

RECEPTORES 5-HT_{1B/1D} PRESENTES NO
HIPOTÁLAMO POSTERIOR MEDIAL E NÚCLEO PARAVENTRICULAR ENVOLVIDOS NO
CONTROLE SEROTONÉRGICO DA INGESTÃO DE ALIMENTO EM
POMBOS (*Columba livia*)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
MESTRADO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

RECEPTORES 5-HT_{1B/1D} PRESENTES NO
HIPOTÁLAMO POSTERIOR MEDIAL E NÚCLEO PARAVENTRICULAR ENVOLVIDOS NO
CONTROLE SEROTONÉRGICO DA INGESTÃO DE ALIMENTO EM
POMBOS (*Columba livia*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Santa Catarina, para obtenção do grau de
Mestre em Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marta Aparecida Paschoalini

FLORIANÓPOLIS, 2005

“O tempo não pára”.

(Cazuza)

*AOS MEUS PAIS, MARIO POFFO E MARYSE FEY,
SEM VOCÊS NADA TERIA SIDO POSSÍVEL. AO
MEU FILHO LUAN, PELA SUA COMPREENSÃO
POR MINHA AUSÊNCIA NESSES DOIS ANOS.*

*À PROF MARTA APARECIDA PASCHOALINI
PELA SUA ORIENTAÇÃO EXEMPLAR.*

AGRADECIMENTOS

AO PROF^o. JOSÉ MARINO NETO, PELA FUNDAMENTAL AJUDA E EXEMPLO DE EXCELENTE PROFESSOR.

AO PROF EDISON SANFELICE ANDRÉ, POR TER ME INCENTIVADO A REALIZAR ESTE SONHO.

À RENATA, QUE ME ENSINOU A DAR OS PRIMEIROS PASSOS NO LABORATÓRIO, UMA AJUDA PRESTIMOSA DA QUAL JAMAIS ESQUECEREI.

AOS DEMAIS COLEGAS, MURILO, BRUNO, EDUARDO, CESAR, FABIO, LUANA, E ESPECIALMENTE A MARCIA, PELOS MOMENTOS VIVIDOS NESSES DOIS ANOS.

AO PROF^o. MOACIR SERRALVO FARIA E A PROF^a. CRISTINA HENRIQUE PINTO, PELA AMIZADE E INCENTIVO.

AOS FUNCIONÁRIOS DO LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA DA UFSC E AO SECRETÁRIO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS PELO AUXÍLIO.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO.....	01
JUSTIFICATIVA.....	16
OBJETIVO.....	18
MATERIAL E MÉTODO.....	20
1 ANIMAIS.....	21
2 INJEÇÕES NO HIPOTÁLAMO.....	21
2.1 Implantação da cânula-guia.....	21
2.2 Confecção da cânula-guia.....	23
2.3 Injeções no hipotálamo.....	23
2.4 Soluções administradas.....	23
2.5 Esquema experimental.....	24
2.6 Registro comportamental.....	25
3 HISTOLOGIA.....	26
4 ANÁLISE DOS DADOS.....	26
RESULTADOS.....	28
1 LOCAIS ATINGIDOS PELA INJEÇÃO INTRA-HIPOTALÂMICA DE METERGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT EM POMBOS SACIADOS.....	29
2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METERGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT NO PMH SOBRE A INGESTÃO DE ALIMENTO EM POMBOS SACIADOS.....	35
3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METERGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT NO PMH SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA EM POMBOS SACIADOS.....	38
4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METERGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT NO PMH SOBRE OS COMPORTAMENTOS NÃO INGESTIVOS EM POMBOS SACIADOS	41
5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METERGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT NO	

PVN SOBRE A INGESTÃO DE ALIMENTO EM POMBOS SACIADOS.....	43
6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METERLGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT NO PVN SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA EM POMBOS SACIADOS.....	46
7 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METERGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT NO PVN SOBRE OS COMPORTAMENTOS NÃO INGESTIVOS EM POMBOS SACIADOS	48
DISCUSSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

No presente estudo, investigou-se a presença de receptores serotoninérgicos no hipotálamo posterior medial (PMH) e no núcleo paraventricular (PVN) envolvidos no controle neural da ingestão de alimento e de água em pombos saciados (*Columba livia*). Para tanto, administraram-se nesses sítios hipotalâmicos a MET (um antagonista não-seletivo dos receptores 5-HT_{1/2}), o GR 46611 (agonista dos receptores 5-HT_{1B/1D}) e o 8-OH-DPAT (agonista 5-HT_{1A}), a fim de identificar os subtipos de receptores presentes nesses locais. Foram utilizados animais saciados, com cânulas-guia implantadas próximas ao PMH e ao PVN, onde era inserida a agulha injetora excedendo em 1,0; 1,7; 2,4 ;3,1; e 3,8mm a cânula-guia. Uma semana após a cirurgia, as aves foram tratadas com veículo (ácido ascórbico 5%), MET (20 nmol), GR (0,6 e 6 nmol) ou 8OH (6 nmol), aleatoriamente. Após a administração das drogas, os animais retornavam às suas gaiolas, que continham água e alimento previamente pesados. O registro comportamental era efetuado durante 1 hora, onde era avaliado o comportamento ingestivo relativo ao consumo de alimento e água (duração e latência) e os comportamentos não ingestivos auto-limpeza, locomoção, parado alerta e posturas típicas de sono (duração e latência). Ao final de 1 hora, o consumo de alimento e de água foi quantificado. Os dados mostram que a injeção de MET no PMH provocou uma resposta hiperfágica, acompanhada de aumento na duração da refeição e redução na latência para iniciar o comportamento alimentar, comparado com os valores obtidos com a injeção de veículo. No PVN, a administração de MET provocou um aumento da quantidade de alimento ingerido, sem alterar a duração total e a latência para iniciar o comportamento ingestivo. O tratamento com GR 46611 no PMH resultou em uma resposta semelhante à obtida com a MET, em ambas as doses utilizadas, e de maneira dose-dependente, sendo mais eficaz a dose de 6 nmol. Entretanto, no PVN apenas a dose maior de GR obteve êxito em causar hiperfagia e aumento na magnitude da ingestão de alimento, sem interferir na latência para iniciar a resposta ingestiva. A administração de 8OH não modificou nenhum dos aspectos avaliados pertinentes à ingestão de alimento. O comportamento de ingestão de água foi modificado pela injeção de GR no PMH. Ambas as doses induziram uma resposta dipsogênica e provocaram uma redução na latência para

iniciar a ingestão de alimento, mais eficazmente na dose de 0,6 nmol, mas somente a dose de 6 nmol retardou o término dessa resposta. O tratamento realizado com a MET não alterou a ingestão hídrica em nenhum dos sítios investigados. Porém, a administração de 8OH no PVN induziu um aumento significativo na latência para iniciar o consumo de água. Os efeitos provocados pelas drogas administradas foram estritamente relacionados ao comportamento ingestivo, uma vez que não houve alterações nos comportamentos não ingestivos. Concluindo, o presente estudo indicou a presença dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1B/1D} no PMH e no PVN envolvidos com a regulação da ingestão de alimento e de água (a última somente no PMH) em pombos, interferindo nos processos de saciação e de saciedade.

Palavras-chave: PMH (hipotálamo posterior medial), PVN (núcleo paraventricular), ingestão de alimento, receptor 5-HT_{1B/1D}, *Columba livia*.

ABSTRACT

In this study, we investigated the presence of serotonergic receptors in the posterior medial hypothalamus (PMH) and in the paraventricular nucleus (PVN) which are involved in the neural control of food and water intake in satiated pigeons (*Columba livia*). For that purpose, the MET, the GR 46611 and the 8-OH-DPAT were administered in those hypothalamic sites, in order to identify the receptor subtypes which are present in those specific parts. Satiated animals were used, with guide cannula inserted near to the PMH and PVN where the injecting needle was inserted, which exceeded in 1,0; 1,7; 2,4; 3,1 and 3,8 mm the guide cannula. One week after the surgery, the pigeons were treated with vehicle (ascorbic acid 5%), MET (20 nmol), GR (0,6 and 6 nmol) or with 8OH (6 nmol), randomly. After the drugs administration, the animals returned to their cages, which contained water and food that had been previously measured. The behavioural record was made during 1 hour, in which the ingestion behaviour, related to the consumption of food and water (length and latency) and the noningestive behaviour as preening, locomotion, alert immobility and typical sleeping positions (length and latency) were evaluated. After 1 hour, the consumption of food and water was quantified. Data showed that the MET injection in the PMH elicited a hyperphagic response, coming along with an increase of meal length and reduction of latency to initiate the ingestion behaviour, compared with the values obtained with the vehicle injection. In the PVN the administration of MET evoked an increase in the quantity of food ingested, without changing the total length and the latency to initiate the ingestive behaviour. The treatment with GR 46611 in the PMH resulted in a similar response to that obtained with MET, in both doses used, and in a dose-depending manner, the 6 nmol dose was more effectual. However, in the PVN, only the greater GR dose obtained success in causing the hyperphagia and an increase of the magnitude of food intake, without interfering in the latency in order to initiate the ingestive response. The administration of 8OH didn't modify none of the evaluated aspects which were pertinent to the ingestion of food. The ingestion of water behaviour was modified by the GR injection in the PMH. Both doses induced a dipsogenic response and provoked a decrease in the latency to initiate water intake, more efficiently in the 0,6 nmol dose, but only the 6 nmol dose delayed the ending of that

response. The treatment made with MET didn't change the hydric ingestion in none of the investigated parts. However, the 8OH administration in the PVN induced a significant increase in the latency in order to initiate the water consumption. The effects provoked by the administered drugs were strictly related to the ingestive behaviour, since there was not any changings in the noningestive behaviour. Concluding, this study has pointed out the presence of 5-HT_{1B/1D} serotonergic receptors in the PMH and in the PVN, which were involved in the regulation of food and water intake (water ingestion only in PMH) in the pigeons, which also interfered in both the satiation and satiety processes.

Keywords: PMH (posterior medial hypothalamus), PVN (paraventricular nucleus), food intake, 5-HT_{1B/1D} receptor, *Columba livia*.

INTRODUÇÃO

Foi estabelecido nos anos 70 que o sistema serotoninérgico está envolvido com o controle da ingestão de alimento. Progresso subsequente na investigação sobre a farmacologia molecular de receptores da serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e o desenvolvimento de ligantes seletivos de receptores 5-HT auxiliaram no melhor entendimento sobre a função da 5-HT na regulação do comportamento ingestivo. Dos 14 sub-tipos de receptores correntemente descritos, os sub-tipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} são os que mais despertam interesse na regulação da ingestão de alimento. Devido ao desenvolvimento de agonistas, antagonistas e animais manipulados geneticamente, as funções desses receptores vem sendo elucidadas (Vickers e Dourish, 2004).

Há aproximadamente 10 anos os receptores 5-HT foram reconhecidos em termos de sequência de DNA (Barnes e Sharp, 1999). Entre as 7 classes de receptores serotoninérgicos identificados, a classe 5-HT₁ é composta por 5 sub-tipos: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} são caracterizados pela alta afinidade pelo 5-carboxamido-triptamina (agonista sintético); 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F} são caracterizados pela baixa afinidade por esse agonista, e todos os 5 subtipos apresentam uma afinidade nanomolar pelo ligando endógeno indolamina. Os genes que decodificam os receptores 5-HT₁ tem sido clonados em roedores e humanos, permitindo a demonstração de que todos são acoplados à super família das proteínas G com 7 domínios transmembranais hidrofóbicos. Todos os sub-tipos interagem com a proteína G $\alpha_i/G\alpha_o$, as quais inibem a adenilato ciclase e modulam efetores iônicos, tais como os canais de Cl⁻/K⁺ (Lanfumeij e Hamon, 2004).

Estudos farmacológicos tem caracterizado a natureza do efeito inibitório da 5-HT sobre o comportamento de ingestão de alimento. O hipotálamo medial é um local crítico na mediação da ação da 5-HT, mais especificamente o PVN (núcleo paraventricular do hipotálamo) e o VMN (núcleo ventromedial hipotalâmico) estão estritamente envolvidos no controle do balanço energético e juntos com o núcleo supraquiasmático (SCN), o qual determina o padrão circadiano da alimentação. A estimulação desses 3 núcleos com 5-HT

exógena ou drogas que liberam 5-HT endógena preferencialmente reduz a ingestão de carboidratos em animais com dieta livre, através de mecanismos de saciedade envolvidos com o término da refeição. Em contraste, a ativação dos auto-receptores potencializa a ingestão de alimento por inibirem a liberação de 5-HT (Leibowitz, 1990).

A descoberta do receptor da leptina e das vias peptidérgicas tem reconfirmado a função crucial do hipotálamo na regulação da ingestão de alimento e do balanço energético. O hipotálamo recebe informações relevantes através de conexões neurais com outras regiões do SNC, e possui receptores hormonais e sensores metabólicos presentes nos seus diferentes núcleos. A sua porção medial, e em menor proporção a parte lateral, recebem informações pertinentes ao estado metabólico interno relativas à depleção/repleção de estoques de energia. Outros núcleos específicos recebem informações sobre o estado comportamental, tais como ritmo circadiano, nível de atividade física, ciclo reprodutivo, estágio do desenvolvimento, bem como estressores iminentes (ex. luta ou fuga) e crônicos (ex. infecção), os quais podem potencialmente afetar a disponibilidade de energia a curto e longo prazo. Além disso, o hipotálamo, especialmente em seu aspecto lateral, recebe informações de áreas do cérebro envolvidas na aquisição, estocagem e recuperação de representações sensoriais de alimentos, experiências vividas relacionadas à alimentação, e o comportamento de iniciação de uma refeição e seleção de nutrientes (Berthoud, 2002). O hipotálamo está envolvido em muitos outros comportamentos, além da ingestão de alimento e de água, como os comportamentos sexuais, agressivos e defensivos, e também os comportamentos associados com a regulação da temperatura e defesa imune (Berthoud, 2002).

Várias revisões sobre os mecanismos neurais de controle da ingestão de alimento foram publicadas (Jeanrenaud e cols., 1992; Lawrence e cols., 1999; Schwartz e cols., 2000; Thibault e Booth, 1999); porém muitas são limitadas à visão farmacológica, molecular, metabólica ou hipotalamicocêntrica, e poucas levam em conta os sistemas neurais

envolvidos no controle da ingestão de alimento e do peso corporal (Berthoud, 2000; Watts, 2000), que envolvem o hipotálamo e circuitos específicos no cérebro e no tronco encefálico (TE).

A teoria do ponto fixo é a mais influente e debatida teoria sobre o controle do peso corporal. Ela sugere que, como a temperatura (T°) é controlada por um termostato, o peso corporal seria controlado por um mecanismo semelhante (adipostato) presente no hipotálamo. Esse mecanismo funcionaria da seguinte maneira: se um sinal proveniente do parâmetro controlado (T° ambiente, peso corporal ou gordura corporal) através de retroalimentação gerar um sinal de erro em um comparador (hipotálamo), ocorre um desvio do valor de referência ou ponto fixo, então, esse sinal de erro será usado para ativar mecanismos autonômicos que determinam o nível do parâmetro controlado (produção de calor ou dissipação no caso da T° ambiente, ingerir alimento ou gastar energia no caso da adiposidade), e dessa forma o sinal de erro retorna ao valor de referência habitual. O problema dessa teoria reside na identificação do sinal de retroalimentação. Embora a idéia de um marcador sensível ao próprio peso tenha sido abandonada pelos mais ávidos defensores da teoria do ponto fixo, eles ainda acreditam em um sinal que essencialmente informa o peso corporal (Berthoud, 2002). A leptina foi o primeiro candidato a ser esse sinal, mas parece que sozinha ela é relativamente débil em defender o peso corporal e o nível de adiposidade (Heymsfield e cols., 1999). A obesidade é disseminada, no entanto, apenas uma pequena parcela de obesos apresenta mutação na leptina ou no gene do receptor da leptina (Clement e cols., 1998). A resistência à leptina tem sido usada para explicar essa discrepância (Shek e Scarpace, 2000).

Outro problema da teoria do ponto fixo é a flexibilidade do sistema. Dependendo do estado interno ou externo prevalente, como ritmo circadiano e anual, gravidez e lactação, um novo estado estável será alcançado e defendido, novamente enfatizando o caráter multifatorial do processo de integração. Entre períodos de estado estável, longos períodos

de instabilidade podem ocorrer, durante os quais o peso corporal/adiposidade mudam consideravelmente (Berthoud, 2002). Nesse caso, o ponto fixo teria que ser, na verdade, ponto mutável.

A teoria do ponto fixo vem sendo abandonada, e a explicação mais plausível para a obesidade é uma interação entre um ambiente propenso à obesidade (Hill e Peters, 1998) e suscetibilidade genética (Ravussin e Bouchard, 2000); portanto é mais apropriado olhar o sistema de controle de forma global, e não somente para defeitos genéticos isolados, ou para uma parcela de hormônios e peptídeos hipotalâmicos. Outra explicação reside na evolução; no passado havia a necessidade de altos níveis de ingestão de alimento e conservação, para garantir a reprodução e a sobrevivência em um ambiente com baixa disponibilidade de alimento (Friedman, 1999). A nova visão prevalente reconhece os princípios de sistemas distribuídos (Grill e cols., 1990;Watts, 2000), redundância (Beck,2001) e um jogo dinâmico de suprimento e demanda (Woods e Stricker, 1999).

O aumento da ingestão de alimento (hiperfagia) engatilhado por um período de jejum é um simples e interessante exemplo de regulação da ingestão de alimento. O consequente retorno do peso corporal aos valores basais, acompanhada por uma recuperação gradual dos níveis normais de ingestão de alimento, mostra como o processo regulatório é ao mesmo tempo preciso e robusto. Para explicar esse fenômeno, Kennedy propôs em 1953 que sinais inibitórios gerados em proporção à gordura corporal atuam no cérebro para reduzir a ingestão de alimento. Ainda, quando a perda de peso é induzida por restrição calórica ocorre uma redução do nível desses sinais inibitórios, e a ingestão de alimento aumenta até que a deficiência de energia é corrigida. Porém esse modelo não explica como a ingestão de alimento é controlada durante as refeições individuais. Gibbs e Smith propuseram, 20 anos depois, que os sinais gerados durante uma refeição (chamados fatores de saciedade), incluindo peptídeos secretados pelo trato gastro intestinal (TGI),

providenciam a informação ao cérebro, o qual inibe a ingestão de alimento e leva ao término da refeição (ver Schwartz e cols., 2000).

Em mamíferos, o PVN representa um microcosmo dentro do hipotálamo, no qual vários sub-núcleos interagem com 3 sistemas efetores, o endócrino, autonômico e comportamental (Berthoud, 2002). É um centro integrador, no qual convergem muitas vias neurais que influenciam a homeostase energética, e ricamente suprido por projeções de NPY/AGRP, respectivamente neuropeptídeo Y e peptídeo relacionado ao agouti, e POMC/CART, respectivamente pró-opiomelanocortina e transcrito regulado por cocaína e por anfetamina, vindas do núcleo arqueado (ARC) e projeções de neurônios de orexina vindas da área hipotalâmica lateral (LHY) (Elmqvist e cols., 1998; Elmqvist e cols., 1999). Muitas aferências chegam ao PVN oriundas do TE, córtex e áreas límbicas (Luiten e cols., 1986). É rico em terminais contendo numerosos neurotransmissores, incluindo NPY, α -MSH (alfa-hormônio melanotrófico do melanócito), 5-HT, galanina, noradrenalina e peptídeos opióides; além disso o PVN é particularmente sensível aos efeitos desses neurotransmissores na alimentação e no gasto energético. O CRH (hormônio liberador de corticotropina) é expresso por neurônios no PVN que se projetam à eminência mediana (Arase e cols., 1998), e podem inibir os neurônios de NPY vindos do ARC.

A análise autorradiográfica do PVN de pombos mostra uma projeção PVN-medulo-espinhal cursando posteriormente ao hipotálamo lateral, tegmento mesencefálico ventrolateral até a ponte e o bulbo. Na ponte algumas fibras vindas do PVN terminam no locus coeruleus (LC); no bulbo as fibras se projetam fortemente ao NTS (núcleo do trato solitário) e em menor densidade ao núcleo motor dorsal do nervo vago (DMNX). Em adição à via meduloespinhal, esses estudos demonstraram que há projeções do PVN ao septo, diencéfalo (comissura palial anterior, núcleo talâmico dorsomedial, núcleo talâmico dorsolateral anterior, eminência mediana, hipotálamo medial e lateral) e no mesencéfalo (substância cinzenta periaquedutal (PAG) e núcleo intercolicular). Essas projeções

meduloespinhais e à eminência mediana sugerem que o PVN de pombos é homólogo ao PVN de mamíferos (Berk e Finkelstein, 1983).

O VMN em mamíferos é um grande núcleo hipotalâmico, considerado por muito tempo como “centro de saciedade”. Esse sítio apresenta conexões diretas com o PVN, o LHY (área hipotalâmica lateral) e o DMN (núcleo dorsomedial do hipotálamo) (Williams e cols., 2001). Adicionalmente, recebe aferências provenientes do TE (núcleo parabraquial e NTS) e da amígdala (Fulwiler e Saper, 1985). Projeta-se fortemente à PAG e outros núcleos reticulares do TE, e aos núcleos da zona medial hipotalâmica, evitando o hipotálamo lateral e zonas periventriculares (Canteras e cols., 1994; Saper e cols., 1976).

O VMN de pombos apresenta projeções à substância cinzenta se projetam para a coluna intermediolateral do segmento toracolombar da medula espinhal (Luiten e cols., 1987; Berk e Butler, 1981), local considerado o berço de neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso simpático (SNS) (ver Kuenzel e cols., 1999), porém não há evidências concretas de que exista essa projeção da PAG até a coluna intermediolateral em aves. Entretanto, lesão direta no VMN de mamíferos e aves rompe essa projeção longitudinal que envolve o componente simpático do SNC (ver Kuenzel e cols., 1999). Tem sido proposto, em um atlas mais recente, substituir a nomenclatura do PMH de aves por VMN, devido a possível homologia entre os dois núcleos (ver Kuenzel e Tienhoven, 1982). Neste trabalho realizado por Kuenzel e cols. em 1999 em nenhum momento é citado o PMH, somente o VMN, o que sugere que a mudança na nomenclatura seja um fato consumado.

A motivação para estudar intensamente o sistema serotonérgico reside no fato de que a 5-HT esteja envolvida de forma crucial no controle da ingestão de alimento. Manipulações farmacológicas que reduzem a neurotransmissão serotonérgica central estimulam a ingestão de alimento, enquanto que aumentos na atividade de circuitos centrais que liberam 5-HT inibem este comportamento (ver Blundell, 1986; Simansky, 1995; Weltzin e

cols., 1994). Os efeitos hipofágicos da 5-HT parecem ser mediados por diversos sub-tipos de receptores pós-sinápticos em circuitos hipotalâmicos (ver Bovetto e Richard, 1995; Glennon e Dukat, 1995; Samanin e Grignashi, 1996). Em linha com esses achados, um volume crescente de evidências aponta para a idéia de que alterações na atividade serotoninérgica central possam cumprir um importante papel na fisiopatologia de distúrbios da ingestão de alimento em humanos (Leibowitz, 1990; Weltzin e cols., 1994; Brewerton, 1995). A ação anorética da 5-HT ocorre principalmente aos 30-60 min após ser injetada e geralmente sem superalimentação compensatória nos intervalos seguintes (Fletcher e Burton, 1984; Montgomery e cols., 1986; Edwards e Stevens, 1989).

Pesquisas realizadas em mamíferos têm estabelecido a existência de uma rede neuronal presente no hipotálamo e que regula a homeostase energética. Porém, não se sabe se esse sistema tem sido conservado na evolução filogenética (Singh e cols., 2003). Para tanto, se faz necessário investigar outras espécies, além de mamíferos, a fim de encontrar semelhanças e diferenças entre os sistemas de controle, saber o que há em comum entre eles, o que foi preservado. Baseados nisso, podemos ter uma noção do que foi relevante durante os milhões de anos de evolução, provavelmente alguma estratégia que funcionou muito bem, e se manteve no decorrer de todo esse tempo, com um objetivo único: a preservação das espécies.

O envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} no comportamento ingestivo foi primeiramente sugerido por Dourish e cols., em 1985; eles observaram que a administração do agonista seletivo 8OH aumenta a ingestão de alimento em ratos. Essa resposta foi considerada paradoxal, pois é sabido que a 5-HT tem um efeito inibitório sobre a alimentação. A explicação para este efeito hiperfágico reside no fato de que os receptores 5-HT_{1A} possam ser auto-receptores (Dourish, 1992). Ainda, pequenas doses de 8OH tem um efeito seletivo sobre os auto-receptores localizados nos núcleos da rafe, diminuindo o disparo neuronal e a síntese e liberação de 5-HT, tanto localmente como em regiões

FLUXOGRAMA DOS EFEITOS INGESTIVOS DA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES DA 5-HT POR INTERMÉDIO DE AGONISTAS E DE ANTAGONISTAS SEROTONÉRGICOS E SUAS POSSÍVEIS LOCALIZAÇÕES

Receptor	Localização (mamíferos)	Localização (aves)	Droga	Efeitos ingestivos (mamíferos)	Efeitos ingestivos (aves)	Referências bibliográficas
5-HT _{1A}	Pré-sináptico (rafe) Pós-sináptico (outras regiões cerebrais)	Idem mamíferos	8-OH-DPAT (agonista)	Hiperfagia	Nenhum (presente estudo)	Dourish e cols., 1992.; Gleeson e cols., 1992.
5-HT _{1B/1D}	?	Pré-sináptico	GR 46611 (agonista)	?	Hiperfagia	Silva, 2003; Silva e cols., 2004.
5-HT _{1A/1B}	Pós-sináptico (5-HT _{1B})	?	RU 24969 (agonista)	Hipofagia	?	Dourish e cols., 1986; Kennett e cols., 1987.
5-HT _{1B}	Pós-sináptico	?	CP 93,129 (agonista)	Hipofagia	?	Macor e cols., 1990.
5-HT _{1B}	Pós-sináptico	?	CP 94,253 (agonista)	Hipofagia	?	Lee e cols., 2004.
5-HT _{1B}	Pós-sináptico	?	SB 224289 (antagonista)	Hiperfagia	?	Lee e cols., 2004.
5-HT _{2C/1B}	Pós- sináptico	?	m-CPP (agonista)	Hipofagia	?	Hikiji e cols., 2004.
5-HT _{1/2}	?	Pós-sináptico	MET (antagonista)	?	Hiperfagia	Silva, 2001; Silva, 2003.
5-HT _{1B} (deleção)	Pós- sináptico	?	-	Hiperfagia	?	Lee e cols., 2004.

(?) significa ausência desses dados nos trabalhos citados no presente estudo.

terminais (Dourish e cols., 1986; Dourish e cols., 1986; Hutson e cols., 1986; Kennett e cols., 1987).

Os receptores 5-HT_{1A} envolvidos com o controle da ingestão de alimento estão localizados na porção somatodendrítica de neurônios 5-HT nos núcleos dorsal e mediano da rafe. Ensaios de ligante-receptor mostraram a presença desses receptores em várias regiões cerebrais e localizados em terminais de 5-HT, no entanto, ao contrário da rafe, eles seriam pós-sinápticos e não pré-juncionais (ver Dourish, 1992).

Assim como os receptores 5-HT_{1A}, os receptores 5-HT_{1B} também tem importantes funções como auto e heteroreceptores, controlando a liberação de 5-HT e de outros neurotransmissores/moduladores no SNC. Estudos mostraram que esses receptores são densamente expressos no globo pálido, subiculum e substância negra, e moderadamente expressos no hipocampo, caudado-putâmen e córtex. Os receptores 5-HT_{1B} foram encontrados preferencialmente em axônios, terminais axônicos, membranas plasmáticas de terminais axônicos não-mielinizados e plasmalema. O fato destes receptores estarem localizados em membranas de terminais axônicos sugere que eles controlem a liberação de 5-HT e de outros neurotransmissores tanto em neurônios serotoninérgicos, como em não-serotoninérgicos, respectivamente (Sari, 2004). A exemplo disso, a regulação da liberação de GABA mediada por receptores 5-HT_{1B} foi achada em projeções do caudado-putamen ao globo pálido. O controle da liberação de glutamato por intermédio de receptores 5-HT_{1B} foi encontrada em projeções do hipocampo ao subiculum. Adicionalmente, o controle da liberação de 5-HT através desses receptores foram mostradas em projeções vindas dos núcleos da rafe ao córtex (Sari, 2004). E por estarem presentes em locais extra-sinápticos surgem novas evidências para a difusa transmissão serotoninérgica no SNC (Riad e cols., 2000).

De um modo geral, parece que os efeitos da ativação de receptores 5-HT_{1B} em ratos provoca hipofagia. O agonista 5-HT_{1A/1B} RU 24969 reduziu a quantidade de alimento ingerido de maneira dose-dependente em ratos saciados (Dourish e cols., 1986; Kennett e cols., 1987) e em privados de alimento (Bendotti e Samanin, 1987), esses dados sugerem que os efeitos hipofágicos induzidos pelo RU 24969 foram mediados pelos receptores 5-HT_{1B} (Dourish e cols., 1986; Kennett e cols., 1987), uma vez que a ativação de receptores 5-HT_{1A} provoca hiperfagia (como já citado anteriormente). Esses resultados foram confirmados com o uso de antagonistas tais como a MET (não-seletivo 5-HT_{1/2}), o pindolol e cianopindolol (antagonistas 5-HT_{1A/2A}), os quais bloquearam a resposta hipofágica induzida pelo RU 24969, e ao contrário, não foi afetada pelo antagonista de receptores 5-HT_{2A/2C} ketanserina, pelo antagonista 5-HT_{1A/2} espiperona, nem pelo antagonista dopaminérgico haloperidol (Kennett e cols., 1987).

Os receptores 5-HT_{1B} que medeiam a inibição da ingestão de alimento induzida pelo RU 24969 parecem estar localizados pós-sinapticamente, pois essa resposta é aumentada pela depleção de 5-HT induzida pelo PCPA (Kennett e cols., 1987). Adicionalmente, a infusão de CP-93,129, um agonista 5-HT_{1B} cem vezes mais seletivo que o RU 24969, no PVN de ratos diminuiu a ingestão de alimento (Macor e cols., 1990), reforçando a tese de que esses receptores desempenham um papel inibitório no controle neural da ingestão de alimento em ratos (Hutson e cols., 1988).

A localização dos receptores 5-HT_{1B} no hipotálamo de ratos foi avaliada através de estudos imunocitoquímicos. A imunorreatividade a esse receptor foi achada distribuída por todo hipotálamo, especialmente em núcleos magnocelulares, núcleo supraóptico (SON), PVN, perifornical acessório e núcleos retroquiasmáticos. Neurônios magnocelulares mostraram uma marcação intensa sugerindo alta densidade de receptores 5-HT_{1B} nessa região. A imunofluorescência com dupla marcação revelou que a distribuição desses

receptores no PVN, ARC e SON é localizada próxima a rede de fibras imunorreativas ao NPY (Makarenko e cols., 2002).

Animais com deleção do receptor 5-HT_{1B} comem mais e são mais fortes que os selvagens. A administração do agonista seletivo do receptor 5-HT_{1B} CP 94,253 reduziu a ingestão de alimento em camundongos selvagens deprivados, de maneira dose-dependente, e de efeito específico no comportamento alimentar. Esses efeitos foram ausentes nos transgênicos e nos selvagens previamente tratados com o antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1B} SB 224289. Esse antagonista administrado sozinho aumentou a ingestão de alimento e retardou o término da refeição no animal selvagem; um efeito similar ocorreu em nocautes, uma vez que eles não possuem o receptor 5-HT_{1B}, e como a droga não produziu um efeito específico, eles se mantiveram hiperfágicos, quando comparados com os selvagens. O CP 94,253 induziu c-fos em uma vasta gama de estruturas implicadas na expressão do comportamento alimentar em animais selvagens. Esses resultados indicam que a ativação dos receptores 5-HT_{1B} faz parte do mecanismo endógeno de saciação no camundongo (Lee e cols., 2004).

A regulação da ingestão de alimento em aves representa um complexo mecanismo homeostático envolvendo múltiplos níveis de controle. Seleção genética (galinhas selecionadas para ovoposição ou crescimento rápido), estado nutricional, conteúdo calórico de dietas, seleção de macronutrientes, fazem parte desse controle, aumentando ou diminuindo o consumo de alimento (Denbow, 1999, Denbow e cols., 1983). Neurotransmissores clássicos como a 5-HT induziram um efeito anorexigênico em aves (Broilers, Leghorns, pardais) (Denbow, 1999) e em pombos (Steffens, 1999, Steffens e cols., 1997).

Estudos executados em nosso laboratório mostraram que administração de MET no PVN de pombos saciados aumentou a quantidade de alimento ingerido, e retardou o término

da refeição, sem alterar a latência para iniciar o comportamento ingestivo (Silva, 2001). Estudos subsequentes mostraram que a administração do antagonista MET (20 nmol) e de GR 46611, agonista de receptor 5-HT_{1B/1D}, nas doses 0,6 e mais eficazmente 6 nmol, na APV (área pré-óptica ventral) de pombos provocou hiperfagia acompanhada por aumento na magnitude do comportamento alimentar, sem induzir alterações na latência para iniciar esse comportamento. Adicionalmente, a injeção de 8OH na dose de 6 nmol não alterou nenhum aspecto da ingestão de alimento; a MET, o GR e o 8OH não modificaram a ingestão hídrica na APV (Silva, 2003), nem a MET no PVN (Silva, 2001).

Além de receptores 5-HT_{1A} (Gleeson e cols., 1992, Mansbach e cols., 1988), o SNC de pombos também apresenta receptores 5-HT_{1D} (Waeber e cols., 1989, Waeber e cols., 1990), os quais são estrutural e farmacologicamente similares aos achados em outros vertebrados, incluindo humanos, porém são diferentes dos receptores encontrados em roedores (Barnes e Sharp, 1999, Hartig e cols., 1996). A classificação dos receptores 5-HT_{1B/1D} foi revisada, agora o receptor 5-HT_{1B} é chamado de r5-HT_{1B} (para ratos e camundongos), e o receptor 5-HT_{1Dβ} (macacos, cobaias e humanos) mudou para 5-HT_{1B}. O receptor 5-HT_{1Dα} se tornou 5-HT_{1D} (Hjort e cols., 1995, Hoyer e Middlemiss, 1989, Mitchell e cols., 2001, Starkey e Skingle, 1994). Essas diferenças estruturais e farmacológicas dos receptores 5-HT_{1B/1D} sugerem que a circuitaria serotoninérgica seja distinta entre as espécies.

A função dos receptores 5-HT_{1B} no controle da ingestão de alimento tem sido amplamente investigada em roedores, porém o estudo do envolvimento de receptores 5-HT_{1B/1D} na regulação do comportamento ingestivo em não-roedores é escasso.

O aspecto menos compreendido concernente à ingestão hídrica é a ligação fisiológica entre a ingestão de alimento e de água. Em ratos, a ingestão de água é temporária e quantitativamente associada com a ingestão de alimento, tanto no decorrer do período noturno (ativo) como em se tratando de refeições individuais (Johnson e Johnson,

1997). Cerca de 75% da ingestão de água diária ocorre 10 min antes, durante e até 30 min após um episódio alimentar; e a quantidade de água consumida é correlata com a quantidade de comida ingerida (Johnson e Johnson, 1990; Fitzsimons e Le Magnen, 1969). Adicionalmente, assim como a ingestão de alimento, a ingestão de água também sofreria uma influência do ritmo circadiano (Johnson e Johnson, 1991).

Em aves, a regulação da ingestão de água parece ser similar à encontrada em mamíferos (Wilson, 1984; Thorton, 1986; Simon-Oppermann e cols., 1988). Em pombos o controle da ingestão de água parece estar associado com a ingestão de alimento. A privação total de água é seguida por uma importante redução no consumo de alimento em pombos, similarmente ao obtido em ratos (McFarland, 1964; MacFarland, 1967; Strubbe e cols., 1986).

Estudos realizados em nosso laboratório confirmam essa hipótese. De fato, houve correlação entre hiperfagia e polidipsia, em um experimento utilizando o agonista 8OH injetado intracerebroventricularmente em pombos deprivados por 24 h (Steffens e cols, 1997), mais tarde, em 1999 o mesmo pesquisador reproduziu esses resultados obtidos anteriormente. Estudos realizados por Häckl (2001), mostraram que injeções de 8OH em distritos pontomesencefálicos da rafe foram capazes de causar alterações no consumo de alimentos sólidos e água em pombos mantidos em dieta livre. Apesar disso, embora as injeções de 8OH tenham desencadeado aumentos significantes tanto na ingestão de alimento quanto na ingestão de água, os efeitos dipsogênicos foram mais intensos e consistentes que os efeitos hiperfágicos.

Dados recentes mostram que a injeção i.c.v de GR induziu uma resposta hiperfágica, sem modificar a ingestão de água (Silva e cols., 2004); a mesma droga injetada diretamente na APV provocou aumento da ingestão de alimento, sem induzir uma resposta dipsogênica (Silva, 2003).

A inervação serotoninérgica em telencéfalos de aves é distribuída e organizada de modo similar aos mamíferos (Metzger e cols., 2002). Existem neurônios serotoninérgicos encontrados no órgão paraventricular (PVO) de galinhas domésticas e outras espécies de aves (Sano e cols., 1983; Yamada e cols., 1984; Meurling e Rodriguez, 1990). O PVO contém três tipos de neurônios serotoninérgicos, e embora os axônios não possam ser traçados por longas distâncias, muitos processos ramificados finos foram observados em regiões distais e profundas, tais como a área hipotalâmica posterior (Hirunagi e cols., 1992).

A distribuição de pericários imunorreativos, fibras e terminais de 5-HT no cérebro de pombos foi investigada utilizando métodos de imunohistoquímica, imunofluorescência e transporte axonal retrógrado (Challet e cols., 1996). Foram encontrados 21 tipos diferentes de células imunorreativas, duas das quais no hipotálamo (órgão paraventricular e recesso infundibular) e 19 no mesencéfalo e rombencéfalo (sistema da rafe). Comparado com estudos prévios em outras espécies, a organização do sistema serotoninérgico em aves é muito parecida com o encontrado em mamíferos e répteis. Yamada e Sano, 1985 investigaram a distribuição das fibras serotoninérgicas no cérebro de galinhas (*Gallus domesticus*), e também encontraram um padrão similar ao obtido em mamíferos. Um grande número de fibras foi achado no tubérculo olfatório, núcleo taenie, septo, área pré-óptica, núcleo ventromedial hipotalâmico, núcleo dorsomedial hipotalâmico, núcleo mamilar, locus ceruleus, núcleo da rafe, órgão paraventricular, entre outros. No núcleo paraventricular (PVN) e no núcleo infundibular (NI) a distribuição das fibras foi mais esparsa.

JUSTIFICATIVA

Este projeto representa a continuidade de uma linha de pesquisa em andamento em nosso laboratório que investiga os sub-tipos de receptores serotoninérgicos envolvidos no controle neural da ingestão de alimento em pombos e seus substratos hipotalâmicos. Os resultados hiperfágicos obtidos por Sabi (2003) no PMH, Silva (2003) na APV e Silva (2001) no PVN através de manipulação farmacológica serotoninérgica sugerem que esses sítios contém receptores de 5-HT cuja ativação provoca efeitos ingestivos. O possível papel de circuitos serotoninérgicos em regiões médio-posteriores do hipotálamo sobre a ingestão de alimento ainda não foi investigado.

A ação anorética da 5-HT ocorre principalmente aos 30-60 min após ser injetada e geralmente sem superalimentação compensatória nos intervalos seguintes (Fletcher e Burton, 1984; Montgomery e cols., 1986; Edwards e Stevens, 1989). Em função disso, o registro comportamental foi realizado no período de 1 h, levando em consideração os efeitos agudos dos tratamentos utilizados sobre a ingestão de alimento.

Pesquisas realizadas em mamíferos tem estabelecido a existência de uma rede neuronal presente no hipotálamo e que regula a homeostase energética. Porém, não se sabe se esse sistema tem sido conservado na evolução filogenética (Singh e cols., 2003). Para tanto, se faz necessário investigar outras espécies, como aves, além de mamíferos, a fim de encontrar semelhanças e diferenças entre os sistemas de controle, saber o que há em comum entre eles, o que foi preservado. Baseados nisso, podemos ter uma noção do que foi relevante durante os milhões de anos de evolução, provavelmente alguma estratégia que funcionou muito bem, e se manteve no decorrer de todo esse tempo, com um objetivo único: a preservação das espécies.

A função dos receptores 5-HT_{1B} no controle da ingestão de alimento tem sido amplamente investigada em roedores, porém o estudo do envolvimento de receptores 5-HT_{1B/1D} na regulação do comportamento ingestivo em não-roedores é escasso.

O presente trabalho tem por objetivo investigar os substratos hipotalâmicos PMH e PVN e a possível presença dos sub-tipos de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} nesses sítios, envolvidos no controle serotoninérgico da ingestão de alimento em pombos, através da injeção intra-hipotalâmica do agonista seletivo do receptor 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT), agonista não-seletivo 5-HT_{1B/1D} (GR 46611) e do antagonista não-seletivo 5-HT_{1/2} (Metergolina). Adicionalmente, verificar se os efeitos provocados pelas drogas são especificamente relacionados ao comportamento de ingestão de alimento, sem interferir nos comportamentos não ingestivos.

1 ANIMAIS

Foram utilizados 54 pombos domésticos (*Columba livia*) adultos, de ambos os sexos, com peso entre 300 e 400 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Antes e após a cirurgia, os pombos foram mantidos em gaiolas individuais em uma sala própria para a manutenção das aves, no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS/CCB – UFSC), com água e ração à vontade. A iluminação foi mantida artificialmente através de lâmpadas fluorescentes com ciclo claro/escuro de 12/12 horas (período escuro iniciando às 19 horas), e temperatura controlada entre 22 a 25°. Os experimentos foram realizados respeitando-se os princípios éticos de experimentação animal, de acordo com o COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991). As gaiolas foram dispostas lado a lado, de modo que os animais permaneciam sem contato visual uns com os outros, apenas interagiam entre si pelos sons emitidos pelos mesmos.

2 INJEÇÕES NO HIPOTÁLAMO

2.1 Implantação da cânula-guia

Para implantação das cânulas-guia, primeiramente os pombos foram anestesiados com uma solução de Equitesin (0,15ml/100g) injetada via intraperitoneal. Quando os animais se encontravam com mínima sensibilidade, cortava-se o excesso de penas da cabeça e ao redor do canal auditivo. Nesses locais, aplicava-se o anestésico local por via subcutânea (cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor), acentuando a anestesia nesses pontos. Em seguida, as aves foram colocadas em um aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments), com a cabeça fixada por intermédio de barras posicionadas no conduto auditivo, cuidadosamente e com firmeza, sem permitir nenhum movimento lateral da cabeça. O bico foi amarrado com um barbante, para garantir que ele não se abrisse, o que é

imprescindível para manter a cabeça do animal numa angulação de 45°, necessária para que o hipotálamo seja atingido. Na sequência, colocava-se uma lâmpada acesa protegida próxima à ave para mantê-la aquecida. Uma incisão longitudinal foi realizada no escalpo, de modo a expor a calota craniana. Após a incisão, era importante raspar a superfície óssea, para retirar o perióstio e outras membranas ali presentes. Foi aplicado álcool iodado sobre a calota craniana para assepsia. Neste momento, observava-se a sutura sagital e a proeminência óssea caudal. À 3 mm de distância da proeminência óssea caudal foi feita a perfuração do osso com broca de uso odontológico; o orifício media aproximadamente 3 mm de diâmetro. Próximo a esta abertura, eram feitos dois furos para implantação de dois parafusos de aço inoxidável, cuja finalidade era a de fixar o cimento de acrílico autopolimerizável. Uma vez retirada parte da superfície óssea, o cérebro e parte do cerebelo (vérmis) ficavam expostos. Em seguida, foi marcada a posição para a perfuração e implantação da cânula-guia, cujas coordenadas utilizadas foram derivadas do Atlas estereotáxico para o cérebro de pombos (Karten e Hodos, 1967):

Plano frontal – 5 mm anterior à linha interneural

Plano sagital – 0,5 mm lateral à sutura sagital

Plano horizontal – 7 mm abaixo da dura-máter

Enquanto exposta a massa encefálica, era necessário umidecê-la com soro fisiológico 0,9%, evitando maiores danos à estrutura. Antes de implantar a cânula-guia, a dura-máter precisava ser perfurada com uma agulha, para que a cânula-guia não fosse desviada do seu trajeto. O orifício realizado na calota craniana foi preenchido com fibrina de plasma de sangue bovino (Fibrinol-Baldacci), protegendo a massa encefálica do contato direto com o acrílico autopolimerizável de uso odontológico colocado por cima do conjunto orifício e calota craniana. O acrílico forma uma estrutura sólida capaz de resistir aos eventuais impactos da cabeça com a gaiola, e era reforçado especialmente próximo à cânula-guia e aos parafusos, para garantir que não se soltassem no decorrer do

experimento. No final, retirava-se o animal cuidadosamente do estereotáxico, e ele retornava ao Biotério Setorial.

2.2 Confeção da cânula-guia

A cânula-guia media 15 mm de comprimento e ao seu redor era feito uma espécie de gancho no terço superior da cânula com aço aquecido, cujo propósito era reforçar a fixação da cânula. A cânula-guia era confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas, com 0,7 mm de diâmetro externo.

2.3 Injeções no hipotálamo

As injeções no hipotálamo foram realizadas por meio de uma agulha injetora (Mizzi-Slide-Park) introduzida na cânula-guia e conectada por um tubo de polietileno a uma microseringa Hamilton de 5 µl, a qual era preenchida com água destilada. A agulha injetora introduzida no interior da cânula-guia possuía 0,3 mm de diâmetro e excedia a mesma em 1; 1,7; 2,4; 3,1; e 3,8 mm. Com o objetivo de minimizar as variações na pressão intracerebral, as soluções foram administradas no período de 1 min, sendo que esse tempo era dividido em 4 fases; a cada 15 s 50 nl eram injetados, totalizando 1 min e 200 nl injetados, seguidos de mais 1 min de espera para retirar a agulha injetora. Para garantir que a droga realmente estava sendo injetada, era necessário observar uma bolha de ar se deslocando pelo tubo. Essa bolha se formava entre a solução contendo a droga e a água destilada.

2.4 Soluções administradas

a) Solução de ácido ascórbico 5%. Foram utilizados 200 nl desta solução no grupo controle.

b) Solução de N – CB2 - [(8 β – 1,6 Dimethylergolin – 8 - YL) – methylamine (metergolina, antagonista não-seletivo 5-HT_{1/2}) na dose de 20 nmol em 200 nl de ácido ascórbico 5%.

c) Solução de (3 - [3 – (2 – Dimethylaminoethyl) – 1H – indol – 5 – YL] – N – (4 – mehoxybenzyl acrylamide) (GR 46611, agonista 5-HT_{1B/1D}) na dose de 0,6 e 6 nmol em 200 nl de ácido ascórbico 5%.

d) Solução de 8 – hidroxi – 2 (di – n – propilamino) tetralin (8-OH-DPAT, agonista 5-HT_{1A}) na dose de 6nmol em 200nl de ácido ascórbico 5%.

A droga mencionada no item (b) foi adquirida do SIGMA – Chemical Co., St. Louis, Mo, USA; no item (c) da TOCRIS – Tocris Cookson Inc., Ballwin, Mo, USA; no item (d) da RBI – Research Biochemicals International, Natick, MA, USA, e o item (a) foi adquirida no comércio local.

2.5 Esquema experimental

Os procedimentos experimentais foram iniciados 7 dias após a implantação da cânula-guia e eram realizados no período entre 13:00 e 17:00 h.

Foram utilizados pombos saciados (com alimento e água à vontade). Os animais recebiam no primeiro ponto de injeção (1mm ventral à cânula-guia) o tratamento com metergolina na dose de 20 nmol. Em seguida, em um ponto localizado 0,7 mm mais profundo que o anterior, foi administrado novamente a metergolina (20 nmol), e assim sucessivamente, até exceder em 3,8 mm a cânula-guia, sendo este o último ponto de injeção. Nos pontos em que a aplicação de metergolina provocava um consumo de ração maior ou igual a 4g (Hagemann e cols., 1998), ou se a latência para iniciar este consumo fosse menor que 10 min (mesmo que o animal se alimentasse menos do que 4 g conforme protocolado por Silva, 2003), foram aplicados: ácido ascórbico 5%, GR (0,6 e 6 nmol) e 8-OH-DPAT (6nmol), aleatoriamente. Foi dado um intervalo de no mínimo 48 h entre cada sessão experimental. Imediatamente após as injeções, as aves retornavam as suas gaiolas,

contendo comedouro com 200g de ração e bebedouro com 100 ml de água previamente pesados. Em seguida, era feito o registro comportamental por meio de observação direta e sistemática dos comportamentos emitidos pelo animal. Ao final de 1 h de observação, o consumo de alimento e água era mensurado pela diferença entre a quantidade inicial e final. As mudanças do conjunto gaiola x pombo que eventualmente fossem necessárias, geralmente para melhorar a visualização do animal, eram feitas sempre no mínimo 2 h antes da observação, por conta da habituação da ave em seu novo local.

2.6 Registro comportamental

A categorização comportamental teve como objetivo verificar se uma possível alteração na ingestão de alimento ou de água não seria consequência de modificações no quadro comportamental emitido pelo animal, induzido pela droga utilizada. Também teve o propósito de verificar possíveis interações com outros animais presentes no Biotério no momento do registro e/ou qualquer alteração no ambiente que pudesse afetar o seu comportamento. O registro e a monitorização visual foram feitos através de uma janela de vidro pequena, de modo que o animal era observado sem que percebesse a presença do observador. Ao final do registro de 1 h, a duração, a frequência e a latência dos comportamentos eram quantificados em segundos.

Para analisar as possíveis mudanças comportamentais, foram levados em consideração a postura e os movimentos corporais executados pelo pombo:

- Auto limpeza: movimento de esfregar o bico (ou bicar) nas penas de qualquer parte do corpo, coçar a ponta da asa com a cabeça e algumas vezes bater de asas.
- Locomoção: qualquer deslocamento efetuado pelo animal na gaiola, ou alternância de sustentação do corpo pelas pernas.

- Parado alerta: o animal permanece imóvel com a cabeça elevada, olhos abertos e fixos com movimentos de piscar muito rápidos, sem fechar os olhos. Eram realizados movimentos exploratórios do pescoço, sem haver deslocamento do corpo.
- Posturas típicas de sono: o animal permanece com os olhos fechados, ou com piscadelas lentas, a cabeça fletida e apoiada sobre o peito. Apresenta retração do pescoço, penas do peito arrepiadas, eventualmente apoiado sobre uma das pernas ou deitado sobre o piso da gaiola ou no poleiro.
- Comer: comportamento de deglutição, quando o animal ingere o alimento sólido. Pode-se visualizar o alimento descendo pela garganta.
- Beber: movimentos rápidos com o bico associados à ingestão de água. O animal engole a água, absorve-a. Pode-se observar bolhas no bebedouro.

3 HISTOLOGIA

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com Equitesin e submetidos à perfusão transcardíaca com 0,9% de salina, seguido de formol 10%. Para verificar o posicionamento das cânulas-guia era injetado 100 nl de Azul de Evans. Essa injeção foi feita conforme descrito no item 2.2, porém apenas no primeiro ponto (1mm ventral à cânula), no terceiro ponto (2,4mm) e no quinto e último (3,8mm). Este corante marca fortemente o trajeto da cânula injetora, muitas vezes dificultando a visualização dos pontos de injeção ao microscópio óptico, por isso a opção foi injetá-lo em menos pontos e em menor quantidade, comparado com as injeções das drogas. Quando os animais se encontravam fortemente anestesiados, eles foram colocados em uma tábua de madeira disposta em declive, com a cabeça para baixo e as asas presas por fitas adesivas. Na sequência, foi feita uma abertura com tesoura abaixo do esterno, expondo a cavidade abdominal. As costelas foram cortadas bilateralmente, aumentando ainda mais a abertura toracoabdominal. Em seguida, retirou-se o pericárdio, uma fina membrana que recobre o coração, e colocou-se a agulha de perfusão aproximadamente no ventrículo esquerdo. Neste momento, foi injetada a

salina 0,9%, cortando-se o átrio direito para permitir o escoamento do sangue e, em seguida, o formol. Ao final desse procedimento, o cérebro foi separado cuidadosamente da calota craniana e imerso por 7 dias em formol a 10%. Após este período, as peças foram incluídas em ágar, posicionadas em um ângulo de 45°, de forma simétrica, o que é importante para que os cortes apresentem o posicionamento da cânula-guia e da cânula injetora, e que estejam representando corretamente o plano ântero-posterior no qual se encontra o hipotálamo. Os cortes foram feitos com fatias de aproximadamente 100 µm, em um vibrátomo (Campdem Instruments), montados em lâminas de vidro gelatinizadas, as quais passaram por secagem a temperatura ambiente por 7 dias e coradas pelo método de Nissl. Posteriormente (7 dias) foram observadas e analisadas no microscópio óptico (Olympus, BHS), onde o local da injeção foi determinado usando o Atlas de Karten e Hodos (1967), e com auxílio do Atlas de Kuenzel e Tienhoven (1982) e Berk e Finkelstein (1983) . A reprodução gráfica dos cortes e dos pontos de injeção analisados ao microscópio foi realizada manualmente a partir do Atlas de Karten e Hodos (1967).

4 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram analisados por meio de análise de variância de uma via (Statistica 5.0, 1998). A comparação entre os grupos foi feita pelo teste de Duncan. A duração e a latência dos comportamentos ingestivos e não ingestivos foram avaliados empregando-se uma análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis. Em todos os procedimentos, o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

1. LOCAIS ATINGIDOS PELA INJEÇÃO INTRA-HIPOTALÂMICA DE METERGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT EM POMBOS SACIADOS

Os locais atingidos pelos diversos tratamentos efetuados no hipotálamo foram obtidos a partir da análise ao microscópio óptico dos cortes histológicos de cérebros de pombos, conforme descrito em Material e Método. Em primeiro lugar foi efetuado tratamento com MET. Quando a resposta de ingestão de alimento enquadrava-se nos critérios descritos em Material e Método, eram executados os tratamentos posteriores com GR (ambas as doses) e 8OH. Assim sendo, em muitos animais foram feitas apenas as injeções de MET, devido ao fato de que esse antagonista serotoninérgico não provocou uma resposta hiperfágica ou uma curta latência para iniciar a resposta ingestiva. Foram utilizados no total 54 animais com cânulas-guia implantadas cronicamente, porém, o tratamento completo (MET, GR e 8OH) foi realizado em 25 animais, e nos demais 29 apenas foi injetada a MET. Desses 25 pombos com tratamento completo, 10 apresentaram as cânulas injetoras localizadas no hipotálamo posterior medial (PMH); 4 no núcleo paraventricular (PVN); 2 na área pré-óptica ventral (APV); 4 no núcleo dorsomedial anterior do tálamo (DMA); 2 na área hipotalâmica lateral (LHY); 1 no núcleo intersticial da estria terminal lateral (BSTNL); 1 na *ansa lenticularis* (AL) e 1 no tracto occipitomesencefálico (OM). De um modo geral, a administração de MET e ambas as doses de GR realizadas nos 10 sítios de injeção no PMH e nos 4 sítios de injeção no PVN provocaram alterações na ingestão de alimento e de água, incluindo resposta hiperfágica, aumento da duração do episódio alimentar e redução da latência para iniciar o comportamento ingestivo. Entretanto, a administração de 8OH não afetou o comportamento de ingestão de alimento (ver mais detalhes adiante). Nos 11 sítios de injeção restantes, os quais incluem a APV, o DMA, o BSTNL, a LHY, a AL e o OM não houveram respostas ingestivas significativas após a administração de MET, 0,6 e 6 nmol de GR e 8OH. Desses 29 animais com tratamento incompleto, ou seja, somente com injeções de MET, as cânulas injetoras atingiram: 3 sítios de injeção na AL; 2 sítios de injeção no núcleo rotundus (RT); 2 sítios de injeção no *stratum cellulare externum* (SCE); 1 sítio de

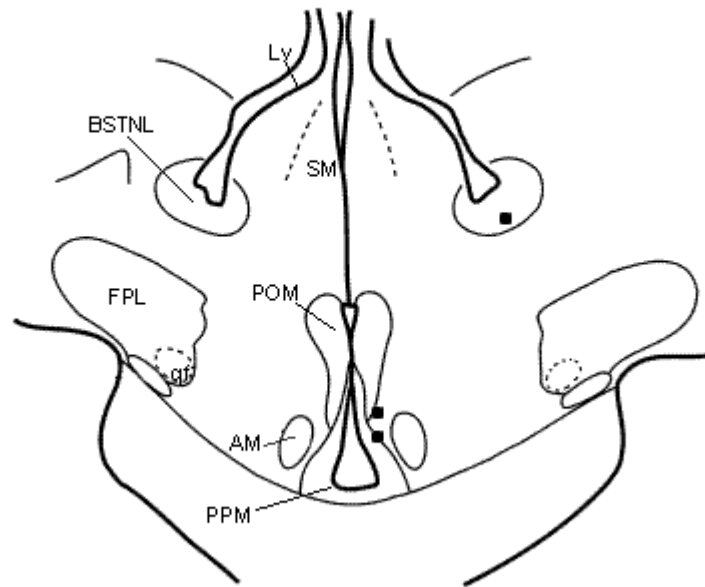
injeção no núcleo intercalado do tálamo (ICT); 2 sítios de injeção na APV. Nos demais 19 animais não foi possível determinar a localização dos pontos de injeção, devido aos cortes histológicos não apresentarem o trajeto da cânula-guia e/ou cânula injetora, impossibilitando a visualização dos sítios de injeção ao microscópio óptico (ver Materiais e Métodos). De qualquer forma, não houve respostas ingestivas significativas nessas aves.

Os locais atingidos pela injeção intra-hipotalâmica de MET, GR e 8OH podem ser visualizados na Fig. 1 (ver adiante), onde se encontram os sítios que geraram modificações no comportamento de ingestão de alimento (▲) e os que não modificaram o consumo alimentar (■).

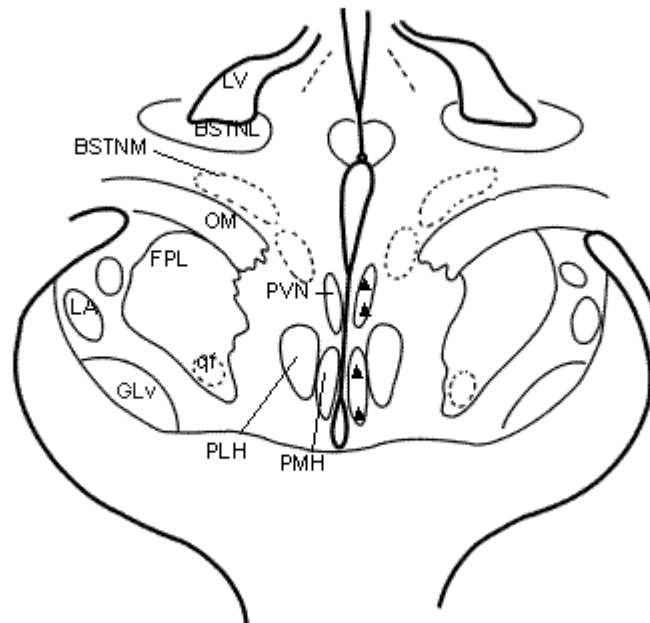
Lista de abreviaturas

AL	Ansa lenticularis
AM	Nucleus anterior medialis hypothalami
BSTNL	Núcleo intersticial da estria terminal lateral
BSTNM	Núcleo intersticial da estria terminal medial
DH	Hipotálamo dorsal
DMA	Nucleus dorsomedialis anterior thalami
FPL	Fasciculus prosencephali lateralis
GLv	Nucleus geniculatus lateralis, pars ventralis
HM	Nucleus habenularis medialis
IH	Núcleo inferior do hipotálamo
LA	Nucleus lateralis anterior thalami
LHY	Nucleus lateralis hypothalami
LV	Ventrículo lateral
NI	Nucleus infundibularis
OM	Tractus occipitomesencephalicus
OV	Nucleus ovoidalis
PHN	Nucleus hypothalami posterioris
PLH	Nucleus lateralis hypothalami posterioris
PMH	Nucleus medialis hypothalami posterioris
POM	Nucleus preopticus medialis
PPM	Nucleus preopticus paraventricularis magnocellularis
PVN	Nucleus paraventricularis hypothalami
qf	Tractus quintofrontalis
RT	Nucleus rotundus
SCE	Stratum cellulare externum
SM	Nucleus septalis medialis

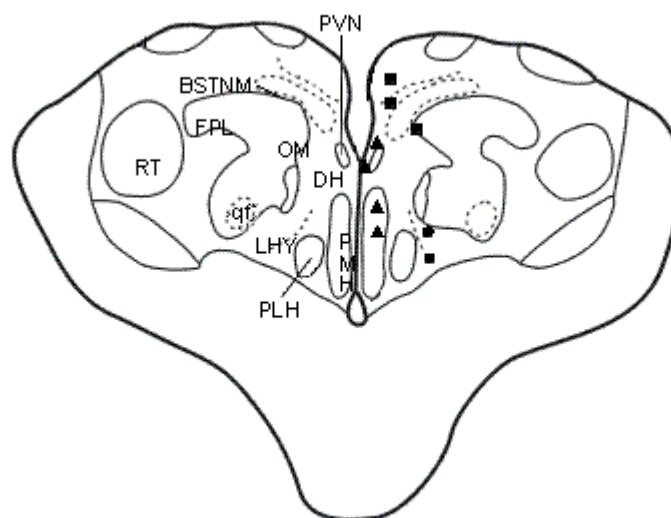
A 8.00



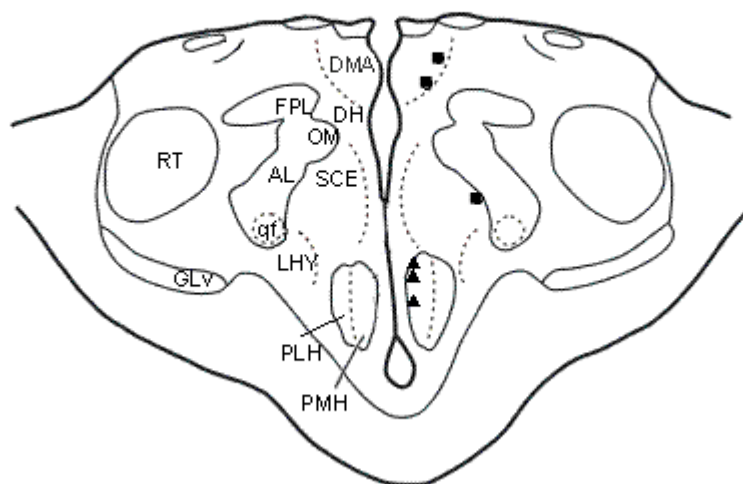
A 7.25



A 6.75



A 6.50



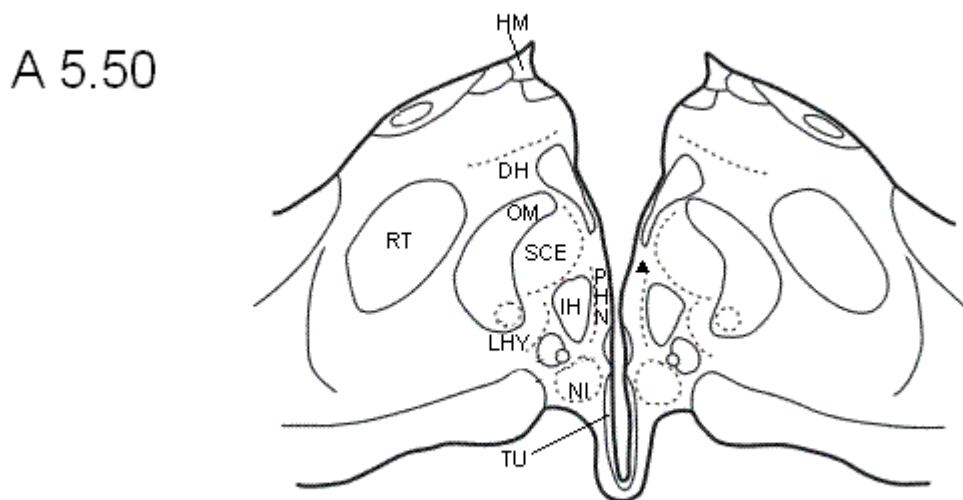
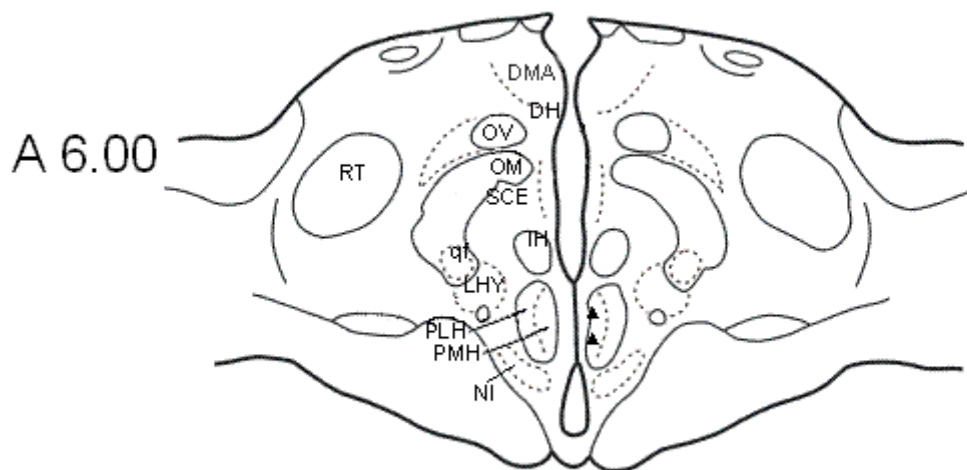


Fig. 1: Desenhos semi-esquemáticos representando cortes coronais do cérebro de pombo, ilustrando os locais onde as injeções de Metergolina (20 nmol) e 0,6 e 6 nmol de GR (▲) produziram aumento da ingestão de alimento. Também são apresentados os sítios nos quais nenhum tratamento modificou a ingestão de alimento de acordo com os critérios adotados (ver Materiais e Métodos) (■). Os caracteres alfa numéricos acima e à esquerda de cada corte indicam seu plano estereotático de acordo com o atlas de Karten e Hodos (1967). Ver abreviaturas na página 30.

2. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METERGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT NO PMH SOBRE A INGESTÃO DE ALIMENTO EM POMBOS SACIADOS

A ingestão de alimento foi alterada pelos diferentes tratamentos utilizados no PMH [$F(11,61)= 4,45$; $p=0,000001$], assim como a duração [$F(6,96)= 4,45$; $p=0,00018$] e a latência para iniciar a ingestão de alimento [$F(9,23= 4,45$; $p=0,000015$).

A injeção de MET no PMH provocou aumento na ingestão de alimento aproximadamente 17 vezes maior que o valor basal ($6,71 \pm 0,94$ g de alimento consumido após injeção de MET no PMH vs. $0,40 \pm 0,22$ g de alimento consumido após injeção de veículo no PMH; média \pm e.p.m., N =10 sítios de injeção no PMH). A administração de 0,6 nmol de GR induziu um consumo alimentar 10 vezes maior que a injeção de veículo ($4,18 \pm 0,72$ g de alimento consumido após injeção de 0,6 nmol de GR no PMH vs. $0,40 \pm 0,22$ g de alimento consumido após injeção de veículo no PMH; média \pm e.p.m., N =10 sítios de injeção no PMH). Após o tratamento com 6 nmol de GR o acréscimo atingiu 15 vezes o valor obtido no experimento controle ($5,87 \pm 0,90$ g de alimento consumido após injeção de 6 nmol de GR no PMH vs. $0,40 \pm 0,22$ g de alimento consumido após injeção de veículo no PMH; média \pm e.p.m., N =10 sítios de injeção no PMH). As injeções intra-hipotalâmicas de 8OH não modificaram significativamente a quantidade de alimento ingerido (Fig. 2).

A duração do comportamento ingestivo foi afetada intensamente pela administração de MET, GR 0,6 e 6 nmol diretamente no PMH. A duração da ingestão de alimento foi cerca de 11 vezes maior com uso de MET ($179,60 \pm 25,64$ s durou a ingestão de alimento após a injeção de MET no PMH vs. $15,90 \pm 8,67$ s durou a ingestão de alimento após a injeção de veículo no PMH; média \pm e.p.m., N=10 sítios de injeção no PMH). Após a administração de GR na dose de 0,6 nmol, a duração da ingestão de alimento superou 8 vezes a duração obtida após a injeção de veículo, e a dose de 6 nmol de GR provocou um aumento da duração proximamente a 11 vezes maior que os valores controle. Com relação à duração, os

resultados obtidos com a MET e a dose de 6 nmol de GR foram similares. A administração de 8OH no PMH não provocou alteração da duração do comportamento ingestivo (Fig. 2).

A resposta hiperfágica desencadeada pela administração de MET, 0,6 e 6 nmol de GR foi acompanhada por uma intensa redução na latência para iniciar a ingestão de alimento, principalmente após a administração de 6 nmol de GR ($357,10 \pm 90,67$ s para iniciar o primeiro episódio alimentar após a injeção de 6 nmol de GR no PMH vs. $3117,10 \pm 312,20$ s para iniciar o primeiro episódio alimentar após a injeção de veículo no PMH; média \pm e.p.m., N=10 sítios de injeção no PMH). Esse tratamento antecipou quase 9 vezes o início do primeiro episódio alimentar, ou seja, finalizou o período de saciedade precocemente. Tanto a MET como a dose de 0,6 nmol de GR reduziram a latência para iniciar o comportamento ingestivo ao redor de 2,5 vezes quando comparado ao grupo controle. A injeção de 8OH no PMH não afetou a latência para iniciar a ingestão de alimento (Fig. 2).

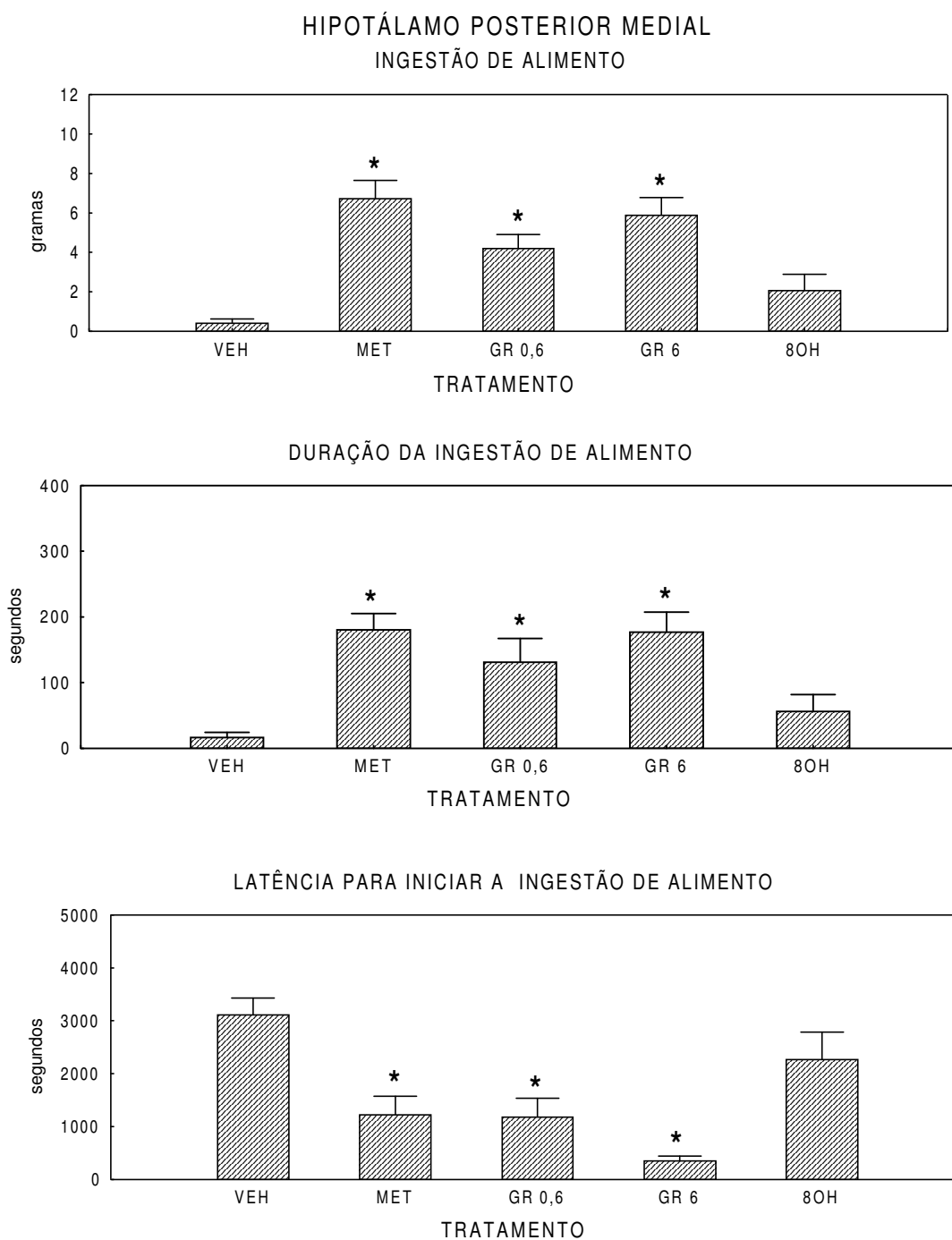


Fig. 2: Administração de veículo (VEH ác. ascórbico 5%), Metergolina (MET 20 nmol), GR 46611 (GR 0,6 e 6 nmol) e 8-OH-DPAT (8OH 6 nmol) no Hipotálamo Posterior Medial e seus efeitos sobre a ingestão, a duração e a latência para iniciar o comportamento de ingestão de alimento em pombos saciados. O registro comportamental foi realizado durante 1 h. Os dados representam a média \pm e.p.m de 10 sítios de injeção no PMH. O nível de significância adotado (*) foi $p < 0,05$ em relação ao veículo.

3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METERGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT NO PMH SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA EM POMBOS SACIADOS

A ingestão de água foi alterada pelos diferentes tratamentos utilizados no PMH [$F(3,97)= 4,45; p=0,0076$], assim como a duração [$F(2,95)= 4,45; p=0,029$] e a latência para iniciar a ingestão de água [$F(3,83)= 4,45; p=0,0091$].

A administração de 0,6 e 6 nmol de GR aumentou consideravelmente a quantidade de água ingerida ($10,86 \pm 2,14$ ml de água ingerida após a injeção de 0,6 nmol de GR no PMH; $8,19 \pm 1,86$ ml de água ingerida após a injeção de GR 6 no PMH vs. $1,59 \pm 1,06$ ml de água ingerida após a injeção de veículo no PMH; média \pm e.p.m., N=10 sítios de injeção no PMH). É interessante notar que houve aumento da ingestão de água 7 vezes maior após a utilização de 0,6 nmol de GR e 5 vezes maior com uso de 6 nmol de GR comparado com o consumo de água obtido após a administração de veículo. As injeções de MET e de 8OH no PMH não afetaram o comportamento dipsogênico sob nenhum dos aspectos avaliados (consumo, duração e latência para iniciar a ingestão de água). (Fig 3).

Após o tratamento com 6 nmol de GR houve um aumento na duração da resposta de ingestão de água, cerca de 43 vezes maior que o obtido após o tratamento com veículo ($147,50 \pm 72,93$ s após a injeção de 6 nmol de GR no PMH vs. $3,40 \pm 2,49$ s após a injeção de veículo no PMH; média \pm e.p.m, N=10 sítios de injeção no PMH). A administração de 0,6 nmol de GR não produziu mudanças significantes na duração da resposta de ingestão de água durante o período experimental (Fig. 3).

A latência para iniciar o comportamento de ingestão de água foi reduzida pela injeção de 0,6 e 6 nmol de GR, em torno de 3 e 3,5 vezes, respectivamente, comparado com o valor obtido após a injeção de veículo ($948,30 \pm 370,12$ s para iniciar o primeiro episódio

de ingestão de água após a injeção de 0,6 nmol de GR no PMH; $804,90 \pm 332,58$ s para iniciar o primeiro episódio de ingestão de água após injeção de 6 nmol de GR no PMH vs. $2940,00 \pm 440,87$ s para iniciar a ingestão de água após a injeção de veículo no PMH; média \pm e.p.m., N=10 sítios de injeção no PMH). De um modo geral, o animal bebeu mais, por mais tempo e mais cedo com a injeção de GR no PMH do que com os demais tratamentos utilizados nesse experimento (MET, 8OH e veículo). (Fig. 3)

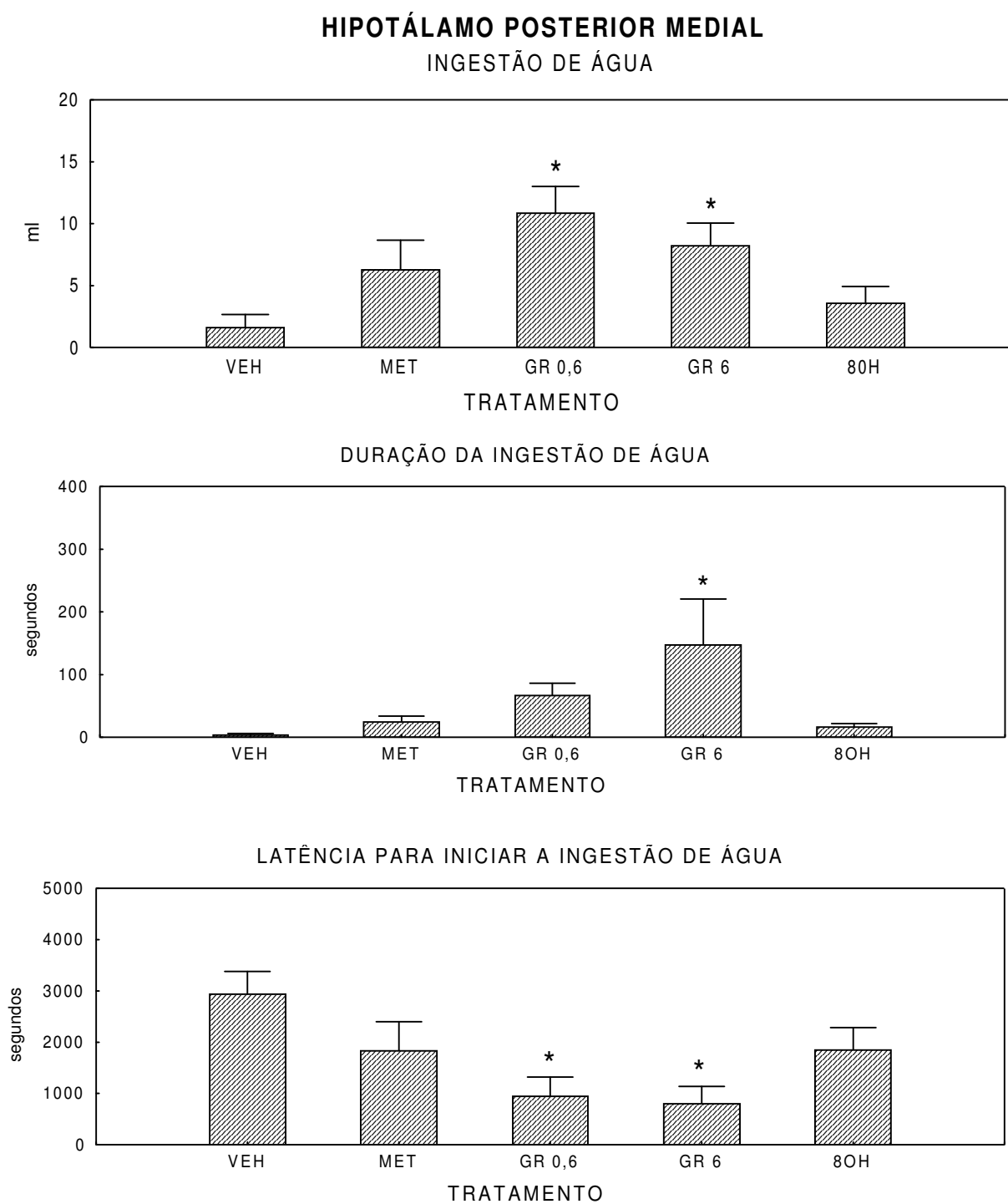


Fig. 3: Administração de veículo (VEH ác. ascórbico 5%), Metergolina (MET 20 nmol), GR 46611 (GR 0,6 e 6 nmol) e 8-OH-DPAT (8OH 6 nmol) no Hipotálamo Posterior Medial e seus efeitos sobre a ingestão, duração total e latência para iniciar o comportamento de ingestão de água em pombos saciados. O registro comportamental foi realizado durante 1 h. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 10 sítios de injeção no PMH. O nível de significância adotado (*) foi $p < 0,05$ em relação ao veículo.

4. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METERGOLINA, GR 46611, E 8-OH-DPAT NO PMH SOBRE OS COMPORTAMENTOS NÃO INGESTIVOS EM POMBOS SACIADOS

A análise estatística mostrou que não houve diferenças significantes nos comportamentos não ingestivos após a utilização dos diferentes tratamentos. As injeções de MET, 0,6 e 6 nmol de GR e 8OH não provocaram alterações na duração dos comportamentos de auto-limpeza, parado alerta, locomoção e posturas típicas de sono (Tab.1)

Tabela 1: Duração total (média \pm e.p.m., em segundos) dos comportamentos de auto-limpeza, locomoção, parado alerta e posturas típicas de sono, observados durante 1 h após a injeção de veículo (ác. ascórbico 5%), MET (20 nmol), GR (0,6 e 6 nmol) e 8OH (6 nmol), no PMH de pombos saciados. N=10 sítios de injeção no PMH.

Comportamentos	Veículo	MET 20 nmol	GR 0,6 nmol	GR 6 nmol	8OH 6 nmol
Auto-limpeza	627,30 \pm 188,65	729,50 \pm 183,47	514,00 \pm 134,98	565,00 \pm 138,54	892,70 \pm 192,48
Locomoção	124,60 \pm 85,89	151,30 \pm 49,25	102,80 \pm 33,90	103,70 \pm 26,60	149,20 \pm 50,45
Parado alerta	1130,60 \pm 156,38	887,20 \pm 201,00	764,10 \pm 129,89	670,10 \pm 171,27	1097,20 \pm 185,61
Posturas típicas de sono	1696,50 \pm 261,77	1628,20 \pm 190,44	2020,90 \pm 171,26	2025,80 \pm 197,68	1377,50 \pm 254,47

5. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METERGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT NO PVN SOBRE A INGESTÃO DE ALIMENTO EM POMBOS SACIADOS

A ingestão de alimento foi alterada pelos diferentes tratamentos utilizados no PVN [$F(4,87) = 4,15; p=0,01$]; a ANOVA não apontou diferenças significantes na duração do comportamento ingestivo, somente o teste de Duncan apontou diferenças após o tratamento com GR na dose de 6 nmol. Não houve diferenças estatísticas significantes na latência para iniciar o primeiro episódio de ingestão de alimento.

A injeção de 20 nmol de MET no PVN de pombos saciados provocou um aumento na quantidade de alimento ingerido de aproximadamente 3,5 vezes, quando comparado com o valor basal ($8,42 \pm 1,64$ g de alimento ingerido após a injeção de MET no PVN vs. $2,55 \pm 1,13$ g após a injeção de veículo no PVN; média \pm e.p.m., N=4 sítios de injeção no PVN). A injeção de 6 nmol de GR provocou um efeito semelhante à MET, aumentando 3,5 vezes a ingestão de alimento, quando comparado com a injeção de veículo ($8,65 \pm 0,87$ g de alimento ingerido após a injeção de 6 nmol de GR no PVN vs. $2,55 \pm 1,13$ g de alimento ingerido após a injeção de veículo no PVN; média \pm e.p.m., N=4 sítios de injeção no PVN). Contudo, as injeções de 0,6 nmol de GR e 8OH não alteraram a ingestão de alimento no PVN (Fig. 4).

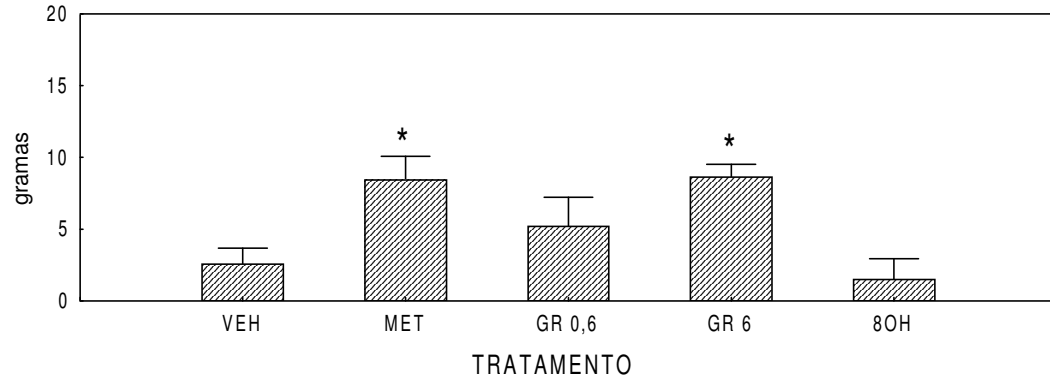
A resposta hiperfágica obtida pela injeção de 6 nmol de GR foi acompanhada por um aumento na duração do comportamento ingestivo. O período de consumo de alimento foi 6 vezes maior com uso de 6 nmol de GR do que após a injeção de veículo ($441,25 \pm 156,88$ s durou a ingestão de alimento após a injeção de 6 nmol de GR no PVN vs. $72,00 \pm 24,44$ s durou a ingestão de alimento após a injeção de veículo no PVN; média \pm e.p.m., N=4 sítios de injeção no PVN). Embora a injeção de MET tenha produzido uma resposta hiperfágica no PVN, houve apenas uma tendência de aumento na duração da resposta de ingestão de alimento, porém não estatisticamente significativa. A administração de 0,6 nmol

de GR e 8OH não provocaram nenhuma modificação significativa na duração do comportamento ingestivo (Fig. 4).

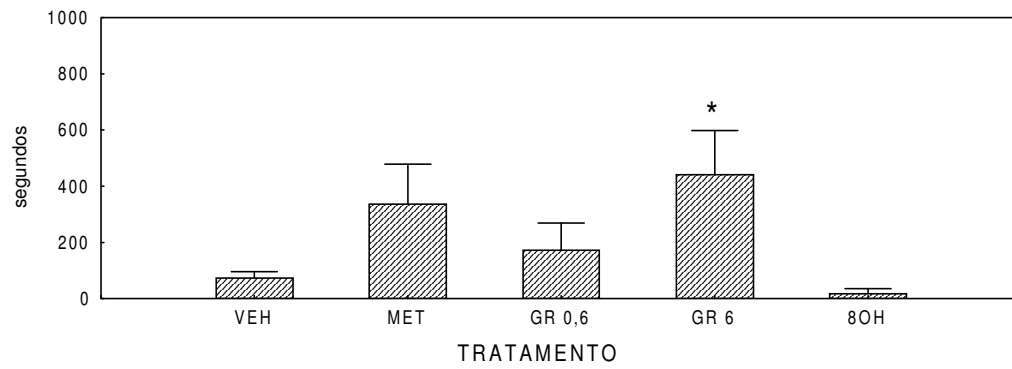
Os resultados apresentados na Fig. 4 indicam que não houve alteração na latência para iniciar a ingestão de alimento; os tratamentos efetuados no PVN não afetaram o início da resposta de ingestão de alimento em pombos saciados. Entretanto, houve uma tendência em reduzir a latência para iniciar a ingestão de alimento após o tratamento com ambas as doses de GR no PVN.

É importante ressaltar que o número da amostra no PVN (N=4 sítios de injeção) é pequeno, assim mesmo, os dados obtidos foram avaliados.

NÚCLEO PARAVENTRICULAR INGESTÃO DE ALIMENTO



DURAÇÃO DA INGESTÃO DE ALIMENTO



LATÊNCIA PARA INICIAR A INGESTÃO DE ALIMENTO

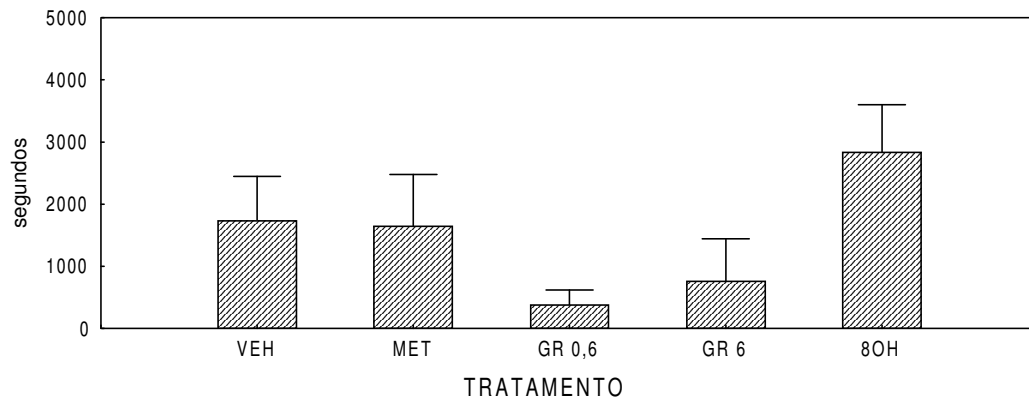


Fig. 4 Administração de veículo (VEH ác. ascórbico 5%), Metergolina (MET 20 nmol), GR 46611 (GR 0,6 e 6 nmol) e 8-OH-DPAT (8OH 6 nmol) no Núcleo Paraventricular e seus efeitos sobre a ingestão, duração e latência para iniciar o comportamento ingestivo em pombos saciados. O registro comportamental foi realizado durante 1 hora. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 4 sítios de injeção no PVN. O nível de significância adotado (*) foi $p < 0,05$ em relação ao veículo.

6. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METERGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT NO PVN SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA EM POMBOS SACIADOS

A análise estatística dos dados obtidos após a administração de MET, GR (0,6 e 6 nmol) , 8OH e veículo no PVN de pombos saciados mostrou que não houve diferenças no volume de água ingerido, na duração e na latência para iniciar o comportamento dipsogênico entre os tratamentos efetuados. Entretanto, após a administração de 8OH ocorreu a maior latência para iniciar a resposta de ingestão de água comparado com valores obtidos após a injeção de veículo, ou seja, o 8OH retardou significativamente o início do primeiro episódio dipsogênico ($3016,00 \pm 337,17$ s para iniciar o primeiro episódio de ingestão de água após a injeção de 8OH no PVN vs. $427,50 \pm 180,53$ s para iniciar o primeiro surto de ingestão de água após a administração de veículo no PVN; média \pm e.p.m., N=4 sítios de injeção no PVN). A ANOVA não apontou diferenças significantes na latência para iniciar a ingestão de água após o tratamento com o 8OH, somente o teste *post hoc* apontou essas diferenças. (Fig. 5).

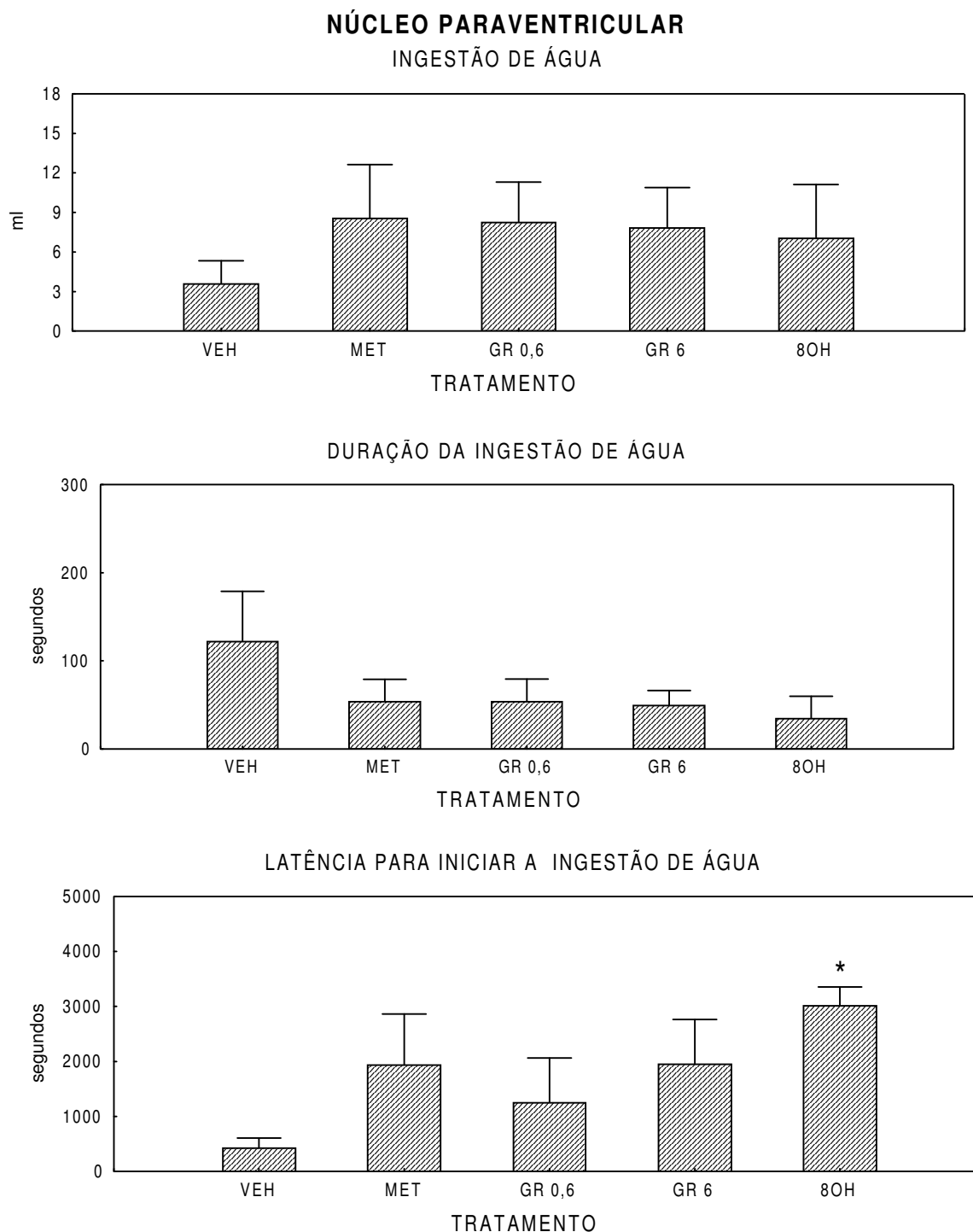


Fig. 5: Administração de veículo (VEH ác. ascórbico 5%), Metergolina (MET 20 nmol), GR 46611 (GR 0,6 e 6 nmol) e 8-OH-DPAT (8OH 6 nmol) no Núcleo Paraventricular e seus efeitos sobre a ingestão, duração e latência para iniciar a ingestão de água em pombos saciados. O registro comportamental foi realizado durante 1 h. Os dados representam a média \pm e.p.m., de 4 sítios de injeção no PVN. O nível de significância adotado (*) foi $p < 0,05$ em relação ao veículo.

7. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METERGOLINA, GR 46611 E 8-OH-DPAT NO PVN SOBRE OS COMPORTAMENTOS NÃO INGESTIVOS EM POMBOS SACIADOS

A análise de variância dos dados comportamentais não ingestivos não mostrou diferenças estatisticamente significantes na duração dos comportamentos de auto-limpeza, locomoção, parado alerta e posturas típicas de sono, após a administração de MET, GR (0,6 e 6 nmol), 8OH e veículo no PVN de pombos saciados (Tab. 2).

Tabela 2: Duração total (média \pm e.p.m., em segundos) dos comportamentos de auto-limpeza, locomoção, parado alerta e posturas típicas de sono, observados durante 1 h após a injeção de veículo (ác. ascórbico 5%), MET (20 nmol), GR (0,6 e 6 nmol) e 8OH (6 nmol), no PVN de pombos saciados. N=4 sítios de injeção no PVN.

Comportamentos	Veículo	MET 20 nmol	GR 0,6 nmol	GR 6 nmol	8OH 6 nmol
Auto-limpeza	571,75 \pm 157,43	565,00 \pm 109,84	393,75 \pm 225,09	571,25 \pm 147,34	489,00 \pm 116,62
Locomoção	350,50 \pm 261,55	218,00 \pm 78,61	146,25 \pm 41,65	464,25 \pm 171,86	70,56 \pm 31,05
Parado alerta	1811,00 \pm 167,66	1231,25 \pm 443,90	925,25 \pm 163,09	1090,50 \pm 292,98	1670,75 \pm 300,64
Posturas típicas de sono	790,75 \pm 132,42	1195,00 \pm 301,39	1817,50 \pm 115,09	1213,75 \pm 439,63	1253,00 \pm 408,67

Os resultados desse estudo indicam que injeções intra-hipotalâmicas de MET, um antagonista não-seletivo de receptores 5-HT_{1/2}, especificamente no PMH, induziram uma resposta hiperfágica seguida de aumento na duração total do consumo de alimento e redução na latência para iniciar o primeiro episódio alimentar. Esses dados sugerem que houve uma interação entre a MET e os receptores 5-HT_{1/2} presentes no PMH, impedindo a ligação da 5-HT com esses receptores, e esse bloqueio resultou em hiperfagia, indicando a participação de um sistema serotoninérgico tônico inibitório sobre neurônios do PMH envolvidos com o controle da ingestão de alimento em animais saciados.

A administração de MET no PMH afetou tanto a saciação (aumento da duração da ingestão de alimento) quanto a saciedade (redução da latência para iniciar o comportamento ingestivo). A saciação determina o tamanho da refeição e a saciedade determina o intervalo entre as refeições (Halford e Blundell, 2000). Esses dados sugerem que a injeção de MET no PMH alterou a sequência comportamental de saciedade, fazendo com que esses animais reduzissem o intervalo entre as refeições, comparado com os que foram tratados com veículo.

Outros trabalhos executados em nosso laboratório indicaram que a injeção de MET na APV (Área pré-óptica ventral) provocou aumento na duração da ingestão de alimento, sem alterar a latência para iniciar esse comportamento, em pombos saciados (Silva, 2003). Além disso, ainda no presente trabalho, a injeção intra-hipotalâmica de MET no PVN de aves saciadas provocou uma resposta hiperfágica, sem induzir alterações na duração e na latência para iniciar o comportamento ingestivo. Embora a amostra no PVN seja pequena (N=4), ela confirma os dados anteriores obtidos em nosso laboratório (Silva, 2001), mostrando que a injeção de MET na dose de 20 nmol no PVN de aves saciadas provoca hiperfagia e aumenta a duração da ingestão de alimento, mas não altera a latência para iniciar o consumo de alimento. Em doses menores (10 e 5 nmol) a MET não causa modificações na ingestão alimentar (Silva, 2001). Em linha com esses achados, a

administração de agonistas serotoninérgicos (5-HT, d-norfenfluramina e fluoxetina) no PVN causou hipofagia em ratos (Leibowitz and cols., 1998), e 5-HT em pombos (Silva, 2001).

É importante salientar que, o PVN de pombos, sendo um dos núcleos hipotalâmicos alvos desse estudo, parece ser homólogo ao PVN de mamíferos, pelas seguintes razões: localização topográfica do PVN, presença de neurônios magnocelulares e presença de neurônios vasopressinérgicos, ocitocinérgicos e de neuropeptídeos (ver Berk e Finkelstein, 1983). Quanto ao PMH de aves foi proposto em um atlas mais recente que sua nomenclatura fosse modificada para VMN (núcleo ventromedial hipotalâmico) (Kuenzel e Tienhoven, 1982); poder-se-ia afirmar que a sua localização neuroanatômica é análoga ao VMN de mamíferos, um núcleo estreitamente envolvido com o controle neural da ingestão de alimento em mamíferos (Berthoud, 2002) e também em aves (dados do presente trabalho). O núcleo arqueado (ARC) de mamíferos, um sítio hipotalâmico que possui os neurônios de 1ª ordem envolvidos no controle dos processos de saciação e saciedade (Schwartz e cols., 2000), poderia ter como homólogo em aves o núcleo infundibular (NI) (Mikami, 1986), devido à sua localização semelhante à de mamíferos, próximo à ME (eminência mediana). Além disso, estudos mostram que o NI de codornas japonesas contém populações de neurônios neuropeptidérgicos (AGRP, peptídeo relacionado ao gene agouti; POMC, pró-opiomelanocortina; α -MSH, alfa-hormônio melanotrófico do melanócito) envolvidos na regulação do balanço energético, tal qual o ARC de mamíferos (Singh e cols., 2003). Embora esse núcleo não tenha sido investigado diretamente em pombos, seria plausível que ele tivesse um papel semelhante no controle da ingestão de alimento nesses animais, como em codornas e mamíferos.

Os dados obtidos reforçam a tese de que existe um tônus serotoninérgico inibitório sobre neurônios centrais modificando o comportamento de ingestão de alimento, especialmente no estado saciado, tanto em aves como em mamíferos (Dourish e cols., 1988). Essa influência inibitória seria exercida sobre neurônios da APV (Silva, 2003), do PVN

(Silva, 2001) e do PMH (presente trabalho). Um modelo hipotético de integração de sinais de saciedade e de adiposidade tenta explicar como ocorre o controle da ingestão de alimento no eixo hipotálamo - tronco encefálico (TE) – trato gastrintestinal (TGI) em mamíferos. No ARC estão presentes populações de neurônios de 1ª ordem, os quais enviam projeções para locais onde se encontram os neurônios de 2ª ordem, tais como o PVN, o PFA (núcleo perifornical), LHY (área hipotalâmica lateral), VMN e DMN (núcleo dorsomedial hipotalâmico). A hipótese de que o ARC transduz a informação relacionada à sinalização da leptina, um hormônio produzido pelo tecido adiposo que informa o cérebro sobre os estoques de gordura corporal, reduz a ingestão de alimento e aumenta o gasto energético, é suportada pela resposta anoréxica obtida após a injeção de leptina no ARC, e a inabilidade de injeções i.c.v. reduzirem a ingestão de alimento após essa área ser destruída (ver Schwartz e cols., 2000). Ainda, a deficiência de insulina é capaz de ativar esses neurônios; há a presença de uma alta densidade de receptores de insulina no ARC (Baskin e cols., 1988). Em virtude dessas projeções do PVN, PFA e LHY ao ARC serem bidirecionais, esses locais não são apenas recipientes passivos do ARC, mas sim, esses neurônios de 2ª ordem são capazes de modificar ativamente a informação que chega até eles.

Esse é o modelo neuroanatômico das vias pelas quais os sinais de adiposidade (leptina e insulina) interagem com neurônios do ARC, e regulam o tamanho das refeições em mamíferos. O aumento dos níveis de leptina/insulina estimula os mecanismos catabólicos (neurônios anorexigênicos POMC e CART (transcrito regulado por cocaína e por anfetamina) e inibem os mecanismos anabólicos, os neurônios orexigênicos NPY (neuropeptídeo Y) e AGRP, originados no ARC. Esses neurônios do ARC projetam ao PVN, LHY e PFA, onde fazem conexões com os neurônios de 2ª ordem. Projeções neurais partem desses neurônios de 2ª ordem até o TE, onde provocam ajustes que interferem com o término da refeição. Os estímulos aferentes como a CCK (colecistocinina), GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon) são transmitidos pelo nervo vago e fibras simpáticas ao NTS (núcleo do trato solitário), onde são integrados com estímulos hipotalâmicos descendentes do PVN, LHY e

PFA. A resposta neuronal do NTS (núcleo do trato solitário) e outras regiões do TE leva ao término das refeições individuais, e são potencializadas pelas projeções catabólicas do PVN e inibidas pelas projeções anabólicas do LHY/PFA (Schwartz e cols., 2000). Então, é possível que os receptores de 5-HT presentes no PMH e no PVN possam ter exercido sua influência no TE e alterado o término da refeição.

O retardo no término da ingestão de alimento induzido pela injeção de MET no PMH, na APV e no PVN poderia ser derivado de processos localizados no ARC ou no TE, sendo que o ARC projeta suas fibras neurais ao PVN, PFA/LHY, prolongando a duração da refeição. Por outro lado, apenas no PMH (e não no PVN/APV) a injeção de MET alterou a latência para iniciar a alimentação, afetando o fenômeno da saciedade. Nesse caso, os sinais de saciedade provenientes da periferia (fígado, TGI, CCK) convergiram ao NTS, e sob influência hipotalâmica descendente, (ativação dos mecanismos anabólicos e inibição dos mecanismos catabólicos), reduziram o intervalo entre as refeições. Portanto, se o PMH é análogo ao VMN de mamíferos, então projeções do NI (análogo do ARC de mamíferos), sede dos neurônios de 1ª ordem, enviaria projeções para o PMH e ao PVN, locais onde se encontram os neurônios de 2ª ordem, os quais são sítios hipotalâmicos de pombos que possivelmente possuem receptores para a 5-HT envolvidos com a ingestão de alimento (Silva, 2001;Silva, 2003).

Os pesquisadores ainda não encontraram uma ligação direta entre a leptina e a 5-HT no controle da ingestão de alimento. Apenas há alguma evidência de que o precursor da 5-HT, o 5-HTP (5-hidroxitriptofano) produz um aumento dos níveis plasmáticos de leptina no camundongo (Yamada e cols., 1999). Inversamente, a administração de fluoxetina (inibidor da recaptação de 5-HT) de forma aguda e crônica reduz os níveis plasmáticos de leptina (Dryden e cols., 1999). Ainda, a deleção do receptor 5-HT_{2C} em camundongos (Tecott e cols., 1995) resultou em hiperfagia e obesidade, apesar da administração de leptina (Nonogaki e cols., 1998), sugerindo uma independência funcional entre ambos sistemas.

Além disso, a administração i.c.v de leptina em galinhas selecionadas para crescimento rápido e ovoposição induziu, de maneira dose-dependente, uma inibição da ingestão de alimento, sem alterar a ingestão hídrica, em ambos tipos de galinhas (Denbow e cols., 1999). É importante lembrar que esse modelo de controle dos sinais de adiposidade/saciedade presente no ARC e no TE foi estabelecido para mamíferos, e não há evidências na literatura mostrando a existência de um mecanismo de regulação semelhante em aves.

Para concluir esse assunto, experimentos realizados com ratos descerebrados (à nível supra-colicular) mostram que esses animais apresentavam respostas discriminativas ao sabor, eram sensíveis à retroalimentação negativa da ingestão de alimento exercida pelos sinais de saciedade provenientes do TGI e respondiam a diversos sinais aferentes viscerais. Entretanto, eram incapazes de discriminar o estado metabólico em que se encontravam, e portanto, não exibiam uma resposta hiperfágica ao jejum (Grill e Kaplan, 2002), o que sugere que o TE sozinho é capaz de regular o tamanho de refeições individuais, porém a homeostase energética dada pela regulação de estoques e gastos energéticos é resultado da participação de circuitos hipotalâmicos, tais como o presente no ARC, provavelmente interagindo direta ou indiretamente com o TE. Seria mais uma evidência para suportar a tese do modelo neuroanatômico de controle dos processos de saciação/saciedade em mamíferos.

O presente estudo mostrou que a administração de ambas as doses do agonista serotoninérgico GR 46611 no PMH de pombos saciados provocaram um aumento da ingestão de alimento, seguido de aumento na duração do episódio alimentar e redução na latência para iniciar o comportamento, interferindo tanto no fenômeno da saciação como da saciedade. O efeito do GR sobre a ingestão de alimento foi dose dependente, pois a resposta hiperfágica mais intensa foi obtida após a administração da dose 6 nmol de GR. Então, é possível que os receptores 5-HT_{1B/1D} estejam presentes no PMH e envolvidos com o controle da ingestão de alimento. Em ratos, um estudo utilizando microdiálise para

mensurar as concentrações de 5-HT extracelular e seu metabólito 5-HIAA (ácido 5-hidroxiindolacético) no córtex frontal (FC), VMN (análogo ao PMH) e LHY mostrou que, a perfusão de m-CPP (agonista 5-HT_{2C/1B}) inibiu o comportamento alimentar somente no VMN, e aumentou a concentração de 5-HT somente neste núcleo, indicando que os efeitos da ativação dos receptores 5-HT_{1B/2C} dependem da área cerebral analisada, e que eles exercem importantes funções no controle da ingestão de alimento no VMN (Hikiji e cols., 2004). Esses dados reforçam a tese de que, se o PMH de aves for homólogo ao VMN de mamíferos, então os receptores 5-HT_{1B/1D} estão presentes nesse sítio hipotalâmico e envolvidos com o controle do balanço energético, tanto em aves como em mamíferos. O fato da ativação dos receptores 5-HT_{1B/1D} terem um efeito inibitório sobre o comportamento alimentar em ratos será discutido mais adiante.

Entretanto, no PVN somente a dose maior de GR (6 nmol) administrada induziu uma resposta hiperfágica acompanhada de um aumento na magnitude do comportamento alimentar, sem alterar a latência para iniciar esse comportamento, nesse caso, interferindo apenas no fenômeno da saciação. Como já discutido anteriormente, foi mostrado que a administração de ambas as doses de GR no PMH alteraram tanto a saciedade como a saciação, sendo a primeira regulada possivelmente pela rede neuronal localizada no ARC, em resposta aos sinais circulantes de adiposidade, e sob influência de aferências vindas do TE, e a segunda possivelmente controlada pelo TE em resposta aos sinais de saciação (sinais oriundos da digestão dos alimentos, ativação de mecanorreceptores ou hormônios do TGI), sob influência hipotalâmica descendente. Entretanto, no PVN apenas o período de saciação foi prolongado, por um possível ajuste nos neurônios do TE que induzem o término da refeição.

O aumento da quantidade de alimento ingerido após o tratamento com 6 nmol de GR no PVN e no PMH foi similar ao obtido após a administração de MET. Esses dados mostram que o GR na dose de 6 nmol, reproduziu a resposta hiperfágica induzida pela MET,

tanto em intensidade, latência e duração. Pode-se sugerir que a MET tenha interagido com os mesmos receptores ativados pelo GR, os sub-tipos 5-HT_{1B/1D}, embora a MET atue em todos os receptores e os receptores 5-HT_{1B/1D} podem estar presentes tanto pré como pós sinapticamente (Pauwels, 1997).

Esses resultados sugerem que após a administração de GR ocorreu uma diminuição na transmissão serotoninérgica no PMH e no PVN, e que esses receptores 5-HT_{1B/1D} poderiam estar localizados pré-sinapticamente em terminais axônicos (escasso ou ausente no nível somatodendrítico) (Waeber e cols., 1990; Pauwels, 1997), e sua ativação levaria a uma diminuição do efluxo de 5-HT na fenda sináptica (Waeber e cols., 1990; Starkey e Skingle., 1994; Skingle e cols., 1995; El Mansari e Blier, 1996; Pauwels, 1997). Assim, a inibição da transmissão serotoninérgica no PMH e no PVN induzida pela administração de GR nesses locais resultou em hiperfagia, adiando os sinais que causam a saciação e antecipando os sinais que induzem a saciedade (este último efeito observado somente no PMH). De acordo com esses achados, o controle serotoninérgico no PMH e no PVN sobre a ingestão de alimento parece envolver a presença de receptores 5-HT_{1B} e/ou 5-HT_{1D}. Entretanto, não se pode excluir a participação dos receptores 5-HT_{1B} e/ou 5-HT_{1D} pós-sinapticamente, uma vez que eles também parecem funcionar como heteroreceptores (Morikawa e cols., 2000).

Os dados obtidos por Silva (2003) mostram que a administração de 0,6 nmol de GR e mais eficazmente a dose de 6 nmol desse agonista serotoninérgico, na APV de pombos saciados, foram capazes em induzir aumentos no consumo de alimento, além de aumentar a duração desse comportamento (afetando a saciação), sem que houvesse alterações na latência para o início do primeiro episódio de ingestão alimentar (sem efeitos sobre a saciedade). Esses achados estão de acordo com o presente trabalho no que diz respeito à resposta hiperfágica e a duração do comportamento ingestivo, segundo dados obtidos no PMH, mas diferem com relação à latência para iniciar o comportamento, a qual foi reduzida

nesse sítio. Com relação ao PVN, os resultados foram similares, exceto o fato de que o GR na dose de 0,6 nmol não modificou de forma alguma a ingestão de alimento nessas aves. (Ver discussão anterior sobre o possível controle dos processos de saciação e saciedade). Dessa forma, os receptores 5-HT_{1B/1D} presentes na APV, PVN e no PMH participam nos mecanismos que regulam o término da refeição, possivelmente promovendo ajustes no TE, de forma que os sinais do TGI induzem um aumento na duração da ingestão de alimento.

Resultados obtidos em nosso laboratório indicam que injeções i.c.v de GR 46611 na dose de 6 nmol provocaram efeitos hiperfágicos em pombos saciados, associados com aumento na duração do episódio alimentar e redução na latência para iniciar a ingestão de alimento (Silva e cols., 2004). Esses dados corroboram com o presente trabalho, mostrando resultados similares no PMH após o tratamento com o GR 46611, como o aumento da quantidade de alimento ingerido, com relação à saciação (aumento da duração total do comportamento) e com relação à saciedade (redução do intervalo entre as refeições). No PVN houve apenas o aumento do consumo de alimento e retardo no término da refeição. Como a via de administração foi i.c.v., então é possível que a droga tenha atingido vários distritos hipotalâmicos periventriculares de forma disseminada, incluindo o PVN e o PMH, entre outros.

Dados anteriores de nosso laboratório (Silva, 2003) mostram que as injeções de 0,6 e 6 nmol de GR provocaram um aumento no comportamento de auto-limpeza, que envolve uma intensa atividade orofacial. Estudos eletrofisiológicos mostraram que populações de neurônios dos núcleos dorsal e mediano da rafe são ativadas seletivamente durante movimentos orofaciais (mastigar, lamben e limpar a superfície do corpo com a língua) em gatos (Fornal e cols., 1996; Valle e cols., 1989). Esse comportamento foi investigado em galinhas (*Gallus gallus*); os animais com aumento da intensidade de auto-limpeza (bicar as penas) apresentavam um reduzido volume de 5-HT comparado com galinhas com reduzida intensidade de auto-limpeza (em resposta ao estresse agudo). A administração do agonista do auto-receptor 5-HT_{1A} S-15535 reduziu o volume de 5-HT em animais com alta e baixa

intensidade de auto-limpeza, e com isso aumentou a severidade desse comportamento nos animais com alta intensidade de auto-limpeza, sugerindo que ela pode ser engatilhada por uma diminuição na neurotransmissão da 5-HT (van Hierden e cols., 2004). No presente estudo não houve modificações no comportamento de auto-limpeza após a administração de ambas as doses de GR tanto no PMH quanto no PVN, portanto não se pode afirmar que a hiperfagia induzida pelo GR em pombos esteja relacionada com um aumento da facilitação de comportamentos orais.

Há evidências de que a ativação de receptores 5-HT_{1B/1D} por injeções sistêmicas de GR potencializa a atividade locomotora mediada por receptores 5-HT_{1A} em cobaias (O' Neill e Sanger., 1999), e outros agonistas desses receptores tais como RU 24969 e ainpirtolina aumentam a locomoção em camundongos (O' Neill e cols., 1996; O' Neill e cols., 1997) e em ratos (O' Neill e Parameswaran, 1997).

No presente estudo não houve alterações significantes na atividade locomotora após o tratamento com GR e com a MET. É possível que os efeitos provocados pela administração de GR estejam especificamente relacionados com o comportamento de ingestão de alimento, embora o fato de o animal deslocar-se na gaiola para obter alimento faça parte do comportamento ingestivo; sem essa capacidade ele não se alimentaria, o que seria parecido com os experimentos nos quais há lesão das vias dopaminérgicas que cursam próximo ao LHY, causando hipofagia secundária à imobilidade gerada pela lesão. Esse núcleo foi classicamente tido como o “centro da fome”, quando na realidade era a ruptura das fibras nigro-estriatais as causadoras da suposta “fome” (Woods e Stricker, 1999).

É interessante notar que os dados mostram que a administração i.p de agonistas serotoninérgicos tais como CP-94,253 (5-HT_{1B}), TFMPP (5-HT_{2C/1B}) e m-CPP (5-HT_{2C/1B}) suprimiram a ingestão de alimento dose-dependentemente em ratos (De Vry e cols., 2003; Lee e cols., 2002; Schreiber e De Vry, 2002), enquanto que a deleção do receptor 5-HT_{1B} em

camundongos provocou aumento do peso corporal quando comparado ao tipo selvagem (Bouwknicht e cols., 2001). Isso sugere que há características espécie-específicas, o que justifica as diferenças dos efeitos ingestivos dos agonistas 5-HT_{1B} entre roedores (hipofagia) e pombos (hiperfagia). Permanece a dúvida com relação à localização dos receptores 5-HT_{1B/1D}, se pré- ou pós-sinápticos, tanto em mamíferos como em aves. É importante ressaltar que o receptor 5-HT_{1D} achado no SNC de pombos é estrutural e farmacologicamente similar ao encontrado em outros vertebrados (incluindo humanos), porém é diferente dos achados em roedores (Barnes e Sharp, 1999; Hartig e cols., 1996), o que indica que o pombo é uma excelente espécie para se estudar os atributos funcionais desses receptores. Adicionalmente, os receptores 5-HT_{1D} parecem estar co-localizados com os receptores 5-HT_{1B}, embora em menores densidades (Bruinvels e cols., 1993). A característica predominante do padrão dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} é a coincidente localização dos RNAs mensageiros e dos ensaios de ligante-receptor de ambos receptores, o que sugere que são expressos predominantemente em terminais nervosos de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos (Boschert e cols., 1994). Essa distribuição anatômica é consistente com a idéia de que os receptores 5-HT_{1B/1D} funcionam como auto e heteroreceptores para controlar a liberação de neurotransmissores (Morikawa e cols., 2000).

O presente trabalho também investigou a presença dos auto-receptores 5-HT_{1A} no PMH e no PVN de pombos saciados. Para tanto, utilizou-se o agonista serotoninérgico 8OH, um potente e seletivo ligando do sub-tipo de receptor 5-HT_{1A} (Middlemiss e Fozard, 1983) que inibe a liberação de 5-HT na fenda sináptica (Hjorth e Sharp, 1991; Starkey e Skingle, 1994; Sharp e cols., 1996) e cuja ativação reduz os disparos neuronais serotoninérgicos (Montigny e cols., 1984). Parece que em pombos o 8OH desencadeia um efeito semelhante sobre a liberação de 5-HT, uma vez que ocorreu uma redução dos níveis de 5-HIAA no líquor após a injeção i.c.v de 8OH (Gleeson e cols. 1992). Além disso, como os receptores 5-HT_{1B/1D}, o receptor 5-HT_{1A} é achado em corpos celulares e dendritos serotoninérgicos onde

atua como auto-receptor, e também em alvos pós-sinápticos de liberação de 5-HT (Cowen , 2000).

Os resultados obtidos mostram que a administração de 8OH não causou modificações no comportamento ingestivo desses animais, em ambos os locais avaliados, sugerindo que os efeitos supressores da 5-HT sobre os neurônios do PVN ou PMH não acontecem através de sua ligação com receptores 5-HT_{1A}. A única alteração observada foi o aumento estatisticamente significativo na latência para iniciar o comportamento de ingestão de água após o tratamento com o 8OH no PVN. Esses dados são contrários ao que a literatura propõe, pois vários trabalhos o tem citado como potencializador dos efeitos dipsogênicos em pombos saciados (Hackl, 2001), e em pombos deprivados durante 24 h (Steffens e cols., 1997; Steffens, 1999).

Häckl (2001) administrou 8OH em distritos pontomesencefálicos de pombos saciados, e mostrou que houve modificação no comportamento de ingestão de alimento, no entanto, a resposta dipsogênica foi muito mais intensa. Porém, no estudo executado por Silva (2003), a administração de 8OH na APV não modificou a ingestão de alimento/água, dados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Também em ratos realimentados após jejum de 12 h, a injeção sistêmica do agonista 5-HT_{1A} ipsapirona aumentou a ingestão de água (De Vry e Schreiber, 2000). Então, é possível que os receptores 5-HT_{1A} envolvidos com o controle da ingestão de alimento e de água possam estar localizados em outras regiões do SNC de aves e mamíferos, mas não no PMH, APV e nem no PVN.

Curiosamente, a injeção central de 8OH no núcleo dorsal e mediano da rafe provoca aumento da quantidade de alimento ingerido em ratos durante 1 hora de registro (Fletcher, 1991). Ainda, a injeção de 8OH aumenta a resposta ingestiva em ratos saciados no final do período ativo (noturno), mas não altera a ingestão de alimento em ratos deprivados e no período diurno do ciclo. Os efeitos provocados pela administração de 8OH

parecem variar de acordo com o ritmo circadiano, textura da comida, palatabilidade, período de desenvolvimento, estado nutricional, e conteúdo calórico (Arkle e Ebenezer, 2000; Dourish e cols., 1985; Ebenezer e cols., 1999; Ebenezer e cols., 2001; Jhanwar-Uniyal e cols., 1994) , como exemplificado pelo experimento citado acima.

Resultados obtidos em nosso laboratório mostram que a injeção de 8OH no ARC de ratos parcialmente saciados provoca aumento da ingestão de alimento, e inversamente a MET reduz ou não altera a quantidade de alimento ingerido (dados não publicados). Também em ratos não-deprivados a injeção subcutânea de 8OH aumentou o consumo de dieta líquida e semi-líquida altamente palatável (doce), e de maneira dose-dependente em ratos parcialmente saciados (Dourish e cols., 1988). Esses resultados indicam que a ausência de alterações consistentes no quadro alimentar dos pombos não é observada em roedores após a injeção de 8OH.

Assim como os receptores 5-HT_{1B}, os receptores 5-HT_{1A} também podem funcionar como heteroreceptores. Um estudo realizado em ratos utilizando técnicas imunohistoquímicas (usando um anticorpo direcionado contra a terceira alça intracelular do receptor 5-HT_{1A}) de dupla marcação para uma série de peptídeos de grande importância para a regulação da ingestão de alimento e do peso corporal (Collin e cols., 2002), mostrou a existência de receptores 5-HT_{1A} em corpos celulares e dendritos de neurônios imunorreativos ao NPY, AGRP, POMC e CART, todos eles localizados no ARC. No hipotálamo lateral, os receptores 5-HT_{1A} foram localizados em corpos celulares imunorreativos à orexina (ORX, hipocretina) e ao hormônio concentrador de melanina (MCH) (Collin e cols., 2002). Esses dados sugerem que a serotonina, via receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos presentes em neurônios não-serotonérgicos, pode afetar a síntese e a liberação desses peptídeos que estão envolvidos de forma crucial na regulação da ingestão de alimento.

Por último, analisaremos os resultados pertinentes à ingestão de água. Os dados obtidos nesse estudo mostram que a administração de ambas as doses de GR no PMH aumentaram a quantidade de água ingerida e reduziram a latência para iniciar este comportamento. Somente a dose de 6 nmol de GR foi eficaz em prolongar a duração do episódio de ingestão hídrica. Esses resultados indicam que os receptores 5-HT_{1B/1D} presentes no PMH podem estar envolvidos com o controle da ingestão de água. As injeções de MET e 8OH não alteraram o comportamento de ingestão de água em nenhum dos aspectos avaliados. No PVN nenhuma alteração foi observada após a utilização dos diversos tratamentos, exceto como já comentado, a injeção de 8OH provocou um aumento expressivo da latência para iniciar a ingestão de água.

Em trabalhos anteriores não foi verificada uma alteração significativa na ingestão de água após a utilização de MET, GR e 8OH na APV de pombos saciados (Silva, 2003); e após a utilização de MET no PVN (Silva, 2001); parece não haver uma correlação entre hiperfagia e resposta dipsogênica, segundo esses dados. De fato, a injeção de MET no PMH provocou uma intensa resposta hiperfágica, e assim mesmo, não houve um aumento da quantidade de água ingerida. No entanto, com relação ao GR houve essa correlação. A administração de GR nas doses de 0,6 e 6 nmol no PMH resultou em uma resposta hiperfágica e dipsogênica. Esses dados sugerem que a ativação dos receptores 5-HT_{1B/1D} no PMH poderia estimular a ingestão de água. No entanto, a administração i.c.v de GR não provocou ingestão hídrica (Silva e cols., 2004).

Entretanto, houve correlação entre hiperfagia e polidipsia, em um experimento utilizando o agonista 8OH injetado intracerebroventricularmente em pombos privados por 24 h (Steffens e cols, 1997). Nesse mesmo estudo, a administração i.c.v de 5-HT provocou hipofagia nos animais em jejum, acompanhada de aumento na ingestão hídrica; em animais saciados a 5-HT provocou intensa resposta dipsogênica sem modificar a ingestão de alimento. Em outro estudo mais recente, a injeção i.c.v de 8OH em pombos saciados

provocou fortes efeitos dipsogênicos, sem alterar a ingestão de alimento (Silva e cols., 2004). Esses dados diferem dos obtidos no presente trabalho, pois a administração de 8OH não provocou uma resposta hiperfágica, nem tampouco dipsogênica. Como o tratamento foi realizado de forma i.c.v, e não diretamente no núcleo como neste trabalho, não se sabe onde exatamente a droga ativou os receptores 5-HT_{1A} para produzir esses efeitos.

Em um trabalho clássico realizado por Zeigler e cols., 1972, foi investigada a regulação da ingestão de alimento, de água e do peso corporal em pombos através de observação comportamental, durante 3 semanas. Constatou-se que a total deprivação de água resultou em redução progressiva e intensa da ingestão de alimento, já no 1º dia de registro, e se mantém reduzida durante o período de 4 dias. Entretanto, a total deprivação de alimento gerou uma diminuição da ingestão de água, porém menos intensa que o experimento anterior, e manteve-se estável a partir da 1ª semana de registro até a 3ª. Esses dados sugerem que há uma relação íntima entre a ingestão de água e de alimento, e que a falta de água afeta muito mais o consumo de alimento do que a situação inversa. No entanto, a injeção de MET no PMH, de MET no PVN, de MET na APV, de GR no PVN e de GR na APV não induziu essa proporcionalidade entre alimento/água, somente a administração de GR no PMH, sugerindo que os receptores 5-HT_{1B/1D} do PMH facilitam a ingestão de água ou ao contrário, os receptores 5-HT_{1B/1D} no PVN e na APV impediram que a resposta dipsogênica fosse expressa na sua totalidade, de modo a manter a proporcionalidade água/alimento.

Concluindo sobre a ingestão de água, os dados mostram que a injeção i.c.v de GR induziu uma resposta hiperfágica, sem modificar a ingestão de água (Silva e cols., 2004); a mesma droga injetada diretamente na APV provocou aumento da ingestão de alimento, sem induzir uma resposta dipsogênica (Silva, 2003); no presente trabalho, as injeções desse agonista no PVN reproduziram as resposta obtidas i.c.v e na APV, entretanto, no PMH a

droga induziu hiperfagia e polidipsia. Ainda, a MET injetada no PMH não reproduziu a resposta obtida pelo GR.

A distribuição de pericários imunorreativos, fibras e terminais de 5-HT no cérebro de pombos foi investigada utilizando métodos de imunohistoquímica, imunofluorescência e transporte axonal retrógrado (Challet e cols., 1996). Foram encontrados 21 tipos diferentes de células imunorreativas, duas das quais no hipotálamo (órgão paraventricular e recesso infundibular) e 19 no mesencéfalo e rombencéfalo (sistema da rafe). Comparado com estudos prévios em outras espécies, a organização do sistema serotoninérgico em aves é muito parecida com o encontrado em mamíferos e répteis (Challet e cols., 1996). Yamada e Sano, 1985 investigaram a distribuição das fibras serotoninérgicas no cérebro de galinhas (*Gallus domesticus*), e também encontraram um padrão similar ao obtido em mamíferos. Um grande número de fibras foi achado no tubérculo olfatório, núcleo taenie, septo, área pré-óptica, núcleo ventromedial hipotalâmico (VMN), núcleo dorsomedial hipotalâmico, núcleo mamilar, locus ceruleus, núcleo da rafe, órgão paraventricular, entre outros. No núcleo paraventricular (PVN) e no núcleo infundibular (NI) a distribuição das fibras foi mais esparsa.

Concluindo, os dados mostram a presença de receptores 5-HT_{1B/1D} no PMH e no PVN envolvidos no controle neural serotoninérgico da ingestão de alimento em pombos. Além disso, a hiperfagia induzida pela administração de MET parece ser mediada pelos receptores 5-HT_{1B/1D}. A existência de um tônus serotoninérgico inibitório sobre a ingestão de alimento atuando no PMH e no PVN por intermédio da ligação da 5-HT com receptores 5-HT_{1B/1D}. Os receptores 5-HT_{1B/1D} parecem regular o término da refeição (saciação) e também o intervalo entre as refeições (saciedade).

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

- ARASE, K.; YORK, D. A.; SHIMAZU, H.; SHARGILL, M.; BRAY, G. A. Effects of corticotropin releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis. *Am. J. Physiol.*, 55:E225-259, 1998.
- ARKLE, M.; EBENEZER, I. S. Ipsapirone suppresses food intake in food-deprived rats by an action at 5-HT_{1A} receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 408:273-276, 2000.
- BARNES, N. M; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38:1083-1152, 1999.
- BASKIN, D. G.; WILCOX, B. J.; FIGLEWICZ, D. P.; DORSA, D. M. Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci.*, 11:107-111, 1988.
- BECK, B. Kos and organization of peptidergic feeding behavior mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 25:143-158, 2001.
- BENDOTTI, C.; SAMANIN, R. The role of putative 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the control of feeding in rats. *Life Sci.*, 41:635-642, 1987.
- BERK, M. L.; BUTLER, A. B. Efferent projections of the medial preoptic nucleus and medial hypothalamus in the pigeon. *J. Comp. Neurol.*, 203:379-399, 1981.
- BERK, M. L.; FINKELSTEIN, J. A. Long descending projections of the hypothalamus in the pigeon, *Columba livia*. *J. Comp. Neurol.*, 220:127-136, 1983.
- BERTHOUD, H. R. An overview of neural pathways and networks involved in the control of food intake and selection. In: BERTHOUD, H. R., SEELEY, R. J. (editors). Neural and metabolic control of macronutrient intake. Boca Raton, *CRC Press*, 508 p., 2000.

- BERTHOUD, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 26:393-428, 2002.
- BLUNDELL, J. E. Serotonin manipulations and the structure of feeding behavior. *Appetite*, 7:39-56, 1986.
- BOSCHERT, U.; AMARA, D. A.; SEGU, L.; HEN, R. The mouse 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor is localized predominantly on axon terminals. *Neuroscience*, 58:167-182, 1994.
- BOUWKNECHT, J. A.; VAN DER GUGTEN, J.; HIJZEN, T. H.; MAES, R. A.; HEN, R.; OLIVIER, B. Male and female 5-HT_{1B} receptor knockout mice have higher body weights than wild types. *Physiol. Behav.*, 74:507-516, 2001.
- BOVETTO, S.; RICHARD, D. Functional assessment of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2a/2c} e 5-HT₃ receptor subtypes on food intake and metabolic rate in rats. *Am. J. Physiol.*, 268:R14-R20, 1995.
- BREWERTON, T. D. Toward a unified theory of serotonin dysregulation in eating and related disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 20: 561-590, 1995.
- BRUINVELS, A.T.; PALACIOS, J. M.; HOYER, D. Autoradiographic characterisation and localization of 5-HT_{1D} compared to 5-HT_{1B} binding sites in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 347:569-582, 1993.
- CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a *Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin* study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 348:41-79, 1994.

CHALLET, E.; MICELI, D.;PIERRE, J.; REPÉRANT, J.; MASICOTTE, G.; HERBIN, M.; VESSELKIN, N. P. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the brain of the pigeon (*Columba livia*). *Anat. Embryol.*, 193:209-227, 1996.

CLEMENT, K.; VAISSE, C.; LAHLOU, N.; CABROL, S.; PELLOUX, V.; CASSUTO, D.; GOURMELEN, M.; DINA, C.; CHAMBAZ, J.; LACORTE, J. M.; BASDEVANT, A.; BOUGNERES, P.; LÉBOUC, Y.; FROGUEL, P.; GUY-GRAND, B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, 392:398-401, 1998.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – COBEA. Os princípios éticos de experimentação animal. São Paulo, 1991.

COLLIN, M.; BÄCKBERG, M.; ÖNNESTAM, K.; MEISTER, B. 5-HT_{1A} receptor immunoreactivity in hypothalamic neurons involved in body weight control. *Neuroreport*, 13:945-951, 2002.

COWEN, P. J. Psychopharmacology of 5-HT_{1A} receptor. *Nucl. Med. Biol.*, 27(5):437-439, 2000.

DENBOW, D. M. Food regulation in birds. *J. Exp. Zool.*, 283:333-338, 1999.

DENBOW, D. M.; VAN KREY, H. P.; LACY, M. P.; DIETRICK, T. J. Feeding, drinking and body weight: effects of icv injections of biogenic amines. *Physiol. Behav.*, 31:85-90, 1983.

DE VRY, J.; SCHREIBER, R. Effects of selected serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 24:341-353, 2000.

- DE VRY, J.; SCHREIBER, R.; DASCHKE, A.; JENTZCH, K. R. Effects of serotonin 5-HT_{1/2} receptor agonists in a limited-access operant food intake paradigm in the rat. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 13:337-345, 2003.
- DOURISH, C. T. 5-HT receptor subtypes and feeding behaviour. *Adv. Biosci.*, 85:179-201, 1992.
- DOURISH, C. T.; COOPER, S. J.; GILBERT, F.; COUGHLA, J.; IVERSEN, S. D. The 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT increases consumption of palatable wet mash and liquid diets in the rat. *Psychopharmacology*, 94:58-63, 1988.
- DOURISH, C. T.; HUTSON, P. H.; CURZON, G. Characteristics of feeding induced by the serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). *Brain Res. Bull.*, 15:377-384, 1995.
- DOURISH, C. T.; HUTSON, P. H.; CURZON, G. Low doses of the putative serotonin agonist 8-hydroxy-2(di-*n*-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) elicit feeding in the rat. *Psychopharmacology*, 86:197-204, 1985.
- DOURISH, C. T.; HUTSON, P. H.; CURZON, G. Putative anxiolytics 8-OH-DPAT, buspirone and TVXQ 7821 are agonists at 5-HT_{1A} autoreceptors in the raphe nuclei. *Trends Pharmacol. Sci.*, 7:212-214, 1986.
- DOURISH, C. T.; HUTSON, P. H.; KENNETT, G. A.; CURZON, G. 8-OH-DPAT-induced hyperphagia: its neural basis and possible therapeutic relevance. *Appetite*, 7:127-140, 1986.

- DRYDEN, S.; BROWN, M.; KING, P.; WILLIAMS, G. Decrease plasma leptin levels in lean and obese Zucker rats after treatment with the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Horm. Metab. Res.*, 31:363-366, 1999.
- EBENEZER, I. S.; PARROTT, R. F.; VELLUCCI, S.V. Effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on operant food intake in food-deprived pigs. *Physiol. Behav.*, 67:213-217, 1999.
- EBENEZER, I. S.; VELLUCCI, S.V.; PARROTT, R. F. The differential effects of intravenously administered 8-OH-DPAT on operant food intake in satiated and food-deprived pigs are mediated by central 5-HT_{1A} receptors. *Physiol. Behav.*, 73:223-227, 2001.
- EDWARDS, S.; STEVENS, R. G. Effects of xylamide on peripheral 5-hydroxytryptamine-induced anorexia. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 34: 717-720, 1989.
- EL MANSARI, M.; BLIER, P. Functional characterization of 5-HT_{1D} autoreceptors on the modulation of 5-HT release in guinea-pig mesencephalic raphe, hippocampus and frontal cortex. *B. J. Pharmacol.*, 118:681-689, 1996.
- ELMQUIST, J. K.; BJORBAEK, C.; AHIMA, R. S.; FLIER, J. S.; SAPER., C. B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 395:535-547, 1998.
- ELMQUIST, J. K.; ELIAS, C.; SAPER, C. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron.*, 22:221-232, 1999.
- FITZSIMONS, T. J.; LE MAGNEN. Eating as a regulatory control of drinking in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 67:273-283, 1969.

- FLETCHER, P. J. Dopamine receptor blockade in accumbens nucleus or caudate nucleus differentially affects feeding induced by 8-OH-DPAT injected into dorsal or median raphe. *Brain Res.*, 552:181-189, 1991.
- FLETCHER, P. J.; BURTON, M. J. Effects of manipulations of peripheral serotonin on feeding and drinking in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 20:835-840, 1984.
- FORNAL, C. A.; METZLER, C. W.; MARROSU, F.; VALLE, L. E. R.; JACOBS, B. L. A subgroup of dorsal raphe serotonergic neurons in the cat is strongly activated during oral-buccal movements. *Brain Res.*, 716:123-133, 1996.
- FRIEDMAN, J. M. Leptin and the regulation of body weight. *Harvey Lect.*, 95:107-136, 1999.
- FULWILER, C. E.; SAPER, C. B. Cholecystinin-immunoreactive innervation of the ventromedial hypothalamus in the rat: possible substrate for autonomic regulation of feeding. *Neurosci. Lett.*, 53:289-296, 1985.
- GIBBS, J. Y.; SMITH, G. P. Cholecystinin decreases food intake in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 84:488-495, 1973.
- GLENNON, R. A.; DUKAT, M. Serotonin receptor subtypes. In: F. E. Bloom e D. J. Kupfer (eds.) *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*, p. 415-429, New York: *Raven Press*, 1995.
- GLEESON, S.; WEISSMAN, B. A.; SEGCEL, M. R.; BARRETT, J. E. Neurochemical effects of 5-HT₁ receptor ligands in pigeons. *Eur. J. Pharmacol.*, 229:109-115, 1992.

- GRILL, H. J.; KAPLAN, J. M. Caudal brainstem participates in the distributed neural control of feeding. In: STRICKER, E. M. (ed.). Handbook of behavioral neurobiology, vol. 10. New York: *Plenum Press*, 24p., 1990.
- GRILL, H. J.; KAPLAN, J. M. The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front. Neuroendocrinol.*, 23:2-40, 2002.
- HÄCKL, L. P. N. *Efeitos ingestivos de injeções de 8-OH-DPAT em distritos pontomesencefálicos da rafe que contêm pericários imunorreativos à serotonina em pombos. (Columba livia)*. Florianópolis, 2001. 101p. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina.
- HAGEMANN, L. F.; COSTA, C. V.; ZENI, L. Z. R.; FREITAS, C. G.; MARINO-NETO, J.; PASCHOALINI, M. A. Food intake after adrenaline and noradrenaline injections into the hypothalamic paraventricular nucleus in pigeons. *Physiol. Behav.*, 64(5):645-652, 1998.
- HALFORD, J.; BLUNDELL, J. Separate systems for serotonin and leptin in appetite control. *Ann. Med.*, 32(3): 222-232, 2000.
- HARTIG, P. R.; HOYER, D.; HUMPHREY, P. P. A.; MARTIN, G. Aligment of receptor nomenclature with the human genome: classification of 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17:103-105, 1996.
- HEYMSFIELD, S. B.; GREENBERG, A. S.; FUJIOKA, K.; DIXON, R. M.; KUSHNER, R.; HUNT, T.; LUBINA, J. A.; PATANE, J.; SELF, B.; HUNT, P.; McCAMISH, M. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *Jama*, 282:1568-1575, 1999.

- HIKIJI, K.; INOUE, K.; IWASAKI, S.; ICHIHARA, K.; KIRIIKE, N. Local perfusion of m-CPP into ventromedial hypothalamic, but no lateral hypothalamic area and frontal cortex inhibits food intake in rats. *Psychopharmacology* (Berl.), 174(2):190-196, 2004.
- HILL, J. O.; PETERS, J. C. Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science*, 280:1371-1374, 1998.
- HIRUNAGI, K.; HASEGAWA, M.; VIGH, B.; VIGH-TEICHMANN, I. Immunocytochemical demonstration of serotonin-immunoreactive cerebrospinal fluid-contacting neurons in the paraventricular organ of pigeons and domestic chickens. *Prog. Brain Res.*, 327-330, 1992.
- HJORT, S.; SHARP, T. Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by *in vivo* microdialysis. *Life Sci.*, 48:1779-1786, 1991.
- HJORT, S.; SUCHOWSKI, C. S.; GALLOWAY, M. P. Evidence for 5-HT autoreceptor-mediated, nerve impulse-independent, control of 5-HT synthesis in the rat brain. *Synapse*, 19: 170-176, 1995.
- HOYER, D.; MIDDLEMISS, D. N. Species differences in the pharmacology of terminal 5-HT autoreceptors in mammalian brain. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10:130-132, 1989.
- HUTSON, P. H.; DONOHOE, T. P.; CURZON, G. Infusion of the 5-hydroxytryptamine agonists RU 24969 and TFMPP into the paraventricular nucleus of the hypothalamus causes hypophagia. *Psychopharmacology*, 97:550-552, 1988.

- HUTSON, P. H.; DOURISH, C. T.; CURZON, G. Neurochemical and behavioural evidence for mediation of the hyperphagic action of 8-OH-DPAT by 5-HT cell body autoreceptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 129:347-352, 1986.
- JEANRENAUD, B.; CUSIN, I.; ROHNER-JEANRENAUD, F. From Claude Bernard to the regulatory system between the hypothalamus and the periphery implications for homeostasis of body weight and obesity. *CR Seances Soc. Biol. Fil*, 192:829-841, 1998.
- JHANWAR-UNIYAL, M.; MOORJANI, B.; KAHN, A. H. Indications of pre- and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor interactions in feeding behavior and neuroendocrine regulation. *Brain Res.*, 646:247-257, 1994.
- JOHNSON, R. F.; JOHNSON, A. K. Light/dark cycle modulates food to water intake ratios in rats. *Physiol. Behav.*, 48:707-711, 1990.
- JOHNSON, R. F.; JOHNSON, A. K. Meal related and rhythmic drinking: effects of abolition of rats eating rhythm. *Am. J. Physiol.*, 261:14-19, 1991.
- JOHNSON, R. F.; JOHNSON, A. K. The interaction of meal-related, rhythmic and homeostatic mechanisms and the generation of thirst and drinking. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30(4):487-491, 1997.
- KARTEN, J.; HODOS, W. A. Stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*). Baltimore, Maryland: *John Hopkins Press*, 1967.
- KENNEDY, G. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 140:579-592, 1953.

- KENNETT, G. A.; CURZON, G. 5-HT_{1B} agonists induce anorexia at a postsynaptic site. *Eur. J. Pharmacol.*, 141:429-435, 1987.
- KENNETT, G. A.; MARCOU, M.; DOURISH, C. T.; CURZON, G. Single administration of 5-HT_{1A} agonists decreases 5-HT_{1A} presynaptic, but not postsynaptic receptor-mediated responses: relationship to antidepressant-like action. *Eur. J. Pharmacol.*, 138:53-60, 1987.
- KUENZEL, W. J. Central neuroanatomical systems involved in the regulation of food intake in birds and mammals. *J. Nutr.*, 124:1355-1370, 1994.
- KUENZEL, W. J.; BECK, M. M.; TERUYAMA, R. Neural sites and pathways regulating food intake in birds: a comparative analysis to mammalian systems. *J. Exp. Zool.*, 283:348-364, 1999.
- KUENZEL, W. J.; TIENHOVEN, A. Nomenclature and location of avian hypothalamic nuclei and associated circumventricular organs. *J. Comp. Neurol.*, 206:293-313, 1982.
- LANFUMEY, L.; HAMON, M. 5-HT₁ receptors. *CNS Neurol. Disord.*, 3:1-10, 2004.
- LAWRENCE, C. B.; TURNBULL, A. V.; ROTHWELL, N. J. Hypothalamic control of feeding. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9:778-783, 1999.
- LEE, M. D.; KENNETT, G. A.; DOURISH, C. T.; CLIFTON, P. G. 5-HT_{1B} receptors modulate components of satiety in the rat: behavioral and pharmacological analyses of the selective serotonin 1B agonist CP-94,253. *Psychopharmacology*, 164:49-60, 2002.

LEE, M. D.; SOMERVILLE, E. M.; KENNETT, G. A.; DOURISH, C. T.; CLIFTON, P. G. Tonic regulation of satiety by 5-HT receptors in the mouse converging evidence from behavioral and c-fos immunoreactivity studies? *Eur. J. Neurosci.*, 19:3017-3025, 2004.

LEIBOWITZ, S. F. The role of serotonin in eating disorders. *Drugs*, 3:33-48, 1990.

LUITEN, P. G.; ter HORST, G. J.; BUIJS, R. M.; STEFFENS, A. B. Autonomic innervation of the pancreas in diabetic and non-diabetic rats. A new view on intramural sympathetic structural organization. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 15:33-44, 1986.

LUITEN, P. G.; ter HORST, G. J.; STEFFENS, A. B. The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog. Neurobiol.*, 28:1-54, 1987.

McFARLAND, D. J. Interaction of hunger and thirst in the barbary dove. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 58:174-179, 1964.

McFARLAND, D. J. Phase relationships between feeding and drinking in the barbary dove. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 63:208-213, 1967.

MACOR, J. E.; BURKHART, C. A.; HEYM, J. H.; IVES, J. L.; LEBEL, L. A.; NEWMAN, M. E.; NIELSEN, J. A.; RYAN, K.; SCHULZ, D. W.; TORGENSEN, L. K.; KOE, B. K. 3-(1,2,5,6-tetrahydropyrid-yl) pyrrolo (3,2-b) pyrid-5-one: A potent and selective serotonin (5-HT_{1B}) agonist and rotationally restricted phenolic analogue of 5-methoxy 3-(1,2,5,6-tetrahydropyrid-4-yl) indole. *J. Med. Chem.*, 33:2087-2093, 1990.

- MAKARENKO, I. G.; MEGUID, M. M.; UGRUMOV, M. V. Distribution of serotonin 5-hydroxytryptamine 1B (5-HT_{1B}) in the normal rat hypothalamus. *Neurosci. Lett*, 328:155-159, 2002.
- MANSBACH, R. S.; HARROD, C.; HOFFMANN, S. F.; NADER, M. A.; LEI, Z.; WITKIN, J. M.; BARRET, J. E. Behavioral studies with anxiolytic drugs: V. Behavioral and *in vivo* neurochemical analyses in pigeons of drugs that increase punished responding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 246:114-120, 1988.
- METZGER, M.; TOLEDO, C.; BRAUN, K. Serotonergic innervation of the telencephalon in the domestic chick. *Brain Res. Bull.*, 57: 547-551, 2002.
- MEURLING, P.; RODRIGUEZ, E. M. The paraventricular and posterior recess organs of elasmobranchs: a system of cerebrospinal fluid-contacting neurons containing immunoreactive serotonin and somatostatin. *Cell Tissue Res.*, 259: 463-473, 1990.
- MIDDLEMISS, D. N.; FOZARD, J. R. 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino) tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT₁ recognition site. *Eur. J. Pharmacol.*, 90:151-153, 1983.
- MIKAMI, S. Immunocytochemistry of the avian hypothalamus and adenohypophysis. *Int. Rev. Citol.*, 103:189-248, 1986.
- MITCHELL, S. N.; GREENSLADE, R.G.; COOPER, J. LY393558, a 5-hydroxytryptamine reuptake inhibitor and 5-HT_{1B/1D} receptor antagonist: effects on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in the guinea pig and rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 432:19-27, 2001.

- MONTGOMERY, A. M. J.; FLETCHER, P. J.; BURTON, M. J. Behavioral and pharmacological investigations of 5-HT hypophagia and hyperdipsia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 25:23-28, 1986.
- MONTIGNY, C.; BLIER, P.; CHAPUT, Y. Electrophysiologically-identified serotonin receptors in the rat CNS. *Neuropharmacology*, 23:151-1520, 1984.
- MORIKAWA, H.; MANZONI, O. J.; CRABBE, J. C.; WILLIAMS, J. T. Regulation of central synaptic transmission by 5-HT_{1B} auto- and heteroreceptors. *Mol. Pharmacol.*, 58(6):1271-1278, 2000.
- NONOGAKI, K.; STRACK, A. M.; DALLMAN, M. F.; TECOTT, L. H. Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT_{2C} receptor gene. *Nat. Med.*, 4:1152-1156, 1998.
- O NEILL, M. F.; FERNANDEZ, A. G.; PALACIOS, J. M. Activation of central 5-HT_{1B} receptors increases locomotor activity in mice. *Hum. Psychopharmacol.*, 12:431-435, 1997.
- O NEILL, M. F.; FERNANDEZ, A. G.; PALACIOS, J. M. GR 127935 blocks the locomotor and antidepressant-like effects of RU 24969 and the action of antidepressants in the mouse tail suspension test. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 53:535-539, 1996.
- O NEILL, M. F.; PARAMESWARAN, T. RU 24969-induced behavioural syndrome requires activation of both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors. *Psychopharmacology*, 132:55-260, 1997.
- O NEILL, M. F.; SANGER, G. J. GR 46611 potentiates 5-HT_{1A} receptor-mediated locomotor activity in the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.*, 370:85-92, 1999.

PAUWELS, P. J. 5-HT_{1B/1D} receptor antagonists. *Gen. Pharmac.*, 29:293-303, 1997.

RAVUSSIN, E.; BOUCHARD, C. Human genomics and obesity: finding appropriate drug targets. *Eur. J. Pharmacol.*, 410:131-145, 2000.

RIAD, M.; GARCIA, S.; WATKINS, K. C.; JODOIN, N.; DOUCET, E.; LANGLOIS, X.; el MESTIKAWY, S.; HAMON, M.; DESCARRIES, L. Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 417:181-194, 2000.

SABI, M. *Participação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1D} no hipotálamo posterior medial e no núcleo intersticial da estria terminal no controle serotoninérgico da ingestão de alimento e da lipólise em pombos*. Florianópolis, 2003. 61p. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina.

SAMANIN, R.; GRIGNASHI, G. Role of 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in society and animal models of eating disorders. In: Drug receptor subtypes and ingestive behaviour. S. J. Cooper e P. G. Clifton (eds.), cap. 3, p. 39-58, London: *Academic Press*, 1996.

SANO, Y.; UEDA, S.; YAMADA, H.; TAKEUCHI, Y.; GOTO, M.; KAWATA, M. Immunohistochemical demonstration of serotonin-containing CSF-contacting neurons in the submammalian paraventricular organ. *Histochemistry*, 77:423-430, 1983.

SAPER, C. B.; SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 169:409-442, 1976.

- SARI, Y. Serotonin 1B receptors: from protein to physiological function and behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 28:565-582, 2004.
- SCHREIBER, R.; DE VRY, J. Role of 5-HT_{2C} receptors in the hypophagic effect of m-CPP, ORG 37684 and CP- 94,253 in the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 26:441-449, 2002.
- SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, J. D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404:661-671, 2000.
- SHARP, T.; UMBERS, V.; HJORT, S. The role of 5-HT_{1A} autoreceptors and α_1 -adrenoceptors in the inhibition of 5-HT release – II NAN –190 and SDZ 216-525. *Neuropharmacology*, 35:735-741, 1996.
- SHEK, E. W.; SCARPACE, P. J. Resistance to the anorexic and thermogenic effects of centrally administered leptin in obese aged rats. *Regul. Pept.*, 92:65-71, 2000.
- SILVA, A. S. S. *Presença de receptores serotoninérgicos no núcleo paraventricular do hipotálamo e sua participação no controle neural da ingestão de alimento em pombos (Columba livia)*. Florianópolis, 2001. 74p. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina.
- SILVA, R. A. *Ativação de receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} na área pré-óptica ventral provoca hiperfagia em pombos (Columba livia)*. Florianópolis, 2003. 88p. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina.

SILVA, R. A.; OLIVEIRA, S. T.; HACKL, L. P. N.; SPILERE, C. A.; FARIA, M. S.; MARINONETO, J.; PASCHOALINI, M. A. Ingestive behaviors and metabolic fuels after central injections of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B/1D} receptors agonists in the pigeon. *Brain Res.*, 1-9, 2004.

SIMANSKY, K. J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav. Brain Res.* 73:37-42, 1995.

SIMON-OPPERMANN, Ch.; SIMON, E.; GRAY, D. A. Central and systemic antidiuretic hormone and angiotensin II in salt and fluid balance in birds as compared to mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90:789-792, 1988.

SINGH, D. P.; LI, Q.; TAKEUCHI, S.; OHKUBO, T.; SHARP, P. J.; BOSWELL, T. Fasting differentially regulates expression of agouti-related peptide, pro-opiomelanocortin, prepro-orexin, and vasoactive intestinal polypeptide mRNAs in the hypothalamus of Japanese quail. *Cell. Tissue Res.*, 313:217-225, 2003.

SKINGLE, M.; SLEIGHT, A. J.; FENIUK, W. Effects of the 5-HT_{1D} receptor antagonist GR 127935 on extracellular levels of 5-HT in the guinea-pig frontal cortex as measured by microdialysis. *Neuropharmacology*, 34:377-382, 1995.

STARKEY, S.J.; SKINGLE, M. 5-HT_{1D} as well as 5-HT_{1A} autoreceptors modulate 5-HT release in the guinea-pig dorsal raphe nucleus. *Neupharmacology*, 33:393-402, 1994.

STEFFENS, S. M. *Identificação funcional de subtipos de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃ no controle neural da ingestão de alimento e água em pombos (Columba livia)*. Florianópolis, 1999. 93p. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina.

- STEFFENS, S. M.; CASAS, D. C.; MILANEZ, B. C.; FREITAS, C. G.; PASCHOALINI, M. A.; MARINO-NETO, J. Hypophagic and dipsogenic effects of central 5-HT injections in pigeons. *Brain Res. Bull.*, 44:681-688, 1997.
- STRUBBE, J. H.; KEYSER, J.; DIJKSTRA, T.; PRINS, A. J. A. Interaction between circadian and caloric control of feeding behavior in the rat. *Physiol. Behav.*, 36:489-493, 1986.
- TECOTT, L. H.; SUM, L. M.; AKANA, S. F. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2C} serotonin receptors. *Nature*, 374:542-546, 1995.
- THIBAUT, L.; BOOTH, D. A. Macronutrient-specific dietary selection in rodents and its neural bases. *Neurosci. Behav.*, 23:457-528, 1999.
- THORTON, S. N. Osmoreceptor localization in the brain of the pigeon (*Columba livia*). *Brain Res.*, 377:96-104, 1986.
- VALLE, L. E. R.; FORMAL, C. A.; LITTO, W. J.; JACOBS, B. L. Serotonergic dorsal raphe unit activity related to feeding/grooming behaviors in cats. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 15:1283, 1989.
- VAN HIERDEN, Y. M.; de BOER, S. F.; KORTE, S. M. The control of feather pecking by serotonin. *Behav. Neurosci.*, 118(3):575-583, 2004.
- VICKERS, S. P.; DOURISH, C. T. Serotonin receptor ligands and the treatment of obesity. *Curr. Opin. Investig. Drug.*, 5:377-388, 2004.

- WAEBER, C.; SHOEFFTER, P.; PALACIOS, J. M.; HOYER, D. The serotonin 5-HT_{1D} receptor: a progress review. *Neurochem. Res.*, 15:567-582, 1990.
- WAEBER, C.; SHOEFFTER, P.; PALACIOS, J. M.; HOYER, D. 5-HT_{1D} receptors in guinea-pig and pigeon brain: radioligand binding and biochemical studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 340:479-485, 1989.
- WATTS, A. G. Understanding the neural control of ingestive behaviors: helping to separate cause from effect with dehydration-associated anorexia. *Horm. Behav.*, 37:261-83, 2000.
- WELTZIN, T. E.; FERNSTROM, M. H.; KAYE, W. H. Serotonin and bulimia nervosa. *Nutr. Rev.*, 52:399-408, 1994.
- WILLIAMS, G.; BING, C.; CAI, X.J.; HARROLD, J. A.; KING, P. J.; LIU, X., H. The hypothalamus and the control of energy homeostasis. Different circuits, different purposes. *Physiol. Behav.*, 74: 683-701, 2001.
- WILSON, K. M.; ROWLAND, N.; FREGLY, M. J. Drinking: a final common pathway? *Appetite*, 5:31-38, 1984.
- WOODS, S. C.; STRICKER, E. M. Food intake and metabolism. In: ZIGMOND, M. J., BLOOM, M. E., LANDIS, S. C., ROBERTS, J. L., SQUIRE, L. R. (eds.). *Fundamental Neuroscience. Academic Press*, 2600 p., 1999.
- YAMADA, J.; SUGIMOTO, Y.; UJIKAWA, M. The serotonin precursor 5-hydroxytryptophan elevates serum leptin levels in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 383:49-51, 1999.

YAMADA, H.; SANO, Y. Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallus domesticus*) – II. The distribution of the nerve fibers. *Biogenic Amines*, 2:21-36, 1985.

YAMADA, H.; TAKEUCHI, Y.; SANO, Y. Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallus domesticus*). The distribution of the neuronal somata. *Biogenic Amines*, 1:83-94, 1984.

ZEIGLER, H. P.; GREEN, H. L.; SIEGEL, J. Food and water intake and weight regulation in the pigeon. *Physiol. Behav.*, 8:127-134, 1972.