, 26, 393-428.
- Berthoud, H. R. (2003). Neural systems controlling food intake and energy balance in the modern world. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 6, 615-620.
- Bessesen, D. H. (2003). Future directions in weight control. Molecular and genetic discoveries pave the way. *Postgrad Med.*, 114, 30-32, 35-38.
- Bing, C., Frankish, H. M., Pickavance, L., Wang, Q., Hopkins, D. F., Stock, M. J., and Williams, G. (1998). Hyperphagia in cold-exposed rats is accompanied by decreased plasma leptin but unchanged hypothalamic NPY. *Am J Physiol.*, 274, R62-68.
- Boden, G., Chen, X., Kolaczynski, J. W., and Polansky, M. (1997). Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Invest.*, 100, 1107-1113.
- Borowsky, B., Durkin, M. M., Ogozalek, K., Marzabadi, M. R., DeLeon, J., Lagu, B., Heurich, R., Lichtblau, H., Shaposhnik, Z., Daniewska, I., *et al.* (2002). Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med.*, 8, 825-830.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72, 248-254.
- Brazil, D. P., Park, J., and Hemmings, B. A. (2002). PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell*, 111, 293-303.

- Carvalho, C. R., Brenelli, S. L., Silva, A. C., Nunes, A. L., Velloso, L. A., and Saad, M. J. (1996). Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology*, *137*, 151-159.
- Chen, X. M., Hosono, T., Yoda, T., Fukuda, Y., and Kanosue, K. (1998). Efferent projection from the preoptic area for the control of non-shivering thermogenesis in rats. *J Physiol*, *512 (Pt 3)*, 883-892.
- Chen, Y., Hu, C., Hsu, C. K., Zhang, Q., Bi, C., Asnicar, M., Hsiung, H. M., Fox, N., Sliker, L. J., Yang, D. D., *et al.* (2002). Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology*, *143*, 2469-2477.
- Cheung, V. G., and Spielman, R. S. (2002). The genetics of variation in gene expression. *Nat Genet.*, *32 Suppl*, 522-525.
- Clegg, D. J., Air, E. L., Benoit, S. C., Sakai, R. S., Seeley, R. J., and Woods, S. C. (2003). Intraventricular melanin-concentrating hormone stimulates water intake independent of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *284*, R494-499.
- Deitel, M. (2002). The International Obesity Task Force and "globesity". *Obes Surg.*, *12*, 613-614.
- Della-Zuana, O., Presse, F., Ortola, C., Duhault, J., Nahon, J. L., and Levens, N. (2002). Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, *26*, 1289-1295.
- Druce, M., and Bloom, S. R. (2003). Central regulators of food intake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *6*, 361-367.
- Fernandes, M. L., Saad, M. J., and Velloso, L. A. (2001). Effects of age on elements of insulin-signaling pathway in central nervous system of rats. *Endocrine*, *16*, 227-234.
- Ferreira, M. L., Marubayashi, U., and Coimbra, C. C. (1999). The medial preoptic area modulates the increase in plasma glucose and free fatty acid mobilization induced by acute cold exposure. *Brain Res Bull*, *49*, 189-193.

- Flier, J. S., and Maratos-Flier, E. (1998). Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell*, 92, 437-440.
- Friedman, J. M., and Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395, 763-770.
- Gasparetti, A. L., de Souza, C. T., Pereira-da-Silva, M., Oliveira, R. L., Saad, M. J., Carneiro, E. M., and Velloso, L. A. (2003). Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol*, 552, 149-162.
- Gomori, A., Ishihara, A., Ito, M., Mashiko, S., Matsushita, H., Yumoto, M., Tanaka, T., Tokita, S., Moriya, M., Iwaasa, H., and Kanatani, A. (2003). Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 284, E583-588.
- Guy-Grand, B. (2003). [From obesity to obesities: from concepts to practices]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 64, S7-15.
- Hoo-Paris, R., Jourdan, M. L., Wang, L. C., and Rajotte, R. (1988). Insulin secretion and substrate homeostasis in prolonged hypothermia in rats. *Am J Physiol*, 255, R1035-1040.
- Horvath, T. L., Warden, C. H., Hajos, M., Lombardi, A., Goglia, F., and Diano, S. (1999). Brain uncoupling protein 2: uncoupled neuronal mitochondria predict thermal synapses in homeostatic centers. *J Neurosci.*, 19, 10417-10427.
- Ito, M., Gomori, A., Ishihara, A., Oda, Z., Mashiko, S., Matsushita, H., Yumoto, M., Sano, H., Tokita, S., Moriya, M., *et al.* (2003). Characterization of MCH-mediated obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 284, E940-945.
- Jung, R. T. (1997). Obesity as a disease. *Br Med Bull*, 53, 307-321.
- Kim, M. S., Small, C. J., Stanley, S. A., Morgan, D. G., Seal, L. J., Kong, W. M., Edwards, C. M., Abusnana, S., Sunter, D., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2000). The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest.*, 105, 1005-1011.

- Koopmans, S. J., Frolich, M., Gribnau, E. H., Westendorp, R. G., and DeFronzo, R. A. (1998). Effect of hyperinsulinemia on plasma leptin concentrations and food intake in rats. *Am J Physiol.*, 274, E998-E1001.
- Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404, 635-643.
- Kumar, M. V., Shimokawa, T., Nagy, T. R., and Lane, M. D. (2002). Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 1921-1925.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Luciano, E., Carneiro, E. M., Carvalho, C. R., Carvalheira, J. B., Peres, S. B., Reis, M. A., Saad, M. J., Boschero, A. C., and Velloso, L. A. (2002). Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol.*, 147, 149-157.
- Ludwig, D. S., Tritos, N. A., Mastaitis, J. W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., Lowell, B., Flier, J. S., and Maratos-Flier, E. (2001). Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.*, 107, 379-386.
- Marsh, D. J., Weingarth, D. T., Novi, D. E., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Chen, A. S., Guan, X. M., Jiang, M. M., Feng, Y., Camacho, R. E., *et al.* (2002). Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3240-3245.
- Melnyk, A., and Himms-Hagen, J. (1998). Temperature-dependent feeding: lack of role for leptin and defect in brown adipose tissue-ablated obese mice. *Am J Physiol.*, 274, R1131-1135.
- Mondal, M. S., Nakazato, M., and Matsukura, S. (2002). Characterization of orexins (hypocretins) and melanin-concentrating hormone in genetically obese mice. *Regul Pept.*, 104, 21-25.
- Nagy, G., Szekeres, G., Kvell, K., Berki, T., and Nemeth, P. (2002). Development and characterisation of a monoclonal antibody family against aquaporin 1 (AQP1) and aquaporin 4 (AQP4). *Pathol Oncol Res.*, 8, 115-124.

- Oldfield, B. J., Giles, M. E., Watson, A., Anderson, C., Colvill, L. M., and McKinley, M. J. (2002). The neurochemical characterisation of hypothalamic pathways projecting polysynaptically to brown adipose tissue in the rat. *Neuroscience*, 110, 515-526.
- Pages, G., and Pouyssegur, J. (2004). Study of MAPK signaling using knockout mice. *Methods Mol Biol*, 250, 155-166.
- Paxinos, G., Watson C. R. and Emson P. C. (1980). AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods*, 3, 129-149.
- Pimenta, W. P., Saad, M. J., Paccola, G. M., Piccinato, C. E., and Foss, M. C. (1989). Effect of oral glucose on peripheral muscle fuel metabolism in fasted men. *Braz J Med Biol Res.*, 22, 465-476.
- Porras, A., Alvarez, A. M., Valladares, A., and Benito, M. (1998). p42/p44 mitogen-activated protein kinases activation is required for the insulin-like growth factor-I/insulin induced proliferation, but inhibits differentiation, in rat fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol.*, 12, 825-834.
- Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Mathes, W. F., Przypek, R., Kanarek, R., and Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380, 243-247.
- Rossi, M., Choi, S. J., O'Shea, D., Miyoshi, T., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (1997). Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology*, 138, 351-355.
- Schmitz, O., Fisker, S., Orskov, L., Hove, K. Y., Nyholm, B., and Moller, N. (1997). Effects of hyperinsulinaemia and hypoglycaemia on circulating leptin levels in healthy lean males. *Diabetes Metab.*, 23, 80-83.
- Scott, A. M., Atwater, I., and Rojas, E. (1981). A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*, 21, 470-475.
- Seals, D. R., and Bell, C. (2004). Chronic sympathetic activation: consequence and cause of age-associated obesity? *Diabetes*, 53, 276-284.

- Segal-Lieberman, G., Bradley, R. L., Kokkotou, E., Carlson, M., Trombly, D. J., Wang, X., Bates, S., Myers, M. G., Jr., Flier, J. S., and Maratos-Flier, E. (2003). Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*, 10085-10090.
- Shimada, M., Tritos, N. A., Lowell, B. B., Flier, J. S., and Maratos-Flier, E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*, *396*, 670-674.
- Shimokawa, T., Kumar, M. V., and Lane, M. D. (2002). Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*, 66-71.
- Spiegelman, B. M., and Flier, J. S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, *104*, 531-543.
- Strack, A. M., Sebastian, R. J., Schwartz, M. W., and Dallman, M. F. (1995). Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol*, *268*, R142-149.
- Stulnig, T. M., and Waldhauser, W. (2004). 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase Type 1 in obesity and Type 2 diabetes. *Diabetologia*, *47*, 1-11.
- Tomlinson, J. W., and Stewart, P. M. (2002). The functional consequences of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression in adipose tissue. *Horm Metab Res* *34*, 746-751.
- Trinder, P. (1969). Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol*, *22*, 158-161.
- Velloso, L. A., Folli, F., Sun, X. J., White, M. F., Saad, M. J., and Kahn, C. R. (1996). Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*, 12490-12495.
- Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Leger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C., and Luppi, P. H. (2003). A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci.*, *4*, 19.
- Vinter, J., Hull, D., Batt, R. A., and Tyler, D. D. (1988). The effect of limit feeding on thermogenesis and thermoregulation in genetically obese (ob/ob) mice during cold exposure. *Int J Obes.*, *12*, 111-117.

- Wang, Q., Bing, C., Al-Barazanji, K., Mossakowaska, D. E., Wang, X. M., McBay, D. L., Neville, W. A., Taddayon, M., Pickavance, L., Dryden, S., *et al.* (1997). Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. **Diabetes**, 46, 335-341.
- Willett, W. C., Dietz, W. H., and Colditz, G. A. (1999). Guidelines for healthy weight. **N Engl J Med.**, 341, 427-434.
- Withers, P. C. (1977). Measurement of VO₂, VCO₂, and evaporative water loss with a flow-through mask. **J Appl Physiol.**, 42, 120-123.
- Yahata, T., and Kuroshima, A. (1989). Metabolic cold acclimation after repetitive intermittent cold exposure in rat. **Jpn J Physiol.**, 39, 215-228.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, 372, 425-432.

7-ANEXO

Hypothalamic Melanin-Concentrating Hormone Is Induced by Cold Exposure and Participates in the Control of Energy Expenditure in Rats

MÁRCIO PEREIRA-DA-SILVA, MÁRCIO A. TORSONI, HUGO V. NOURANI, VIVIANE D. AUGUSTO, CLÁUDIO T. SOUZA, ALESSANDRA L. GASPARETTI, JOSÉ B. CARVALHEIRA, GISLAINE VENTRUCCI, MARIA CRISTINA C. G. MARCONDES, ARIIVALDO P. CRUZ-NETO, MÁRIO J. A. SAAD, ANTONIO C. BOSCHERO, EVERARDO M. CARNEIRO, AND LÍCIO A. VELLOSO

Departments of Internal Medicine (M.P., M.A.T., H.V.N., C.T.S., A.L.G., J.B.C., M.J.A.S., L.A.V.) and Physiology and Biophysics (V.A., G.V., M.C.C.G.M., A.C.B., E.M.C.), State University of Campinas; and Department of Zoology (A.P.C.-N.), Paulista State University, Campus Rio Claro-State University of Sao Paulo, 13083-970 Campinas SP, Brazil

Short-term cold exposure of homeothermic animals leads to higher thermogenesis and food consumption accompanied by weight loss. An analysis of cDNA-macroarray was employed to identify candidate mRNA species that encode proteins involved in thermogenic adaptation to cold. A cDNA-macroarray analysis, confirmed by RT-PCR, immunoblot, and RIA, revealed that the hypothalamic expression of melanin-concentrating hormone (MCH) is enhanced by exposure of rats to cold environment. The blockade of hypothalamic MCH expression by antisense MCH oligonucleotide in cold-exposed rats promoted no changes in feeding behavior and body tem-

perature. However, MCH blockade led to a significant drop in body weight, which was accompanied by decreased liver glycogen, increased relative body fat, increased absolute and relative interscapular brown adipose tissue mass, increased uncoupling protein 1 expression in brown adipose tissue, and increased consumption of lean body mass. Thus, increased hypothalamic MCH expression in rats exposed to cold may participate in the process that allows for efficient use of energy for heat production during thermogenic adaptation to cold. (*Endocrinology* 144: 4831-4840, 2003)

CHRONIC EXPOSURE OF homeothermic animals to cold environment leads to several physiological adaptations that are required to maintain a stable body temperature (1-3). Among these adaptations, the increase of food consumption associated with an initial fall of body weight reflects the deviation of energy flow toward heat production, through a process of nonshivering thermogenesis (4, 5). Most of the adaptation control is coordinated by integrated responses of neurons lying in different hypothalamic nuclei (6-8).

Loss of coordinated control of food ingestion and energy expenditure is thought to be a central issue in the development of obesity, one of the most prevalent and life-threatening diseases of the modern world (9). A recent study has shown that defects in signaling of several hypothalamic neurotransmitters, such as neuropeptide Y, cocaine- and amphetamine-regulated transcript, agouti-related peptide, α -MSH, pro-opiomelanocortin, melanin-concentrating hormone (MCH), and orexin (10), as well as defects of leptin and insulin signaling in hypothalamus, may lead to disturbances of feeding and weight control (11, 12).

Because, under cold exposure, high food consumption is

associated with weight loss and increased thermogenesis, we decided to use cDNA-macroarray analyses to identify candidate hypothalamic proteins that are modulated in response to cold and, therefore, evaluate their participation in the processes that integrate energy expenditure and food consumption.

Among 1176 different mRNA specificities analyzed, cold exposure induced the modulation of expression of 56 different mRNA specificities in rat hypothalamus. Initial interest was drawn over the neurotransmitter MCH, a 19-amino-acid peptide, expressed mostly in neurons of the lateral hypothalamus (LH) and known to induce hyperphagia and weight gain, if intracerebroventricularly (ICV)-injected, in experimental animals (13, 14). Moreover, the lack of MCH signaling, by knocking out the expression of its receptor in the central nervous system, leads to moderate hypophagia and leanness (15, 16). Based on these facts, we decided to evaluate the role of MCH hyperexpression in the hypothalamus of cold-exposed rats by blocking its protein synthesis using a phosphorothioate-modified MCH-specific antisense oligonucleotide.

Materials and Methods

Chemicals, antibodies, and oligodeoxynucleotides

Reagents for SDS/PAGE and immunoblotting were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA). HEPES, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, and BSA (fraction V) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden); 125 I-Protein A and nitrocellulose membranes were from Amersham Corp.

Abbreviations: AS, With antisense oligonucleotide treatment; BAT, brown adipose tissue; ICV, intracerebroventricularly; LH, lateral hypothalamus; MCH, melanin-concentrating hormone; RQ, respiratory quotient; RT, reverse transcription; S, with sense oligonucleotide treatment; T, temperature; UCP, uncoupling protein; VO_2 , rate of oxygen consumption; VCO_2 , rate of carbon dioxide production; WO, without oligonucleotide treatment.

(Aylesbury, UK). Microcon centrifugal filter devices, YN-3, were purchased from Millipore Corp. (Bedford, MA). Antibody against MCH (chicken anti-MCH, T-1506) was from BMA Biomedicals AG (Augst, Switzerland), and antibody against uncoupling protein (UCP1) (goat anti-UCP1, sc-6529) was from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Secondary antibodies, used as bridges, antioat (G-4018), and anti-chicken (F-8888), as well as rat MCH (M-4542), were from Sigma Chemical Co. MCH RIA kit (RK 070-47) was from Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (Belmont, CA). Chemicals employed in RT-PCR, primers for MCH (sense 5'-TAC GGA GCA GCA AAC A-3' and antisense 5'-ACA GCC AGA CTG AGG G-3') and β -actin (sense 5'-ACC ACA GCT GAG AGG GAA ATC G-3' and antisense 5'-CAG TCC GCC TAG AAG CAT TTG C-3'), phosphorothioate-modified oligonucleotides for MCH (sense 5'-CCC TCA GTC TGG CTG-3' and antisense 5'-ACA GCC AGA CTG AGG-3'), and Trizol reagent were obtained from Life Technologies (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Sodium amobarbital was from Eli Lilly (Indianapolis, IN). Atlas Rat 1.2 Array Kit was from Clontech Laboratories, Inc. (East Meadow Circle, Palo Alto, CA). Salmon sperm DNA was from Sigma Chemical Co., and [α - 32 P]dATP was from Amersham Corp.

Experimental animals and cold-exposure protocols

Male Wistar rats (56–70 d old/200–260 g) from the University of Campinas Central Animal Breeding Center were used in the experiments. The University's Ethical Committee approved the protocols. The animals were maintained on a 12-h artificial light, 12-h dark cycle and kept in individual cages supplied with standard rodent chow and water *ad libitum*. After an acclimatizing period (3 d), rats were transferred to metabolic cages and randomly assigned to two treatment conditions: control and cold-exposed [temperature (T) +4°C]. Rats of the control group were continuously maintained at 23 ± 1°C, whereas rats of the T +4°C group were housed at 4 ± 1°C. Protocols lasting 2 h and 2, 4, 8, and 16 d were employed. For hormone and biochemical determinations, samples were collected from eight rats of each group, and analyses were run in duplicates. For cDNA preparation for macroarray analysis, mRNA extracted from the hypothalamus of three rats of each group was pooled, reverse transcribed, and used in the hybridization protocol; three pools from each condition were evaluated. For the remaining experiments, four rats of each group were analyzed, and the experiments were run in duplicates or triplicates.

ICV cannulation and ICV oligonucleotide injection

Adult male Wistar rats were stereotactically instrumented under sodium amobarbital (15 mg/kg body weight) anesthesia with chronic unilateral 26-gauge stainless steel indwelling guide cannulas, aseptically placed into the lateral ventricle (0.2 mm posterior, 1.5 mm lateral, and 4.2 mm ventral to bregma) as previously described (13). After a 1-wk recovery period, all rats were kept in individual cages and exposed either to 23 ± 1°C (control) or to 4 ± 1°C (T +4°C) during 4 d. Sense and antisense MCH oligonucleotides were diluted in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) and injected once a day at 1000 h, with a total vol of 2.0 μ l per dose (2.0 nmol/ μ l), 24, 48, and 72 h after the onset of the experimental period. Rats were randomly assigned to six different treatment conditions: control without oligonucleotide treatment (control WO); cold exposed without oligonucleotide treatment (T +4°C WO); control with sense oligonucleotide treatment (control S); cold exposed with sense oligonucleotide treatment (T +4°C S); control with antisense oligonucleotide treatment (control AS); cold exposed with antisense oligonucleotide treatment (T +4°C AS).

Biochemical, hormonal, and metabolic characterization of experimental animals

During the animal model characterization, the measurements of food intake, rectal temperature, and body weight were obtained at 1400 h daily from experimental d 1 to experimental d 8, and on experimental d 16. During ICV injection protocol, the measurements were performed daily during the whole experimental period. Rectal temperature was measured with a Thermistor digital (HI-8753) high-precision thermom-

eter (Hanna Instruments, Inc., Woonsocket, RI) inserted 1.5 cm from the anus. Plasma glucose was determined by the glucose oxidase method (17). RIA was employed to measure serum insulin according to a previous description (18), leptin concentrations were determined using a commercially available ELISA kit (Crystal Chem. Inc., Chicago, IL), and corticosterone and TSH were detected by commercially available RIA kits (Amersham Biosciences, Biotrak, Aylesbury, UK). Glycogen was measured, according to a previously described method (19), in liver and gastrocnemius muscle fragments, at experimental d 8 (during the animal model characterization) and at experimental d 4 (during ICV oligonucleotide treatment). Body carcass composition was determined as previously described (20).

Metabolic measurements

Rates of oxygen consumption (VO_2) and carbon dioxide production (VCO_2) were measured by open-flow respirometry, with a set-up modified from a previously published method (21). After 14 h fasting, rats were placed individually into polyvinyl chloride respirometric chambers, which were then installed into a temperature-controlled cabinet ($\pm 0.1^\circ\text{C}$). Air was drawn over ascarite and drierite scrubbers to remove CO_2 and H_2O to a manifold, which divided the flow into four airstreams. Each stream was regulated at 1500–2500 ml/min, depending on the experimental temperature. The constancy of the flow was periodically checked with a Cole-Palmer (Vernon Hills, IL) flow meter, and less than 1% drift during the experiments was detected. Each stream fed the inlet port of each of the four respirometric chambers, one of which contained no experimental animal and was used as a baseline reference. Air leaving each respirometric chamber was directed into a computer-controlled multiplexer, where four solenoid valves selected which flow would be directed to a computer-controlled mass-flow meter (model 840; Sierra Instruments, Inc., Monterey, CA). The mass-flow meter was adjusted to deliver a constant flow of 300 ml/min of air, sequentially through water scrubbers, to the measurement cell of a CA-2A CO_2 analyzer (Sable Systems International, Las Vegas, NV), again through water and gas scrubbers, and finally to the measurement cell of a FC-1B O_2 analyzer (Sable). Each chamber with a rat was sampled for 20 min. Thus, a complete set of recording lasted for 80 min, and this sequence was repeated six times during the evaluation period. Experiments started at 1000 h and finished at 1800 h. VO_2 and VCO_2 were calculated by the Datacan program, based in the equations of Withers (22) and were expressed as milliliters per hour per gram. Animals were weighed immediately before and after the metabolic measurements, and the average of these two measurements was used as the body mass value for these calculations. The respiratory quotient (RQ) was calculated as: VCO_2/VO_2 .

cDNA arrays analysis and RT-PCR

RNA preparation. Control and cold-exposed rat hypothalamus were excised and rapidly frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using Trizol reagent, according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was quantified by spectrophotometry at A260 nm, and its integrity was determined from the A260:A280 nm ratio. After 24 h, isolated total RNA was rendered genomic-DNA-free by digestion with ribonuclease-free deoxyribonuclease (RQ1; Promega, Madison, WI).

Array hybridization. The recommended protocol was followed in all steps. Briefly, 1 μ g poly(A)⁺ RNA was converted into ^{32}P -labeled first-strand cDNA by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. Unincorporated ^{32}P -labeled nucleotides were removed by chromatography using a NucleoSpin Extraction Spin Column (CLONTECH, Palo Alto, CA). Purified cDNA probes were hybridized to the Atlas membranes. Hybridization occurred overnight at 68°C. After washing, membranes were sealed in hybridization bags and exposed to imaging plates for 1 d. After exposure, the imaging plates were scanned using a BAS-1500 (Fujifilm, Fuji, Japan), and hybridization signals were counted. Hybridization signals of each gene were normalized by a positive control (signals of the housekeeping gene), and gene expression was compared between the preconditioning and control groups. Genes exhibiting differential expression in the preconditioning group were selected only if the hybridization signals

were either increased or decreased by at least 2-fold, compared with those of the control group.

Semiquantitative RT-PCR. Seven micrograms of total RNA, obtained from hypothalamus of rats exposed, or not, to cold during 4 d, were reverse-transcribed with SuperScript reverse transcriptase (200 U/ μ l) using oligo(dT) (20 μ l) in a 30- μ l reaction vol [5 $\times$ reverse transcription (RT) buffer, 10 mM deoxynucleotide triphosphate, and 40 U/ μ l ribonuclease-free inhibitor]. The RTs involved a 50-min incubation at 42 C and a 15-min incubation at 70 C. After RT, 0.75 μ l of the RT product was used in each PCR to a final vol of 50 μ l (10 $\times$ PCR buffer, 1.0 mM deoxynucleotide triphosphate, 50 mM MgCl₂, Taq polymerase, and sense and antisense primers for MCH and β -actin). The expression of mRNA was determined by PCR, using the primers described above, and amplified a 323-bp DNA fragment of MCH and a 533-bp DNA fragment of β -actin. Triplicate reactions were done using an initial incubation at 94 C for 5 min, denaturation at 94 C for 1 min, followed by annealing at 50 and 57 C (MCH and β -actin, respectively) for 50 sec, extension at 72 C for 1 min, and final extension at 72 C for 7 min. After titration between 16 and 32 cycles, 22 cycles was selected for quantification of MCH and β -actin. These PCR conditions were therefore used in all subsequent experiments. All PCR experiments included a control tube with no RT step. PCR-amplified products were run on 2% Tris/acetic acid/EDTA agarose gels, and the DNA was visualized by ethidium bromide staining. The size of the products was determined using a 1-kb plus DNA ladder (Life Technologies) as standard size markers. Images of the bands were captured using a TFX 35M UV transilluminator (Life Technologies), and band intensity was quantified by digital densitometry (Scion Image software, Scion Corp., Frederick, MD). Results are expressed as the ratio of MCH/ β -actin $\pm$ SEM, in arbitrary scanning units.

Protein analyses by Western blot and dot-blot

UCP1 was measured in brown adipose tissue (BAT) of rats submitted to ICV cannulation and treated according to the following protocols: control WO; T + 4 C WO; control S; T + 4 C S; control AS; and T + 4 C AS. Western blot analyses followed previously described methods (23, 24) using a specific anti-UCP1 polyclonal antibody. The intensity of protein bands corresponding to UCP1 was quantified by digital densitometry (Scion Image software) of the developed autoradiographs. MCH was measured in hypothalamus of rats exposed, or not, to cold (without previous stereotaxic instrumentation), or in rats submitted to ICV cannulation and treated according to the same protocols as stated above for UCP1 measurements. For the detection of MCH in hypothalamic protein extracts, a preparatory step of protein purification by filtration was performed using a Microcon YN-3 device. A method for specific peptide detection by dot-blot, previously described (25), was used. The signal obtained was measured by digital densitometry (Scion Image software) of the developed autoradiographs. Highly purified MCH was used as control.

Determination of hypothalamic MCH by RIA

For hypothalamic MCH determination by RIA, hypothalami of rats of each experimental group were homogenized in ice-cold buffer containing 100 mM Tris (pH 7.6), 1% (vol/vol) Triton X-100, 150 mM NaCl, 0.1 mg/ml aprotinin, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM Na₂VO₄, 100 mM NaF, 10 mM Na₂P₂O₇, and 4 mM EDTA, using a PTA 20S polytron generator (Brinkmann Instruments, Westbury, NY). Homogenates were then centrifuged at 12,000 $\times$ g for 20 min at +4 C. Protein concentration of supernatants was determined by the Bradford method (26). Samples containing 2.0 mg/ml protein were evaluated for the concentration of MCH using a RIA kit, following the recommendations of the manufacturer (Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) (27).

Data presentation and statistical analysis

All numerical results are expressed as the mean $\pm$ SEM of the indicated number of experiments. The results of blots are presented as direct comparisons of bands or dots in autoradiographs and quan-

tified by densitometry using the Scion Image software. Data were analyzed by the two-tailed unpaired Student's *t* test or by repeated-measures ANOVA (one-way or two-way ANOVA) followed by *post hoc* analysis of significance (Bonferroni test) when appropriate, comparing experimental and control groups. The level of significance was set at *P* < 0.05.

Results

Metabolic and hormonal characteristics of rats exposed to cold

Exposure of homeothermic animals to cold promotes changes in several metabolic parameters that reflect physiological adaptations to the novel external environment. For decades, a number of studies have characterized those adaptations; and in the present study, we repeated some of those measurements to evidence the reliability of the model employed. The results obtained during the evaluation of the metabolic parameters are summarized in Tables 1 and 2. As a whole, the animal model herein matches previous characterizations of cold-exposed rats (28, 29). Of greater importance for the objectives of the present study, we emphasize that mean daily food intake was approximately 70% increased in cold-exposed rats (*P* < 0.05), whereas no significant changes in body temperature were detected. Cumulative body weight variation was positive in the control group, whereas a negative variation on body weight was detected in cold-exposed animals. From d 6 on, a stepwise recovery of body weight was observed in cold-exposed rats; but at d 16, it was still lower than at d 0.

cDNA-microarray analyses

Poly (A)⁺ RNA samples from the hypothalamus of control and 4-d cold-exposed rats were prepared and used for cDNA expression array hybridization. Individual gene signal intensities were normalized to that of the housekeeping genes, according to the supplier's instructions. To minimize an animal-specific expression pattern, we com-

TABLE 1. Animal model characterization

Parameters	Control	T + 4 C
Food Intake (g/d)	19.47 $\pm$ 0.49	33.00 $\pm$ 0.72 ^a
Temperature (C)	36.04 $\pm$ 0.07	36.11 $\pm$ 0.06
Glucose (mg/dl)	91.06 $\pm$ 0.35	92.29 $\pm$ 0.31
Insulin (ng/ml)	2.420 $\pm$ 0.12	1.416 $\pm$ 0.18 ^a
Leptin (pg/ml)	2545.42 $\pm$ 292.00	2013.60 $\pm$ 252.95
TSH (ng/ml)	13.27 $\pm$ 1.31	13.32 $\pm$ 1.53
Corticosterone (ng/ml)	102.43 $\pm$ 15.57	112.91 $\pm$ 12.35
Muscle glycogen (% muscle weight)	0.558 $\pm$ 0.084	0.553 $\pm$ 0.103
Liver glycogen (% liver weight)	7.488 $\pm$ 0.531	17.773 $\pm$ 3.984 ^a
Body fat (% carcass weight)	12.354 $\pm$ 933	6.526 $\pm$ 0.536 ^a

^a *P* < 0.05 vs. Control.

TABLE 2. Cumulative body weight variation (g)

	Mean weight at d 0 (g)	d 1	d 4	d 8	d 16
Control	218 $\pm$ 7	+2 $\pm$ 1	+4 $\pm$ 1	+7 $\pm$ 2	+23 $\pm$ 5
T + 4 C	222 $\pm$ 8	-10 $\pm$ 2 ^a	-13 $\pm$ 3 ^a	-9 $\pm$ 3 ^a	-4 $\pm$ 2 ^a

^a *P* < 0.05 vs. Control.

bined equal amounts of RNA from three different animals and analyzed six independent hybridization signals from three different arrays per experimental condition. Table 3 presents the data of all genes that had their mRNA ex-

pression significantly modulated by cold exposure. Although several of the genes found to be regulated by cold exposure might play important roles in energy homeostasis, we elected MCH as the first to be studied, because of

TABLE 3. Results of macroarray analyses

mRNAs with increased hypothalamic expression in rats exposed to cold
• 40S ribosomal protein S12 (RPS12) • 60S ribosomal protein L21 (RPL21) • Acetylcholine receptor, nicotinic, $\alpha 4$ • Adenomatous polyposis coli protein (APC) • ADP-ribosylation factor 3 (ARF3) • A-RAF proto-oncogene • Calbindin D28; avian-type vitamin D-dependent; calcium-binding protein (CABP); spot 35 protein; CALB1 • Carboxypeptidase E (CPE); CPH • Cathepsin L • Chymotrypsinogen B • Colipase (CLPS) • Dipeptidylpeptidase 6 (DPP6) • Elastase 2 • Growth-accentuating protein 43 (GAP43); neuromodulin • Guanine nucleotide-binding protein G(I) α 1 subunit (GNA11); BPGTPB • Guanine nucleotide-binding protein G(O) α subunit (GNAO; GNAO) • Guanine nucleotide-binding regulatory, α subunit • Heat shock 90-kDa protein β (HSP90-β); HSP84; HSPCB • Mak; male germ cell-associated kinase; highly expressed at and after meiosis • Melanin-concentrating hormone (PMCH; MCH) • Mitochondrial ATP synthase β subunit (ATP5B) • MAPK2; PRKM2; MAPK1; extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2); ERT1 • Muscle phosphofructokinase (PFKM) • Myelin basic protein (MBP) • Myelin proteolipid protein (PLP); lipophilin; DM20 • Neuronal acetylcholine receptor protein β 2 subunit (NACHRB2); cholinergic receptor nicotinic β polypeptide 2 (CHRN2) • N-methyl-D-aspartate receptor subtype 2B (NMDAR2B; NR2B); glutamate receptor subunit epsilon 2B (GRIN2B) • Nonmuscle cofilin (CFL1) • Nonprocessed neurexin II β major; nonprocessed neurexin II α • Nucleoside diphosphate kinase A (NDP kinase A; NDKA); tumor metastatic process-associated protein; metastasis inhibition factor NM23; NME1 • Pancreatic cholesterol esterase (CHOLE); bile salt-activated lipase (BAL); bile salt-stimulated lipase (BSSL); carboxyl ester lipase; sterol esterase; pancreatic lysophospholipase • Pancreatic Triacylglycerol lipase • Pheochromocytoma-derived protein tyrosine phosphatase-like protein • Potassium channel RCK4, subunit, putative • Potassium voltage-gated channel shaker-related subfamily member 1 (KV1.1); KCNA1; RBK1 • Proteasome component C3 • Protein kinase C β 1 (PKC-β 1; PRKCB1; PKCB); PKC-β II (PRKCB2) • Protein kinase C δ type (PKC-δ; PRKCD) • Ribosomal protein L13 • Secretogranin II (SGII; SCG2); chromogranin C (CHGC) • Serine-threonine protein phosphatase 3 catalytic subunit α isoform (PPP3CA); PPP2B; calmodulin-dependent calcineurin A α (CALNA; CNA1) • Sertoli cell cytochrome c oxipeptidase polypeptide 1 (COX1) • Sodium/potassium-transporting ATPase α 1 subunit (Na⁺/K⁺ ATPase α1) • Sodium/potassium-transporting ATPase β 1 subunit (ATP1B1) • Soluble superoxide dismutase 1 (SOD 1) • Synaptotagmin X1 (SYT11) • Syntaxin 1B (STX1B) • Tissue inhibitor of metabolism metalloproteinase 2 (TIMP2) • Tyrosine 3 monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein ϵ polypeptide (YWHAE); 14-3-3 protein ϵ; protein kinase C inhibitor protein 1 (KCIP1); mitochondrial import stimulation factor L subunit • Tyrosine 3 monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein ζ polypeptide (YWHAZ); 14-3-3 protein ζ; protein kinase C inhibitor protein 1 (KCIP1); mitochondrial import stimulation factor S1 subunit • Tyrosine 3 monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein η polypeptide (YWHAH); 14-3-3 protein η; protein kinase C inhibitor protein 1 (KCIP1) • Ubiquitous mitochondrial creatine kinase (U-MTCK; CKMT1); acidic-type mitochondrial creatine kinase (MLA-CK)
mRNAs with decreased hypothalamic expression in rats exposed to cold
• 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP25); super protein (SUP) • Brain fatty acid-binding protein (B-FABP); FABP7; brain lipid-binding protein (BLBP) • Casein kinase I δ; CK1δ; 49-kDa isoform • CRH

its known participation in control of food ingestion and body weight (12).

Hypothalamic MCH expression in rats exposed to cold

To confirm the results obtained with the cDNA-microarray analyses, rats were housed individually, during 4 d, at room temperature or at +4°C; and at the end of the experimental period, they were anesthetized and had their hypothalamus removed for protein or RNA extraction. MCH expression was evaluated at the protein level by dot-blot analyses using a specific MCH antibody, and by RIA. The mRNA level of MCH was determined by RT-PCR using specific primers. As shown in Fig. 1, cold exposure induced an increase of approximately 60% ($n = 4$, $P < 0.05$) on MCH peptide expression as detected by dot-blot (Fig. 1A, upper panel) and by RIA (Fig. 1A, lower panel), and an increase of approximately 80% ($n = 4$, $P < 0.05$) on MCH mRNA expression (Fig. 1B). Thus, a ratification of the results obtained with the cDNA microarray was obtained.

Effects of MCH protein synthesis blockade on body weight, body temperature, and food intake of rats exposed to cold

ICV infusion of MCH, or hypothalamic recombinant hyperexpression of MCH promotes significant increases in food ingestion and weight gain. Homeothermic animals exposed to cold present a significant increase of food intake, which is driven through yet-unknown hypothalamic signaling events. To investigate whether elevated MCH hypothalamic expression participates in the central control of food ingestion during cold exposure, we used an ICV-infused 15-mer phosphorothioate modified MCH antisense oligonucleotide to block MCH synthesis; and we evaluated food intake, body temperature, and body weight during 4 d. Based on the *Rattus norvegicus* MCH mRNA sequence (accession M62641 at NCBI GenBank) three different sequences were designed and tested by ICV injection of 2.0 μ l per dose (2.0 nmol/ μ l) antisense or respective sense oligonucleotide and were evaluated for its property of blocking MCH synthesis, by measuring MCH protein content by dot-blot and RIA of hypothalamic protein extracts. The sequence 5'-ACA GCC AGA CTG AGG-3' presented the most effective and reproducible results and was used in all experiments thereafter, in parallel with its respective sense sequence as control. This antisense oligonucleotide sequence was submitted to BLAST analyses (at www.ncbi.nlm.nih.gov) and matched only for *Rattus norvegicus* MCH coding sequence. Figure 2 shows that ICV infusion of MCH antisense oligonucleotide leads to approximately 25% ($n = 4$, $P < 0.05$) reduction of MCH peptide expression in hypothalamus of control rats, whereas a reduction of approximately 45% ($n = 4$, $P < 0.05$) was detected in the hypothalamus of rats exposed to cold. In such animals, no significant variation of food intake and body temperature was induced by the blockade of MCH expression; however, a significantly greater fall in body weight was detected in MCH-blocked, cold-exposed rats ($\sim 100\%$, $P < 0.05$). Moreover, an unexpectedly significant fall of body

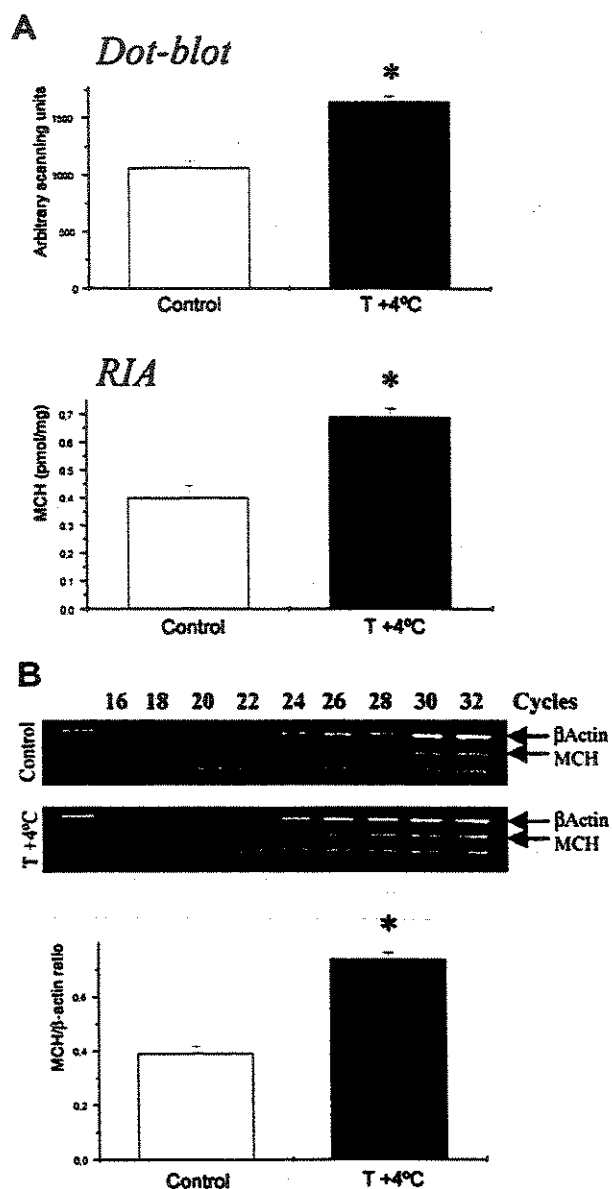


Fig. 1. Effects of cold exposure on MCH protein and mRNA expression in hypothalamus. Rats exposed (T +4°C), or not (Control), to cold during 4 d were analyzed for MCH content in hypothalamic extracts. The protein amount of hypothalamic MCH (A, upper panel) was detected by dot-blot and is expressed as scanning units of specific blots. The protein amount of hypothalamic MCH (A, lower panel) was determined by RIA and is expressed as picomoles per milligram of total protein in hypothalamic protein extract. MCH mRNA (B) was evaluated by RT-PCR, and data obtained are depicted as a ratio: MCH/ β -actin densitometric scanning units of specific bands in 2% agarose gels (typical gels are depicted in the upper panel of B). For both experiments, $n = 4$; *, $P < 0.05$ vs. Control.

weight ($P < 0.05$) was also observed in rats maintained at room temperature that received MCH antisense oligonucleotide (Fig. 2D).

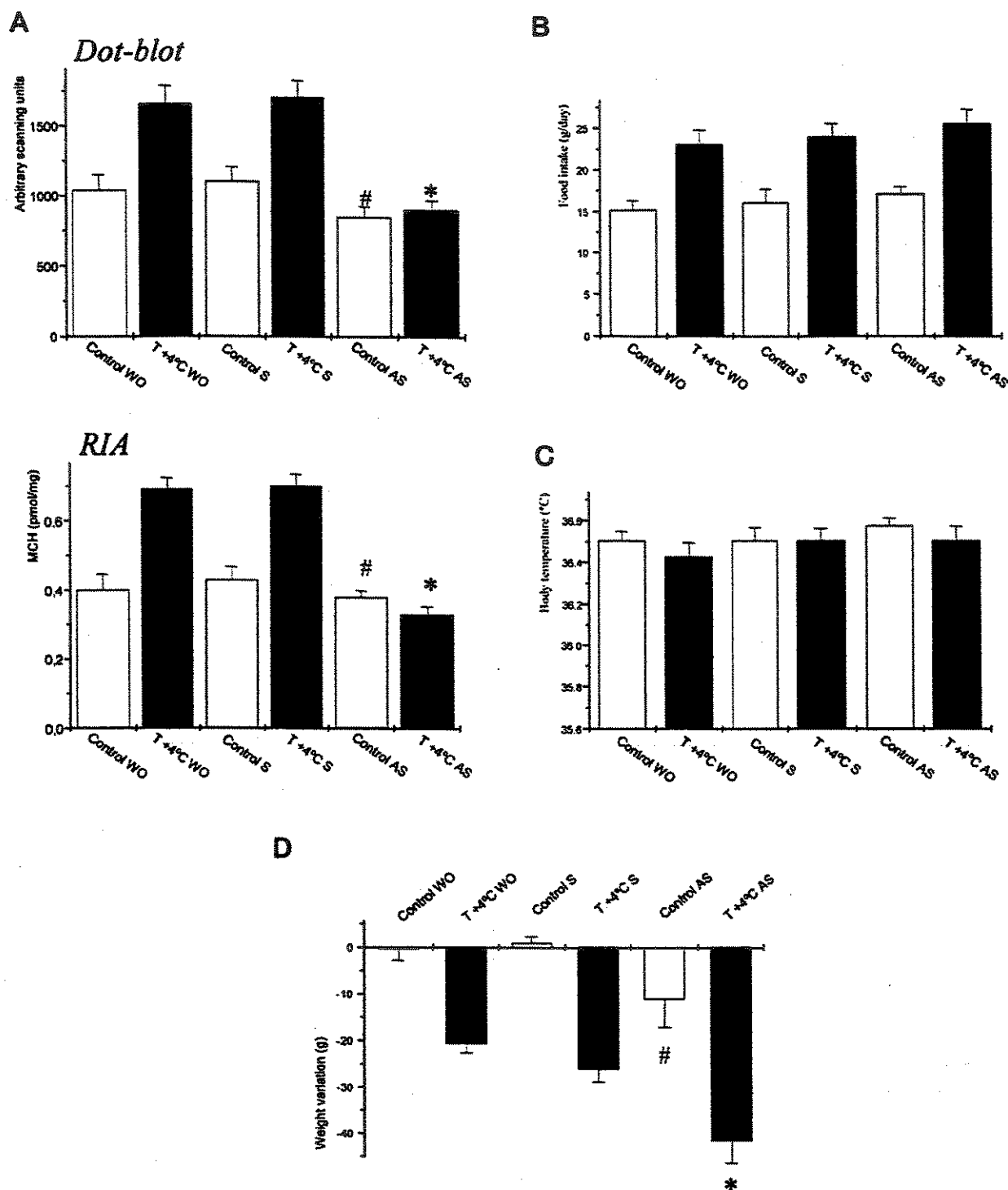


FIG. 2. Effects of ICV MCH antisense oligonucleotide treatment on MCH protein expression, food intake, body temperature, and body weight variation. Rats were ICV cannulated and, after a recovery period, were treated once a day, at 1000 h, with sense (S) or antisense (AS) MCH oligonucleotide or a similar volume of saline (WO), with a total vol of 2.0 μ l per dose (2.0 nmol/ μ l), 24, 48, and 72-h after the onset of the experimental period. The experimental animals were randomly assigned to two groups, exposed (T +4°C) or not exposed (Control) to cold. Hypothalamic MCH protein content (A, *upper panel*) was detected by dot-blot and is expressed as scanning units of specific blots. The protein

Effects of MCH protein synthesis blockade on liver and muscle glycogen contents and carcass composition

Because the blockade of hypothalamic MCH in cold-exposed rats produced a significantly increased fall of body weight, in the absence of major variations of food intake and body temperature, we decided to evaluate the relative amounts of body glycogen, fat, and lean mass stocks in control and cold-exposed rats, treated or not with MCH antisense oligonucleotide during 4 d. As depicted in Fig. 3, the exposure of rats to cold produced increases in liver (~400%, $P < 0.05$) and muscle (~50%, not significant) glycogen contents; however, if the rats exposed to cold were treated with antisense oligonucleotide, lower levels of liver (~120%, $P < 0.05$, vs. T +4 C WO) and muscle (~20%, not significant) glycogen increments were detected. On the other hand, relative body fat was significantly reduced in rats exposed to cold; if cold-exposed rats were treated with antisense MCH oligonucleotide, higher amounts of relative body fat were encountered ($P < 0.05$, vs. T +4 C WO). Finally, lean body mass was unaffected by cold exposure; however, under MCH blockade, cold-exposed animals consumed significantly higher amounts of relative lean body mass, which differed from that observed in cold-exposed non-antisense MCH-oligonucleotide-treated rats ($P < 0.05$).

Effects of MCH protein synthesis blockade on oxygen consumption, carbon dioxide production, and RQ

Cold-exposed rats exhibited a significantly higher O_2 consumption (3.24 ± 0.26 vs. 1.54 ± 0.02 ml/g·h for cold-exposed and control rats, respectively) and CO_2 production (2.50 ± 0.22 vs. 1.21 ± 0.04 ml/g·h for cold-exposed and control rats, respectively) than control rats. However, no major change in RQ was detected among the groups (0.77 ± 0.01 vs. 0.78 ± 0.03 for cold-exposed and control rats, respectively). The blockade of MCH expression with antisense oligonucleotide promoted no significant changes in O_2 consumption, CO_2 production, and RQ in both groups studied.

Effects of MCH protein synthesis blockade on BAT UCP1 expression

Prolonged survival of homeothermic animals exposed to cold depends on efficient means of maintaining a stable body temperature. In rodents, much of this function is exerted by BAT located mostly in interscapular space and perirenal area. Heat production in BAT is, at least in part, driven by a leak of the mitochondria electron transport chain, and UCP1 is directly involved in this process (30). To investigate the participation of MCH on cold-induced UCP1 induction, Western blot analyses were employed to measure interscapular UCP1 expression in cold-exposed MCH-blocked rats and compare them with respective controls. As shown in Fig. 4, cold exposure induced an increase of approximately 30% ($P < 0.05$) in UCP1 expression in BAT. Blockade of hypothalamic MCH promoted a further significant increase in

UCP1 expression in cold-exposed rats ($P < 0.05$ vs. cold exposed with no oligonucleotide treatment); and, in fact, even in non-cold-exposed rats, the treatment with MCH antisense oligonucleotide induced a nonsignificant increase ($P = 0.058$) in UCP1 expression in BAT, as compared with control. The same period of MCH blockade promoted a significant increase in relative [BAT weight (g)/body weight (g)] interscapular BAT weight (0.099 ± 0.004 vs. 0.083 ± 0.003 for cold-exposed, antisense MCH-treated and cold-exposed, non-oligonucleotide-treated rats, respectively).

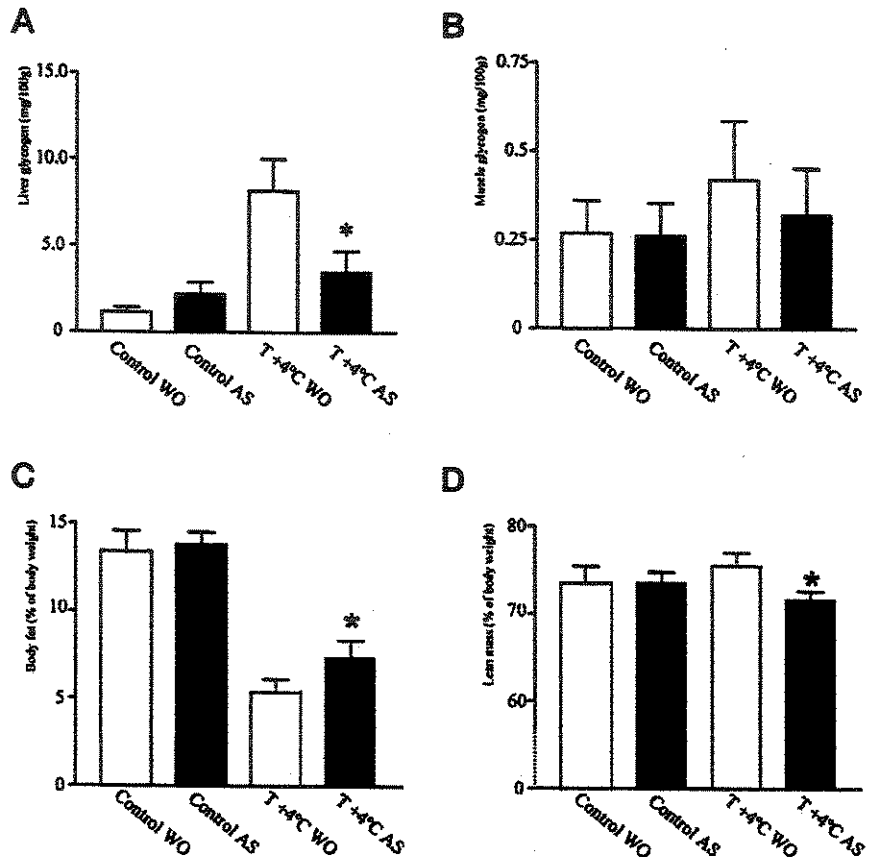
Discussion

Gene array analyses are powerful tools for evaluating the complex dynamics of tissue-specific gene expression, and to compare the effects of different external stimuli on the genetic phenotype of a given tissue (31). Because the exposure of homeothermic animals to cold environment leads to a unique physiologic situation characterized by increased feeding, associated with high thermogenesis, and no weight gain, we hypothesized that, by characterizing hypothalamic proteins regulated by cold exposure, candidate proteins that participate in the control of feeding behavior and energy homeostasis would be revealed. Therefore, by evaluating 1176 genes, we detected cold-induced modulation of 56 genes expressed in rat hypothalamus. Among those, we found neurotransmitters, membrane receptors, enzymes involved in energy metabolism, proteins of the transcription and translation machinery, membrane ion-channels, and others. We believe that many of them may have direct participation in the central adaptations to cold and will certainly deserve further studies. As for the objectives of the present study, we chose evaluation of the role of the neurotransmitter MCH in cold-induced feeding behavior and energy homeostasis. For that purpose, MCH expression, which is up-regulated in cold-exposed animals, was partially abrogated by ICV phosphorothioate-modified MCH antisense oligonucleotide treatment; and several metabolic, biochemical and hormonal parameters were studied.

Since the seminal work of Qu and collaborators (12), most studies have emphasized the attribute of MCH to increase food consumption in experimental animals (10, 32, 33). Therefore, it was surprising that the partial blockade of MCH provided by ICV oligonucleotide treatment led to no significant modulation of food ingestion in cold-exposed and in control rats. Taking a closer look at the data available in the literature concerning MCH effects on feeding behavior, it becomes clear that this is not a straightforward matter. It seems that acute ICV injection of MCH promotes significant increase of food intake (12, 13, 34), whereas chronic ICV infusion does not lead to significant increase of caloric intake if rats are maintained under regular chow, but does so if they are treated with a high-fat diet (35, 36). The blockade of hypothalamic MCH activity by ICV infusion of a selective MCH1-R antagonist promotes evident acute effects on feed-

amount of hypothalamic MCH (A, lower panel) was determined by RIA and is expressed as picomoles per milligram of total protein in hypothalamic protein extract. Mean daily food intake (B) is expressed in grams, body temperature at experimental d 4 (C) is expressed in Celsius degrees, and body weight variation during the experimental period is depicted in grams. In all evaluations, $n = 4$; *, $P < 0.05$ vs. T +4 C WO; #, $P < 0.05$ vs. Control WO.

FIG. 3. Effects of hypothalamic MCH blockade on liver and muscle glycogen content and relative fat and lean body mass. Rats were ICV cannulated and, after a recovery period, were treated once a day at 1000 h, with antisense (AS) MCH oligonucleotide with a total vol of 2.0 μ l per dose (2.0 nmol/ μ l), 24, 48, and 72 h after the onset of the experimental period, or with a similar volume of saline (WO). The experimental animals were randomly assigned to two groups, exposed (T +4 C) or not exposed (Control) to cold. Liver (A) and muscle (B) glycogen are expressed as milligrams per 100 grams of tissue. Relative body fat (C) and lean mass (D) are expressed as percent of body weight. In all measurements, $n = 4$; *, $P < 0.05$ vs. T +4 C WO.



ing inhibition and only moderate effects after chronic treatment (37). The recombinant hyperexpression of MCH also leads to increased food ingestion and obesity, but the magnitude of feeding augment is not as exuberant as in acutely MCH-treated animals (10). Finally, targeted-disruption of MCH1-R results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity (7, 15). Thus, it seems that the orexigenic effects of MCH in hypothalamus are dependent on the duration of stimulus and on receptor subtype, and that some of the approaches used to modulate MCH action produce substantial changes of body weight that are not accompanied by similar regulation of food intake.

Body temperature was another parameter evaluated in the present study. Normal rats exposed to cold environment (+4 C) present an early fall in body temperature, reaching a nadir of approximately 33 C (rectal) after 2–6 h and returning to euthermia after 24–48 h at most (28, 29). After 4 d of MCH blockade, no significant changes in rectal temperature were detected in cold-exposed and control rats. These findings are in accordance with previous pharmacological and recombinant approaches undertaken to study MCH function in hypothalamus (12, 13, 34, 37).

Different from the two previous parameters evaluated, body weight was significantly influenced by the partial blockade of MCH. As in the present study, most previously published data show that exposure of rats to +4 C leads to

an initial loss of body weight, which is followed by gradual recovery. However, even after several weeks, cold-exposed rats do not reach the same rate of weight gain as their matched controls maintained at room temperature. In the present experiments, MCH-blocked, cold-exposed rats presented a significantly greater weight loss than their controls, and even non-cold-exposed rats treated with MCH antisense oligonucleotide underwent significant weight loss.

Because the blockade of MCH expression produced significantly greater weight loss than in respective controls, which was not accompanied by changes in food intake and body temperature, we decided to measure body energy stocks, oxygen consumption, carbon dioxide production, RQ, and UCP1 expression in BAT, as indirect means of estimating the flow of the energy that was lost in MCH-blocked animals, and the participation of BAT in thermogenic adaptation after cold exposure and MCH signaling interference. The data herein presented reveals that blockade of MCH reduces liver and muscle glycogen content, increases relative amounts of body fat, and decreases relative amounts of lean mass of cold-exposed rats. Moreover, in MCH-blocked rats, the amount of UCP1 in BAT, which is significantly stimulated by cold exposure, suffers a further and significant increment, which is accompanied by an increase in the relative weight of BAT. All these changes occurred in the absence of

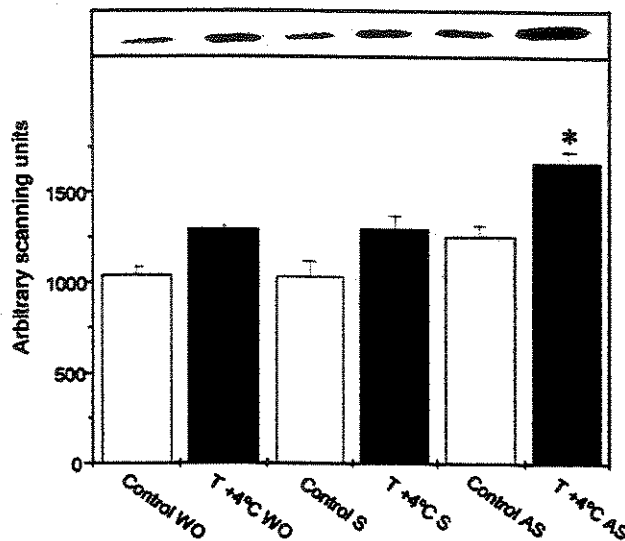


FIG. 4. Effects of hypothalamic MCH blockade on BAT UCP1 protein expression. Rats were ICV cannulated and, after a recovery period, were treated once a day, at 1000 h, with sense (S) or antisense (AS) MCH oligonucleotide or a similar volume of saline (WO), with a total vol of 2.0 μ l per dose (2.0 nmol/ μ l), 24, 48, and 72-h after the onset of the experimental period. The experimental animals were randomly assigned to two groups, exposed (T +4°C) or not exposed (Control) to cold. At the end of the experimental period, the rats were anesthetized, BAT was excised and homogenized, and 0.2 mg of total protein was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with UCP1 antibodies. Specific bands were measured by densitometry, and results obtained are depicted as scanning units. $n = 4$; *, $P < 0.05$ vs. T +4°C WO.

major modifications of O_2 consumption, CO_2 production, and RQ.

BAT is a specialized organ that actively participates in the production of heat. Hypothalamic nuclei stimulate BAT activity and UCP1 expression by sympathetic inputs. In a recent study, the origin of sympathetic connections that innervate BAT has been mapped to paraventricular nucleus, LH, prefrontal area, and retrochiasmatic nucleus (38). Thus, as one of the predominant neurotransmitters expressed in the LH, MCH may participate in the control of UCP1 expression and BAT activity in certain conditions. Based on the present findings, it seems that, during cold exposure, the optimal expression of UCP1, which is required for full thermogenic activity of BAT, is dependent on increased MCH expression in hypothalamus. Once MCH expression is disrupted, the animals may lose the capacity of tight regulation of energy expenditure for heat production, and increased UCP1 may be a reflection of that.

Energy expenditure by motor activity is another possible mechanism involved in MCH-dependent body weight control. According to Marsh and colleagues (15), the disruption of MCH1-R gene produces a phenotype of leanness, motor hyperactivity, and hyperphagia. Apparently, most of the increased metabolic rate of this animal model is attributable to hyperactivity, because it was detected during the dark phase of the light-dark cycle. This observation may explain why many studies, including the present one, that attempted

to characterize the role of hypothalamic MCH signaling on food intake and body weight control, encountered no straight correlation between variation in caloric intake and body weight. This may also explain why, in the present study, no significant changes in O_2 consumption, CO_2 production, and RQ were detected, because the rats were restrained during the measurements.

Finally, a recent study (39) provides, by indirect means, further support for a role of MCH in energy expenditure control. The treatment of rodents with the fatty acid synthase inhibitor C75 was shown to induce hypophagia accompanied by a nonproportional loss of body weight, i.e. C75-treated rats lose weight to a lesser extent than food-deprived rats, although both groups have no caloric intake. These animals express less hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related peptide, and more pro-opiomelanocortin and cocaine- and amphetamine-regulated transcript, than their controls. However, most important, in our opinion, is the fact that they express higher levels of hypothalamic MCH. Taken together with the data herein presented, it seems that, during some situations that provoke catabolism, the levels of hypothalamic MCH are increased to provide means for minimizing energy expenditure during adversity.

In conclusion, the present study suggests that hyperexpression of MCH in hypothalamus of cold-exposed rats participates in the fine tuning of energy expenditure, providing means for optimal heat production with minimal caloric wastage. Apparently, under chronic cold exposure, the role of MCH in the induction of hyperphagia is minimal or absent. These data reinforce the potentiality of MCH as a target for pharmacological therapy of obesity and related diseases, and provide novel support for the concept of dichotomized central control of thermogenesis and food intake.

Acknowledgments

Received February 24, 2003. Accepted July 8, 2003.

Address all correspondence and requests for reprints to: Lício A. Velloso, Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, 13083-970 Campinas SP, Brazil. E-mail: lavelloso@fcm.unicamp.br.

This study was granted by Fundação de Amparo à Ciência do Estado de São Paulo. M.P.S. was a recipient of a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

References

- Arancibia S, Rage F, Astier H, Tapia-Arancibia L 1996 Neuroendocrine and autonomic mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology* 64:257–267
- Horvath TL, Warden CH, Hajos M, Lombardi A, Gaglia F, Diano S 1999 Brain uncoupling protein 2: uncoupled neuronal mitochondria predict thermal synapses in homeostatic centers. *J Neurosci* 19:10417–10427
- Vinter J, Hull D, Batt RA, Tyler DD 1988 The effect of limit feeding on thermogenesis and thermoregulation in genetically obese (ob/ob) mice during cold exposure. *Int J Obes* 12:111–117
- Melnyk A, Himms-Hagen J 1998 Temperature-dependent feeding: lack of role for leptin and defect in brown adipose tissue-ablated obese mice. *Am J Physiol* 274:R1131–R1135
- Yahata T, Kuroshima A 1989 Metabolic cold acclimation after repetitive intermittent cold exposure in rat. *Jpn J Physiol* 39:215–228
- Baffi JS, Palkovits M 2000 Fine topography of brain areas activated by cold stress. A fos immunohistochemical study in rats. *Neuroendocrinology* 72: 102–113
- Chen XM, Hosono T, Yoda T, Fukuda Y, Kanosue K 1998 Efferent projection from the preoptic area for the control of non-shivering thermogenesis in rats. *J Physiol* 512:883–892
- Ferreira ML, Marubayashi U, Coimbra CC 1999 The medial preoptic area

- modulates the increase in plasma glucose and free fatty acid mobilization induced by acute cold exposure. *Brain Res Bull* 49:189-193
9. Spiegelman BM, Flier JS 2001 Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543
 10. Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS, Maratos-Flier E 2001 Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 107:379-386
 11. Inui A 1999 Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides—mediation of the actions of leptin. *Trends Neurosci* 22:62-67
 12. Qu D, Ludwig DS, Gammelfoet S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przyspek R, Kanarek R, Maratos-Flier E 1996 A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380:243-247
 13. Della-Zuana O, Presse F, Ortola C, Duhault J, Nahon JL, Levens N 2002 Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1289-1295
 14. Rossi M, Beak SA, Choi SJ, Small CJ, Morgan DG, Ghatei MA, Smith DM, Bloom SR 1999 Investigation of the feeding effects of melanin concentrating hormone on food intake—action independent of galanin and the melanocortin receptors. *Brain Res* 846:164-170
 15. Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH, Qian S 2002 Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3240-3245
 16. Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E 1998 Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396:670-674
 17. Trinder P 1969 Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* 22:158-161
 18. Scott AM, Atwater I, Rojas E 1981 A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* 21:470-475
 19. Pimenta WP, Saad MJ, Piacola GM, Piccinato CE, Foss MC 1989 Effect of oral glucose on peripheral muscle fuel metabolism in fasted men. *Braz J Med Biol Res* 22:465-476
 20. Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR, Lane MD 2002 Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1921-1925
 21. Thomas DW, Blondel J, Perret P, Lambrechts MM, Speakman JR 2001 Energetic and fitness costs of mismatching resource supply and demand in seasonally breeding birds. *Science* 291:2598-2600
 22. Withers PC 1977 Measurement of VO₂, VCO₂, and evaporative water loss with a flow-through mask. *J Appl Physiol* 42:120-123
 23. Araujo EP, Amaral ME, Souza CT, Bordin S, Ferreira F, Saad MJ, Boschero AC, Magalhães EC, Velloso LA 2002 Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett* 531:437-442
 24. Luciano E, Carneiro EM, Carvalho CR, Carnevali JB, Peres SB, Reis MA, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA 2002 Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol* 147:149-157
 25. Nagy G, Szekeres G, Kvell K, Berki T, Nemeth P 2002 Development and characterisation of a monoclonal antibody family against aquaporin 1 (AQP1) and aquaporin 4 (AQP4). *Pathol Oncol Res* 8:115-124
 26. Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
 27. Mondal MS, Nakazato M, Matsukura S 2002 Characterization of orexins (hypocretins) and melanin-concentrating hormone in genetically obese mice. *Regul Pept* 104:21-25
 28. Cunningham JJ, Gulino MA, Meara PA, Bode HH 1985 Enhanced hepatic insulin sensitivity and peripheral glucose uptake in cold acclimating rats. *Endocrinology* 117:1585-1589
 29. Vallerand AL, Perusse F, Bukowiecki LJ 1987 Cold exposure potentiates the effect of insulin on *in vivo* glucose uptake. *Am J Physiol* 253:E179-E186
 30. Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP 1997 Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387:90-94
 31. Cheung VG, Spielman RS 2002 The genetics of variation in gene expression. *Nat Genet* 32(Suppl):522-525
 32. Huang Q, Viale A, Picard F, Nahon J, Richard D 1999 Effects of leptin on melanin-concentrating hormone expression in the brain of lean and obese Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Neuroendocrinology* 69:145-153
 33. Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M, Chou CJ, Xia B, Crawley JN, Felder CC, Deng CX, Wess J 2001 Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 410:207-212
 34. Clegg DJ, Air EL, Benoit SC, Sakai RS, Seeley RJ, Woods SC 2002 Intraventricular melanin concentrating hormone stimulates water intake independent of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 77
 35. Gomori A, Ishihara A, Ito M, Mashiko S, Matsushita H, Yumoto M, Tanaka T, Tokita S, Moriya M, Iwaasa H, Kanatani A 2003 Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E583-E588
 36. Ito M, Gomori A, Ishihara A, Oda Z, Mashiko S, Matsushita H, Yumoto M, Sano H, Tokita S, Moriya M, Iwaasa H, Kanatani A 2003 Characterization of MCH-mediated obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E940-E945
 37. Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, Marzabadi MR, DeLeon J, Lagu B, Heurich R, Lichtblau H, Shaposhnik Z, Daniewska I, Blackburn TP, Branchek TA, Gerald C, Vayssie PJ, Forray C 2002 Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med* 8:825-830
 38. Oldfield BJ, Giles ME, Watson A, Anderson C, Colvill LM, McKinley MJ 2002 The neurochemical characterisation of hypothalamic pathways projecting polysynaptically to brown adipose tissue in the rat. *Neuroscience* 110:515-526
 39. Shimokawa T, Kumar MV, Lane MD 2002 Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:66-71