

SÉRGIO MURILO STEFFENS

**INGESTÃO DE ALIMENTO APÓS A ATIVAÇÃO DE
RECEPTORES 5-HT_{1A} DO NÚCLEO ARQUEADO DO
HIPOTÁLAMO E DA ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL DE
RATAS EM DUAS FASES DO CICLO ESTRAL**

Florianópolis - SC
2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

SÉRGIO MURILO STEFFENS

**INGESTÃO DE ALIMENTO APÓS A ATIVAÇÃO DE
RECEPTORES 5-HT_{1A} DO NÚCLEO ARQUEADO DO
HIPOTÁLAMO E DA ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL DE
RATAS EM DUAS FASES DO CICLO ESTRAL**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina para
obtenção do título de Doutor em
Neurociências.

Florianópolis - SC
2009

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

S817 Steffens, Sérgio Murilo
Ingestão de alimento após a ativação de receptores
5-HT1A do núcleo arqueado do hipotálamo e da área
hipotalâmica lateral de ratas em duas fases do ciclo
estral [tese] / Sergio Murilo Steffens ; orientadora,
Marta Aparecida Paschoalini. - Florianópolis, SC :
101 f.: tabs., graf.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui bibliografia

1. Ingestão de Alimentos. 2. Hipotálamo.
3. Receptores de serotonina. I. Paschoalini, Marta
Aparecida. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

CDU 612.82



Serviço Público Federal
Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Neurociências
Orientadora: Prof^ª. Dra. Marta Aparecida Paschoalini
Doutorando: Sérgio Murilo Steffens

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROPSICOBIOLOGIA

CONTROLE NEURAL DO METABOLISMO E DO COMPORTAMENTO
INGESTIVOS

Título da Tese:

Ingestão de alimento após a ativação de receptores 5-HT_{1A} do núcleo arqueado do hipotálamo e da área hipotalâmica lateral de ratas em duas fases do ciclo estral

Laboratório da Prof^ª. Dra. Marta Aparecida Paschoalini, Prof. Dr. José Marino Neto e
Prof. Dr. Moacir Serralvo

Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB – UFSC

Florianópolis – SC

BANCA EXAMINADORA**MEMBROS TITULARES****1. Profa. Dra. Marta Aparecida Paschoalini**

Departamento de Ciências Fisiológicas – CCB – UFSC

3. Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis

Instituto de Ciências Biológicas - ICB – UFMG

2. Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

Instituto de Ciências Biológicas - ICB – UFMG

4. Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro Lima

Departamento de Ciências Fisiológicas – CCB – UFSC

5. Prof. Dr. José Marino-Neto

Departamento de Ciências Fisiológicas – CCB – UFSC

MEMBRO SUPLENTE**1. Prof. Dr. Vander Baptista**

Departamento de Ciências Fisiológicas – CCB – UFSC

Florianópolis, 08 de Julho de 2009.

AGRADECIMENTOS

À Profª Dra Marta Aparecida Paschoalini, por ter me aceito no programa de Doutorado em Neurociências e acreditado no meu potencial para desenvolver este projeto de pesquisa.

Para meus queridos pais, Elísio Steffens e Olga Meurer Steffens, pela sua dedicação, apoio, carinho e amor indispensáveis na minha formação e em toda minha vida.

Para meus familiares, pelo constante apoio e carinho.

Para meus colegas de laboratório (Luana, Aparecida, Isabel, Amanda, Luciana, Rúbia, Samira), pelo carinho e apoio nos momentos certos. Sem todos vocês, não chegaria aqui.

Aos Profº. Dr. José Marino-Neto e Moacir Serralvo, por abrirem as portas de seus laboratórios e me darem a oportunidade de ter realizado este trabalho. Obrigado pela confiança, paciência e orientação dispensada.

Aos alunos de iniciação científica (em especial, a Danielle Beckman) por ter aparecido no momento certo, me auxiliando no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, Ana Cláudia, Péricles, Dona Vilma e Seu Carlão, pelo apoio e momentos vividos.

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos os animais utilizados neste estudo, pois sem eles nada disso poderia ter sido realizado.

E, acima de tudo à Deus, que sempre está iluminando meu caminho e me dando forças para lutar e seguir trabalhando e batalhando.

Resumo

Steffens SM. Ingestão de alimento após a ativação de receptores 5-HT_{1A} do núcleo arqueado do hipotálamo e da área hipotalâmica lateral de ratas em duas fases do ciclo estral [tese]. Florianópolis: Pós-graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina; 2009.

O presente estudo examinou os efeitos da injeção local de metergolina (MET, antagonista de receptores 5-HT₁ e 5-HT₂; 0, 2 e 20nmol), 8-hidroxi-2-(di-*n*-propilamino)-tetralina (8-OH-DPAT, agonista de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₇; 0, 6 e 6nmol) e de 8-OH-DPAT (6nmol) em ratas pré-tratadas com maleato de ciclo hexano carboxamida *n*-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-*n*-(2-piridinil) (WAY 100635, antagonista seletivo de receptor 5-HT_{1A}, 37nmol) no núcleo arqueado (ARC) e na área hipotalâmica lateral (AHL), nos comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratas. Estes efeitos foram examinados durante as fases de estro ou diestro e as ratas foram adaptadas com dieta enriquecida com sacarose 10% durante 1h, por 3 dias consecutivos, na caixa de experimento. Os resultados mostraram que a injeção de 8-OH-DPAT na AHL reduziu a ingestão de alimento em todas as doses e em ambas as fases do ciclo estral, enquanto que no ARC esse tratamento desencadeou uma resposta hipofágica, somente na maior dose de 8-OH-DPAT e apenas na fase de estro. A administração de MET (em todas as doses) no ARC não afetou a ingestão alimentar durante ambas as fases do ciclo estral examinadas. Ocorreu uma redução na ingestão de alimento após a injeção de ambas as doses de MET na AHL de ratas durante as fases de estro e diestro. Na fase de estro, a injeção da maior dose de 8-OH-DPAT no ARC e na AHL diminuiu a duração da ingestão de alimento. A latência para iniciar o consumo de alimento, a ingestão de água e de outros comportamentos não ingestivos não foi afetada pela administração de 8-OH-DPAT ou MET no ARC ou na AHL em ambas as fases do ciclo estral. O pré-tratamento com WAY 100635 na AHL bloqueou o efeito hipofágico desencadeado pela injeção de 8-OH-DPAT (6nmol) durante as fases de estro e diestro. O pré-tratamento com WAY 100635 no ARC bloqueou a resposta hipofágica, bem como a redução na duração do consumo de alimento desencadeado pela injeção de 8-OH-DPAT na fase de estro. A latência para iniciar a ingestão de alimento, ingestão de água, bem como a duração dos outros comportamentos não ingestivos, não foi afetada pelos diferentes tratamentos efetuados, pela região hipotalâmica examinada (ARC ou AHL) ou pelas diferentes fases do ciclo estral estudadas (estro e diestro). Estes resultados indicam que receptores 5-HT_{1A} participam no controle serotoninérgico de mecanismos relacionados à regulação da ingestão de alimentos localizados no ARC e na AHL. Estes circuitos serotoninérgicos relacionados com ingestão de alimento em ambas as áreas são, possivelmente, afetados por hormônios esteróides ovarianos, que poderiam aumentar a sensibilidade dos neurônios do ARC aos efeitos hipofágicos desencadeados pela injeção de 8-OH-DPAT, ou aumentar a eficácia de sinais de saciedade que desencadeiam o término do consumo de alimento. Além disso, este estudo indica que circuitos serotoninérgicos localizados no ARC e na AHL não exercem uma atividade inibitória tônica sobre circuitos neuronais relacionados com a ingestão de alimento.

Descritores: Ingestão de alimento; hipotálamo; receptores 5-HT; ciclo estral.

Abstract

Steffens SM. Food intake after the activation of 5-HT_{1A} receptors of the arcuate nucleus and the lateral hypothalamic area of rats in different estrous cycle stages [thesis]. Florianopolis: Neuroscience Pos-grade, Federal University of Santa Catarina; 2009.

This study examined the effects of local injections of metergoline (MET, 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor antagonist, 0, 2 and 20nmol), 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT, 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor agonist, 0, 0.6 and 6nmol) and 8-OH-DPAT (6nmol) in rats pre-treated with N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl) cyclohexane carboxamide maleate (WAY 100635, full 5-HT_{1A} receptor agonist, 37nmol) into the arcuate nucleus (ARC) and the lateral hypothalamic area (LHA) on ingestive and non-ingestive behaviors of female rats. These effects were examined during the diurnal periods of estrus or diestrus in rats adapted to eat a wet mash diet (enriched with 10% sucrose) during 1h by 3 consecutive days at the recording chamber. The results showed that 8-OH-DPAT injected into the LHA reduced food intake at all doses and both cycle stages, while in the ARC these treatment evoked hypophagic response only at the highest 8-OH-DPAT dose and only at the estrus phase. MET administered into the ARC (at all doses) failed to affect food intake during both estrous stages. In contrast, food intake decreased after injection of both doses of MET into the LHA of rats during estrus and diestrus phases. In estrus stage, injections of the higher dose of 8-OH-DPAT into the ARC and into the LHA decreased the duration of feeding. Latency to start feeding, drinking and non-ingestive behaviors were not affected by 8-OH-DPAT or MET treatments in the ARC or LHA in both cycle phases. The LHA pretreatment with WAY 100635 suppressed the hypophagic effects evoked by 8-OH-DPAT (6nmol) injection during estrus as well as diestrus. The ARC pretreatment with WAY 100635 blocked the hypophagia evoked by 8-OH-DPAT in estrus rats. The previous treatment with WAY 100635 in the ARC also suppressed the feeding duration decrease evoked by 8-OH-DPAT in estrus. Latency to start feeding, drinking as well as the duration of other non-ingestive behaviors were not affected by different treatments performed, hypothalamic regions examined (ARC or LHA) or the different estrous cycle stage studied (estrus and diestrus). These results indicated that 5-HT_{1A} receptors participate in the serotonergic control of feeding-related mechanisms located at the ARC and the LH. These feeding-related serotonergic circuits in both areas are possibly affected by ovarian hormones that could increase sensitivity of ARC neurons to the hypophagic effects of 8-OH-DPAT or increase the efficacy of satiety signals that terminate feeding. In addition, the present data indicated that serotonergic inputs do not exert a tonic inhibitory activity on the ARC and LH feeding-related circuits.

Descriptors: Food intake; hypothalamus; 5-HT receptors; estrous cycle.

Lista de abreviaturas

AgRP	- Proteína relacionada ao agouti
AHL	- Área hipotalâmica lateral
ARC	- Núcleo arqueado do hipotálamo
BDNF	- Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CART	- Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
CB-1	- Receptor endocanabinóide do tipo 1
CCK	- Colecistocinina
CRH	- Hormônio liberador de corticotropina
DMN	- Núcleo dorsomedial do hipotálamo
GABA	- Ácido gama-aminobutírico
GLP-1	- Peptídeo semelhante ao glucagon-1
MAO	- Enzima monoamino oxidase
MAPK	- Proteína cinase ativada por mitógeno
MCH	- Hormônio concentrador de melanina
MET	- Metergolina
NDR	- Núcleo dorsal da rafe
NPY	- Neuropeptídeo Y
NTS	- Núcleo trato solitário
OXM	- Oxintomodulina
POMC	- Pró-opiomelanocortina
PP	- Polipeptídeo pancreático
PVN	- Núcleo paraventricular do hipotálamo
PYY	- Peptídeo YY
SERT	- Transportador de serotonina de membrana
TRH	- Hormônio liberados de tiroidotropina
VMN	- Núcleo ventromedial do hipotálamo
WAY 100635	- Maleato de ciclo hexano carboxamida n-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-n-(2-piridinil)
α-MSH	- Hormônio estimulante de α -melanócito
5-HT	- 5-hidroxitriptofano; serotonina
8-OH-DPAT	- 8-hidroxi-2-(di- <i>n</i> -propilamino)-tetralina

Lista de figuras

- Figura 1.** Principais núcleos hipotalâmicos, neuropeptídeos e vias envolvidas na regulação da ingestão do alimento..... **16**
- Figura 2.** Microfotografia de um corte coronal (coloração pelo método de Nissl) do hipotálamo, ilustrando o trajeto de uma cânula guia e injetora no ARC e na AHL..... **49**
- Figura 3.** Desenho esquemático de um corte coronal do hipotálamo de rato, ilustrando o sítio aproximado das injeções de veículo; 8-OH-DPAT; metergolina e 8-OH-DPAT em ratas pré-tratadas com WAY 100635 na fase de estro ou diestro..... **50**
- Figura 4.** Ingestão de alimento 1h após o tratamento com metergolina (MET; 0, 2 e 20nmol) injetado no ARC e na AHL de ratas em fase de estro ou diestro..... **48**
- Figura 5.** Ingestão de alimento 1h após o tratamento com 8-OH-DPAT (0, 0,6 e 6 nmol) injetado no ARC e na AHL de ratas em fase de estro ou diestro..... **51**
- Figura 6.** Efeito da injeção de 8-OH-DPAT (6nmol) sobre a ingestão de alimento em ratas pré-tratadas com WAY 100635 (37nmol) em diferentes fases do ciclo estral..... **52**

Lista de quadros

Quadro 1. Efeitos de peptídeos e hormônios na ingestão de alimentos.....	14
Quadro 2. Efeitos da ativação de receptores 5-HT _{1B} ou 5-HT _{2C} no o consumo de alimento em roedores.....	25
Quadro 3. Efeitos da ativação de receptores 5-HT _{1A} no consumo de alimento em roedores.....	26
Quadro 4. Efeitos do estrogênio na ingestão de alimento e na expressão de peptídeos orexígenos e anorexígenos em núcleos hipotalâmicos de roedores.....	31

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Latência e duração de comportamentos ingestivos e não ingestivos durante 1h após o tratamento com diferentes doses de metergolina (0, 2 ou 20nmol) injetado no ARC ou na AHL de ratas em fase de estro ou diestro..... **54**
- Tabela 2.** Latência e duração de comportamentos ingestivos e não ingestivos durante 1h após o tratamento com diferentes doses de 8-OH-DPAT (0, 0.6 ou 6nmol) injetado no ARC ou na AHL de ratas em fase de estro ou diestro..... **55**
- Tabela 3.** Latência e duração de comportamentos ingestivos e não ingestivos durante 1h após o tratamento com 8-OH-DPAT no ARC de ratas pré-tratadas com WAY 100635 durante as fases de estro ou diestro..... **56**
- Tabela 4.** Latência e duração de comportamentos ingestivos e não ingestivos durante 1h após o tratamento com 8-OH-DPAT na AHL de ratas pré-tratadas com WAY 100635 durante as fases de estro ou diestro..... **57**

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de quadros	
Lista de tabelas	
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Regulação central da ingestão de alimento.....	14
1.2. Serotonina e ingestão de alimento.....	23
1.3. Influência do ciclo ovariano na ingestão alimentar.....	28
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. Objetivos gerais.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1. Animais.....	35
3.2. Cirurgia estereotáxica.....	35
3.3. Drogas administradas.....	37
3.4. Administração de drogas.....	37
3.5. Determinação do ciclo estral.....	38
3.6. Procedimentos experimentais.....	39
3.6.1. Protocolo experimental I.....	39
3.6.2. Protocolo experimental II.....	40
3.7. Registro comportamental.....	41
3.8. Análise histológica.....	42
3.9. Análise estatística.....	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Efeitos da injeção intra-hipotalâmica de metergolina.....	44
4.2. Efeitos da injeção intra-hipotalâmica de 8-OH-DPAT.....	45
4.3. Efeitos da injeção intra-hipotalâmica de 8-OH-DPAT em ratas pré-tratadas com WAY 100635.....	47
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES.....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
8. ANEXOS.....	95
8.1. Artigo publicado.....	95
8.2. Artigo submetido.....	96
8.3. Demais artigos que o aluno participou como co-autor.....	98

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o mecanismo neuroendocrinológico envolvido na regulação da ingestão de alimento e do balanço energético é um dos eventos fisiológicos mais largamente estudado. Isto, devido, principalmente, a maior incidência de transtornos causados por distúrbios alimentares como: obesidade, anorexia nervosa e bulimia (Erlanson-Albertsson, 2005; Ogden et al., 2006; Simpson et al., 2009).

Os mecanismos que controlam a ingestão de alimento envolvem uma complexa interação de sinais periféricos e do sistema nervoso central (SNC), que são influenciados não somente pela avaliação do alimento e do balanço energético, mas também, por fatores genéticos, psicológicos e ambientais (Schwartz et al., 2000).

Os peptídeos e hormônios secretados pelo trato gastrintestinal (TGI) ocupam um papel primário na complexa interação neuroendócrina que são a base da regulação da ingestão de alimento. Esses peptídeos e hormônios gastrintestinais podem atuar periféricamente e, também, diretamente em receptores localizados nos neurônios do hipotálamo e do tronco encefálico, que são regiões do SNC que fazem parte do controle central do apetite. A eminência mediana e a área postrema são caracterizadas por uma fragilidade na barreira hemato-encefálica, sendo assim, estruturas do SNC próximas, tais como o núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) e o núcleo do trato solitário (NTS), respectivamente, estão suscetíveis às influências de fatores circulantes (Chaptini e Peikin, 2008). Entre os mais extensivamente estudados encontra-se a insulina, a leptina, a colecistocinina (CCK), o polipeptídeo pancreático (PP), o peptídeo YY (PYY), o peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), a oxintomodulina (OXM) e a grelina. Exceto a grelina, todos os demais hormônios atuam no aumento da saciedade e na

redução da ingestão de alimentos. Além destes, outros peptídeos e hormônios modulam a regulação da ingestão de alimento, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1. Efeitos de peptídeos e hormônios sobre a ingestão de alimentos (Adaptado de Schwartz et al., 2000; Morton et al., 2006; Meister, 2007).

Anorexígeno	Orexígeno
Colecistocinina (CCK)	Cortisol
Hormônio estimulante de α -melanócito (α -MSH)	Endorfinas
Hormônio liberador de corticotropina (CRH)	Galanina
Insulina e leptina	Grelina
Oxintomodulina (OXM)	Hormônio concentrador de melanina (MCH)
Peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1)	Neuropeptídeo Y (NPY)
Peptídeo YY (PYY)	Orexinas A e B
Transcrito regulado pela cocaína e amfetamina (CART)	Proteína relacionada ao agouti (AgRP)

1.1. Regulação central da ingestão de alimento

As principais regiões encefálicas envolvidas na regulação da ingestão de alimento são o hipotálamo e o tronco encefálico (Murphy e Bloom, 2006). O hipotálamo foi um dos primeiros locais do SNC a ser envolvido na regulação da ingestão de alimento. Esta região do SNC também está intimamente associada com a regulação de funções orgânicas básicas, tais como a sede, a reprodução, a temperatura e o balanço hormonal.

O hipotálamo é constituído, histologicamente, por mais de 40 distintas áreas e núcleos, que podem ser divididas em diferentes núcleos e áreas. As áreas e núcleos hipotalâmicos envolvidos na regulação da ingestão de alimento e do balanço energético

incluem o ARC, o núcleo paraventricular (PVN), o núcleo ventromedial (VMN) e o núcleo dorsomedial (DMN) e as áreas hipotalâmica lateral (AHL) e perifornical (APF) (Schwartz et al., 2000; Morton et al., 2006; Murphy e Bloom, 2006; Meister, 2007; Simpson et al., 2009). Na porção anterior do hipotálamo anterior está localizado o PVN e na porção médio-basal do hipotálamo estão localizados os núcleos ARC, o VMN, o DMN e as áreas AHL e APF.

Inicialmente, vários experimentos com a utilização de lesões e estimulações de núcleos hipotalâmicos, sugeriram o papel de centro da saciedade ao VMN e de centro da fome à AHL (Stellar, 1954). Posteriormente, outros trabalhos mostraram que lesões de vários núcleos hipotalâmicos médio-basais resultavam em roedores obesos, diminuição da atividade física e distúrbios neuroendócrinos. A destruição do ARC após administração sistêmica de glutamato monossódico em ratos produzia hiperfagia e obesidade (Olney, 1969), enquanto lesões do VMN resultavam também no aumento da ingestão de alimento e do peso corporal (Debons et al., 1977). Da mesma forma, lesões situadas em núcleo anterior do hipotálamo (PVN) igualmente conduziam a hiperfagia e ganho de peso corporal em roedores (Olney, 1969).

Ao longo das últimas duas décadas, importantes avanços foram feitos para esclarecer as vias neuronais, os mediadores químicos e os mecanismos de transdução de sinais intracelulares ou extracelulares que contribuem para o processo de regulação da ingestão de alimento e do balanço energético no hipotálamo (Stanley et al., 2005; Morton et al., 2006; Simpson et al., 2009). Embora muitas outras áreas cerebrais envolvidas na regulação da ingestão de alimento sejam pesquisadas, sabe-se que, no hipotálamo, o ARC desempenha um papel integrador na regulação homeostática da ingestão de alimento, recebendo sinais da periferia (via tronco encefálico e barreira hemato-encefálica) (Broadwell e Brightman 1976; Niswender e Schwartz, 2003; Small

e Bloom, 2004). Alguns hormônios gastrintestinais, pancreáticos e do tecido adiposo são transportados pela barreira hemato-encefálica para os neurônios do ARC, tais como: insulina (Banks, 2004), leptina (Banks et al., 1996), grelina, CCK, OXM e PYY (Kastin et al., 2002; Nonaka et al., 2003). Esses peptídeos e hormônios modulam a atividade dos neurônios do ARC, que projetam eferências para outros núcleos hipotalâmicos, como o PVN, a AHL e o VMN, onde ocorreria a liberação de mais peptídeos orexígenos ou anorexígenos para modular a ingestão de alimento e o balanço energético (Figura 1) (Schwartz et al., 2000; Stanley et al., 2005; Berthoud, 2007; Valassi et al., 2008; Chaptini e Peikin, 2008; Simpson et al., 2009).

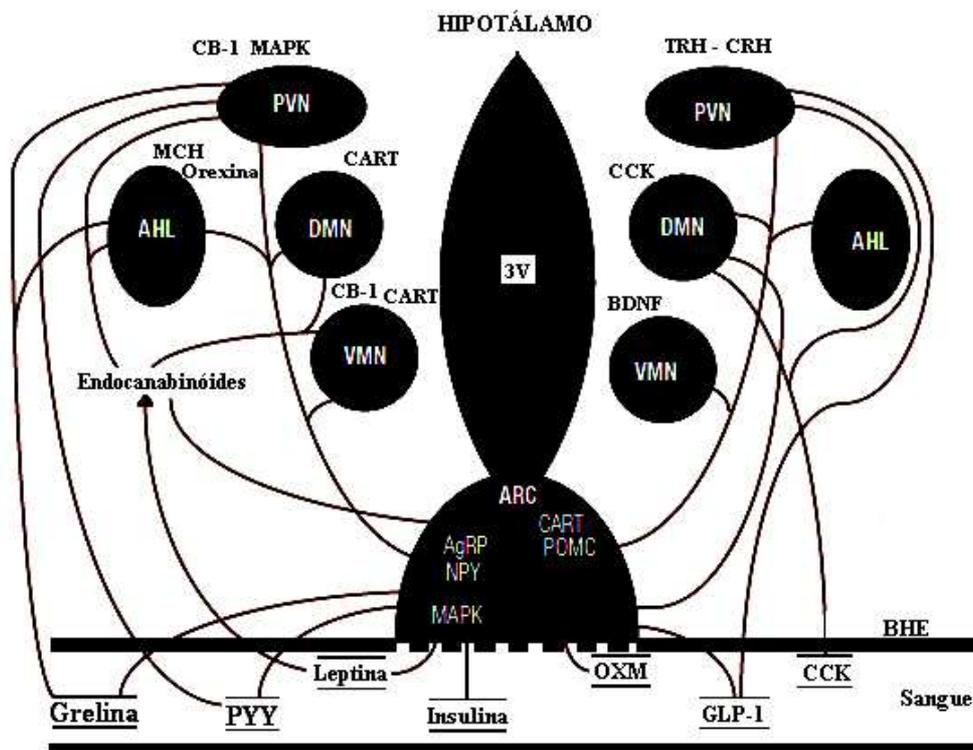


Figura 1. Principais núcleos hipotalâmicos, neuropeptídeos e vias envolvidos na regulação da ingestão do alimento. Os peptídeos e hormônios circulantes (grelina, leptina, insulina, PYY, OXM, GLP-1, CCK) agem diretamente no ARC provocando alterações nos circuitos peptidérgicos que modulam o controle da ingestão de alimento. No ARC existem neurônios que co-expressam NPY/AgRP (orexígeno) e outros que co-expressam POMC/CART (anorexígenos) e os circuitos neuronais dessas regiões hipotalâmicas utilizam receptores e neuropeptídeos específicos, como por exemplo, o hormônio liberador da corticotropina (CRH), o hormônio liberador da tireotropina (TRH), o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), a orexina, o hormônio concentrador de melanina (MCH), o NPY, a AgRP, a POMC, o CART e os endocanabinóides e o receptor endocanabinóide do tipo 1 (CB-1) (adaptado de Simpson et al., 2009).

Além disso, o ARC contém ao menos dois grupos neuronais que apresentam ações opostas relacionadas à ingestão de alimento. Um grupo de neurônios expressa peptídeos relacionados com a inibição da ingestão de alimento, co-expressando o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) e o hormônio estimulante do α -melanócito (α -MSH, derivado da pró-opiomelanocortina – POMC) (Elias et al., 1998a; 1998b; Kristensen et al., 1998). Estes neurônios projetam uma ampla rede de eferências dentro do SNC e do próprio hipotálamo (AHL, APF, PVN e DMN) (Elias et al., 1998b; Elmquist et al., 1998; Kalra et al., 1999).

Outro grupo neuronal expressa peptídeos associados ao aumento do consumo de alimento, como o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao agouti (AgRP) (Chen et al., 1999; Cone et al., 2001; Cowley et al., 2001). Estes neurônios projetam eferências, principalmente, ao PVN ipsilateral e também localmente, dentro do ARC (Bai et al., 1985). Os neurônios do ARC que expressam NPY, quando ativados, liberam localmente GABA, para inibir os neurônios que expressam POMC. Este grupo neuronal parece ser o principal alvo das ações de diversos hormônios que regulam a ingestão de alimento, incluindo a insulina, leptina, grelina e CCK (Jobst et al., 2004). Sendo assim, o ARC parece ser o local de convergência de muitos dos sinais centrais e periféricos que regulam o balanço energético do organismo (Figura 1) (Schwartz et al., 2000; Erlanson-Albertsson, 2005; Stanley et al., 2005; Valassi et al., 2008; Chaptini e Peikin, 2008, Simpson et al., 2009).

Outras regiões hipotalâmicas envolvidas na regulação da ingestão de alimento são as AHL e APF. Na verdade, a APF é uma das áreas mais sensíveis para ação do NPY induzir a alimentação, mais do que o PVN (Stanley et al., 1993). As AHL e APF contêm neurônios que expressam hormônio concentrador de melanina (MCH) (Marsh et al., 2002). Nestas áreas, a expressão de MCH é regulada pelo estado nutricional do

animal, uma vez que o jejum em ratos desencadeia um aumento na expressão de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para MCH. A injeção repetida via intracerebroventricular (i.c.v.) de MCH na AHL provoca uma resposta hiperfágica (Qu et al., 1996) e determina um aumento do tecido adiposo em ratos (Marsh et al., 2002). Inversamente, a administração de antagonista de receptor MCH-1 na AHL de ratos desencadeia uma inibição da ingestão de alimento e a administração crônica leva a uma redução sustentada no peso corporal dos animais estudados (Borowsky et al., 2002). O excesso de expressão de pré-pró-MCH resulta em camundongos que apresentam hiperfagia e obesidade (Marsh et al., 2002), enquanto camundongos que não expressam MCH exibem maior gasto energético, redução plasmática de leptina e redução na expressão de POMC no ARC e, conseqüentemente, apresentam hipofagia e são extremamente magros (Shimada et al., 1998; Marsh et al., 2002). Os camundongos que apresentam depleção de MCH e leptina têm reduzido ganho de peso e tecido adiposo comparados com camundongos ob/ob (deficientes de leptina) (Segal-Lieberman et al., 2003). Esse fato é sugestivo de que o MCH pode ser um mediador do mecanismo de ação da leptina e da POMC na regulação da ingestão de alimento e do balanço energético nesta região hipotalâmica.

As AHL/APF também exibem neurônios que expressam pré-pró-orexina e o peptídeo liberador de orexinas A e B (ou hipocretinas 1 e 2). Estudos imunorreativos na AHL/APF mostram que populações neuronais que expressam orexina são diferentes daquelas que expressam MCH (De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Os neurônios que expressam orexinas projetam uma ampla rede de eferências no SNC, incluindo o ARC, PVN, NTS e o núcleo motor dorsal do vago (De Lecea et al., 1998; Peyron et al., 1998). A orexina A tem uma alta afinidade para os receptores orexina-1, que são altamente expressos no VMN. As orexinas A e B apresentam semelhantes

afinidades para os receptores orexina-2, e, estes, são expressos principalmente no PVN (Sakurai et al., 1998). A síntese de RNAm da pré-pró-orexina é estimulada pelo jejum e a administração i.c.v. de orexina em camundongos desencadeia uma resposta hiperfágica (Sakurai et al., 1998; Hagan et al., 1999; Haynes et al., 1999). Em modelos experimentais que utilizam a privação alimentar em roedores, a orexina parece mediar a resposta hiperfágica e o comportamento de procura de alimentos. É possível que a orexina também possa agir como um regulador periférico do balanço energético, uma vez que neurônios que expressam orexinas foram encontrados no TGI. Esses mesmos neurônios expressam receptores para orexina e leptina e, esses receptores, parecem ser ativados por estado de inanição (Kirchgessner e Lin, 1999).

Estudos imunohistoquímicos mostraram a presença de NPY, AgRP, e α -MSH em terminações neuronais na AHL que estão em contato com neurônios que expressam MCH e orexina (Broberger et al., 1998; Elias et al., 1998b; Horvath et al., 1999). Os neurônios da AHL que expressam orexina apresentam receptores para NPY (Campbell et al., 2003) e para leptina (Horvath et al., 1999) e, portanto, são capazes de integrar suas ações. Além disso, um grande número de neurônios sensíveis à glicose está presente na AHL (Bernardis e Bellinger, 1996), e os neurônios que expressam orexina podem desempenhar, também, um papel neste processo regulatório. Já foi descrito que a hipoglicemia aumenta a expressão de RNAm para a orexina e de c-fos (proto-oncogene de ativação imediata; pertencente da família Fos) na AHL (Cai et al., 1999; Moriguchi et al., 1999). Os mecanismos, pelos quais, os neurônios que expressam MCH e orexina influenciam a ingestão de alimento e o balanço energético, continuam a ser estudados.

O PVN atua na integração de sinais neuropeptidérgicos, oriundos de diversas regiões encefálicas, incluindo o ARC e tronco encefálico (Sawchenko e Swanson, 1983). Em mamíferos, o PVN interage com três sistemas efetores: o endócrino, o

autonômico e o comportamental (Berthoud, 2007). É um centro integrador, no qual convergem muitas vias neurais que influenciam a ingestão de alimento e o balanço energético. É ricamente suprido por projeções neuronais que expressam NPY/AGRP e POMC/CART, vindas do ARC e projeções de neurônios que expressam orexina, vindas da AHL (Elmqvist et al., 1998). Muitas aferências chegam ao PVN oriundas do tronco encefálico, córtex cerebral e áreas límbicas (ter Horst e Luiten, 1986). É rico em terminais contendo numerosos neurotransmissores e neuropeptídeos, incluindo NPY, α -MSH, serotonina, galanina, noradrenalina e peptídeos opióides. O hormônio liberador de corticotropina (CRH) é expresso por neurônios no PVN que se projetam à eminência mediana (ARC) (Sarkar e Lechan, 2003) e podem inibir os neurônios que expressam NPY oriundos do ARC. A administração de agonistas da melanocortina no PVN de ratos, potencialmente, inibe a ingestão alimentar (Giraudou et al., 1998; Kim et al., 2000). Inversamente, a injeção de um antagonista de melanocortina no PVN de ratos estimula a ingestão alimentar (Giraudou et al., 1998). Registros eletrofisiológicas de neurônios do PVN têm demonstrado que neurônios expressando POMC do ARC inibem a sinalização inibitória GABAérgica dentro do PVN e, assim, reduzem a ingestão alimentar. Ao contrário, neurônios que expressam NPY/AgRP do ARC inibem esta sinalização GABAérgica (Cowley et al., 1999) e estimulam a ingestão alimentar. Recentes estudos sugerem que os neuropeptídeos que regulam a ingestão de alimento podem ter uma via de sinalização comum no PVN envolvendo uma proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK). Farmacologicamente, o aumento da atividade da MAPK no PVN desencadeia um aumento no consumo de alimento em ratos (Anderson et al., 2004). Muitos peptídeos e hormônios anorexígenos, tais como leptina, insulina, e os agonistas da melanocortina reduzem a atividade da MAPK, que regulam a expressão

gênica no ARC e no PVN, enquanto substâncias orexígenas, como AgRP e grelina, aumentam a atividade da MAPK (Anderson et al., 2004; Minokoshi et al., 2004).

Muitos neuropeptídeos que modulam o apetite também influenciam a função endócrina, por exemplo, a função tireoidiana e, conseqüentemente, o balanço energético. O PVN desempenha um importante papel na integração destas funções. As projeções dos neurônios que expressam NPY/AgRP e de melanocortina, a partir do ARC para o PVN, terminam em neurônios que expressam hormônio liberador de tireotropina (TRH) (Legradi e Lechan, 1999; Fekete et al., 2000). É descrito que o NPY e a AgRP inibem a expressão de pró-TRH (Fekete et al., 2002), enquanto o α -MSH estimula a expressão de pró-TRH e inibe a supressão de TRH induzido pelo jejum (Fekete et al., 2000). O PVN também contém neurônios que expressam CRH e as projeções de neurônios que contêm NPY do ARC influenciam a expressão e a liberação de CRH do PVN, desta forma modulando também o balanço energético (Sarkar e Lechan, 2003).

O VMN em mamíferos é um grande núcleo hipotalâmico e foi considerado, por muito tempo, desempenhar um importante papel na regulação da ingestão de alimento e do balanço energético, desde a constatação de que lesões bilaterais no VMN induziam resposta hiperfágica e aumento do tecido adiposo em ratos (Debons et al., 1977). Esse núcleo apresenta conexões diretas com o PVN, a AHL e o DMN (Guan et al., 1998). O VMN recebe projeções de neurônios do ARC que expressam NPY/AgRP e α -MSH e, por sua vez, projetam eferências para outros núcleos hipotalâmicos (AHL e DMN) e para regiões do tronco encefálico (NTS). Adicionalmente, recebe aferências provenientes do tronco encefálico (núcleo parabraquial e NTS) e da amígdala (Huang et al., 2003). A expressão de neuropeptídeos no VMN é modulada pelo estado nutricional. Os animais submetidos à privação alimentar apresentam elevada produção

de peptídeos orexígenos (Guan et al., 1998) e aumento na expressão de receptores MC-4 no VMN de ratos modificados geneticamente para obesidade (Huang et al., 2003). O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é altamente expresso no VMN. A expressão de BDNF no VMN é regulada pela privação de alimento e após a administração de agonistas de melanocortina em camundongos (Xu et al., 2003). Camundongos com expressão reduzida de receptor para BDNF ou redução de expressão de BDNF, apresentam um aumento na ingestão alimentar e no peso corporal (Rios et al., 2001; Xu et al., 2003). Portanto, os neurônios que expressam BDNF no VMN podem atuar como uma via adicional na regulação da ingestão de alimento e do balanço energético através da modulação do sistema de melanocortinas.

Existem evidências que o DMN apresenta um papel na modulação da ingestão de alimento. A destruição do DMN em ratos resulta em hiperfagia e obesidade, embora menos acentuadamente quando comparada à destruição do VMN (Bernardis e Bellinger, 1987). A injeção de aminoácidos ou de peptídeos orexígenos, tais como, NPY, galanina e ácido gama-aminobutírico (GABA) no DMN de ratos desencadeia um aumento na ingestão alimentar (Kelly et al., 1979; Stanley et al., 1985; Kyrkouli et al., 1990). O DMN apresenta extensas conexões com outros núcleos hipotalâmicos. Ele recebe aferências de neurônios do ARC que expressam NPY/AgRP (Kalra et al., 1999) e contém neurônios que expressam NPY. Estudos imunorreativos no DMN de ratos mostram que existe uma estreita proximidade de fibras que expressam α -MSH com aquelas que expressam NPY (Kalra et al., 1999). A administração de agonistas da melanocortina no DMN de ratos determina uma redução na expressão de NPY e desencadeia uma resposta hiperfágica nos animais estudados (Chen et al., 2004).

Atualmente, já está bem estabelecido que os diferentes núcleos hipotalâmicos sejam regulados por diferentes circuitos neuronais que utilizam neuropeptídeos

específicos, neurotransmissores não peptidérgicos ou hormônios e, que, conjuntamente participam na regulação central da ingestão de alimento. Sendo assim, no hipotálamo, ao menos 25 substâncias têm sido identificadas como participantes na regulação do comportamento ingestivo. Entre eles, algumas aminas: serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT), noradrenalina, dopamina, histamina e alguns aminoácidos: ácido glutâmico (glutamato), GABA (Kalra et al., 1999).

1.2. Serotonina e ingestão de alimento

A 5-HT tem sido implicada em muitas funções mediadas pelo SNC que incluem atividade motora, resposta ao stress, sono e comportamento alimentar (Dourish, 1985; Blundell 1986; Simansky, 1996; Rueter et al., 1997; Bickerdike et al., 1999). Na maioria das espécies de vertebrados, a ativação central de sistemas serotoninérgicos parece suprimir a alimentação (Dourish, 1985; Blundell 1986; Simansky, 1996).

A 5-HT tem um papel inibitório na modulação da ingestão de alimento (Blundell, 1986; Leibowitz e Alexander, 1988; Simansky, 1996; Halford et al., 1998). Em mamíferos tem sido demonstrado que a redução da neurotransmissão serotoninérgica estimula a ingestão de alimentos, enquanto que o aumento na liberação de 5-HT central induz hipofagia (Blundell, 1986; Simansky, 1996). O efeito hipofágico da 5-HT e de seus agonistas parece ser mediado por diversos subtipos de receptores pós-sinápticos localizados em circuitos hipotalâmicos (Bovetto e Richard, 1995).

Durante anos, o agente mais utilizado em estudos de supressão serotoninérgica da alimentação foi a fenfluramina, que, juntamente com os estimulantes anfetamínicos, constituíram os principais componentes anorexígenos comercializados mundialmente (retirados do mercado há dez anos devido à indução de doença cardíaca valvar).

A fenfluramina desencadeia um aumento generalizado na neurotransmissão serotoninérgica, devido à estimulação da liberação sináptica de 5-HT e do bloqueio da recaptação de 5-HT nos terminais pré-sinápticos (Rowland e Carlton, 1986). Em ratos alimentados *ad libitum*, a fenfluramina provoca uma redução na quantidade de alimento ingerido e aumenta o intervalo entre o consumo alimentar (Blundell e Leshem, 1975; Grinker et al., 1980; Rowland e Carlton, 1986). Efeitos similares desencadeados pela administração de fenfluramina no comportamento alimentar foram também demonstrados em uma grande variedade de espécies de mamíferos, incluindo seres humanos (Rogers e Blundell, 1979; Foltin e Moran, 1989; McGuirk et al., 1991). Inversamente, os tratamentos que reduzem a neurotransmissão serotoninérgica, tais como as injeções i.c.v. de di-hidroxitriptamina e lesões de grupos neuronais de 5-HT localizados no NDR de roedores, desencadeiam uma hiperfagia crônica e ganho de peso (Geyer et al., 1976; Saller e Stricker, 1976).

Embora seja bem conhecido que as drogas serotoninérgicas com alta afinidade para um ou mais subtipos de receptores da família 5-HT₁ e 5-HT₂ possam afetar o comportamento ingestivo, o papel específico dos diversos subtipos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}) no controle deste comportamento, assim como nos mecanismos comportamentais e neuroanatômicos que são a base dos efeitos hipofágicos destes compostos, ainda não são inteiramente compreendidos (Bovetto e Richard, 1995; De Vry e Schreiber, 2000).

Na literatura são descritos inúmeros relatos de estudos com drogas serotoninérgicas mostrando que a ativação de receptores 5-HT_{1B} ou 5-HT_{2C} reduz a ingestão alimentar (Quadro 2) (Kennet e Curzon, 1988; Samamin et al., 1989; Dourish,

1995; Halford e Blundell, 1996; Lee e Simansky, 1997; De Vry e Schreiber, 2000; Hewitt et al., 2000; Heisler et al., 2006).

Quadro 2. Efeitos da ativação de receptores 5-HT_{1B} ou 5-HT_{2C} sobre o consumo de alimento em roedores.

Ativação receptor	Alimento	Animais/via/estado nutricional	Autores
5-HT _{1B}	Redução	Ratos/ip/jejum	Kennet e Curzon, 1988
		Camundongo/ip/saciados	Halford e Blundell, 1996
		Ratos/ip/jejum	Lee e Simansky, 1997
5-HT _{2C}	Redução	Ratos/ip/saciados	Samamin et al., 1989
5-HT _{1B} e 5-HT _{2C}	Redução	Ratos/ip/icv/saciados	De Vry e Schreiber, 2000
		Camundongo/ip/saciados	Hewitt et al., 2002

Por outro lado, a ativação de receptores 5-HT_{1A} pode causar hiperfagia (Dourish et al., 1985; 1988; Gilbert e Dourish, 1987; Ebenezer, 1992; Currie e Coscina, 1993; Coscina et al., 1994; Parker e Coscina, 2001; Ebenezer e Surujbally, 2007) ou redução na ingestão de alimento (Quadro 3) (Ebenezer, 1992; Ebenezer et al., 1999; Arkle e Ebenezer, 2000; Coscina et al., 2000; Ebenezer et al., 2001; Ebenezer e Tite, 2003; Ebenezer et al., 2007; López-Alonso et al., 2007). Estes efeitos ingestivos parecem ser mediados primariamente por ativação de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} presentes no NMR, no complexo amigdalóide ou no hipotálamo (Hutson et al., 1986; Fletcher e Davies, 1990; Leibowitz et al., 1990; Currie e Coscina, 1993; Coscina et al., 2000; De Vry e Schreiber, 2000; Parker e Coscina, 2001; Parker et al., 2001; Collin et al., 2002; Heisler et al., 2002; 2006).

O efeito hiperfágico das injeções sistêmicas ou i.c.v. de metergolina, em ratos com livre acesso ao alimento, tem sido interpretado como sugestivo da presença de uma ação serotoninérgica tônica inibitória sobre circuitos de regulação central da ingestão de

alimento (Fletcher, 1988; Stallone e Nicolaidis, 1989; Leibowitz et al., 1993; Coscina et al., 1994; Currie e Coscina, 1996).

Quadro 3. Efeitos da ativação de receptores 5-HT_{1A} sobre o consumo de alimento em roedores.

Ativação receptor	Alimento	Animais/via/estado nutricional	Autores
5-HT _{1A}	Aumento	Ratos/ip/saciados	Dourish et al., 1985
		Ratos/sc/saciados	Gilbert e Dourish, 1987
		Ratos/sc/saciados	Dourish et al., 1988
		Ratos/NDR/NMR/saciados	Currie e Coscina, 1993
		Ratos/pBLA/saciados	Coscina et al., 2000
		Ratos/pBLA/saciados	Parker e Coscina, 2001
		Camundongo/sc/saciados	Ebenezer e Surujbally, 2007
5-HT _{1A}	Redução	Porcos/iv/jejum	Ebenezer et al., 1999
		Ratos/sc/jejum	Arkle e Ebenezer, 2000
		Porcos/iv/jejum	Ebenezer et al., 2001
		Ratos/ip/jejum	Ebenezer e Tite, 2003
		Ratos/sc/jejum	Ebenezer et al., 2007
		Ratos/PVN/jejum	López-Alonso et al., 2007

A região posterior da amígdala basolateral (pBLA) é um local aonde terminações serotoninérgicas podem exercer uma influência inibitória tônica, uma vez que lesões em áreas posteriores e dorsais da amígdala atenuam a ingestão de alimento desencadeada pela injeção de 8-OH-DPAT (agonista de receptor 5-HT_{1A} e 5-HT₇) e lesões restritas à pBLA bloqueiam completamente a resposta hiperfágica induzida pela injeção de 8-OH-DPAT nesta região (Coscina et al., 1994; Parker e Coscina, 2001). Adicionalmente, a injeção de MET na região pBLA desencadeia uma resposta hiperfágica (Parker et al., 2001).

O PVN do hipotálamo também parece estar envolvido nos efeitos hipofágicos induzidos pela 5-HT. A infusão direta de 5-HT, de vários agonistas de receptores serotoninérgicos ou de inibidores da recaptação de 5-HT no PVN, suprime a ingestão alimentar desencadeada por diferentes modelos experimentais (Leibowitz et al., 1990; Fletcher e Coscina, 1993; Grignaschi et al., 1995; Currie e Coscina, 1996; Mancilla-Diaz et al., 2005; Lopez-Alonso et al., 2007). Enquanto a injeção de MET no PVN inibe a resposta hipofágica desencadeada pela injeção de 5-HT no PVN (Currie e Coscina, 1996). No entanto, somente injeções de MET no PVN não afetam o consumo de ração granulada em ratos com livre acesso ao alimento (Leibowitz et al., 1993; Coscina et al., 2000), sugerindo que os impulsos neurais serotoninérgicos sobre o PVN parecem exercer apenas efeitos fásicos (mas não tônicos) sobre o comportamento alimentar.

Uma atividade serotoninérgica no controle da ingestão de alimento também tem sido observada em outros núcleos hipotalâmicos, envolvidos na regulação do balanço energético tais como o ARC e AHL, que expressam neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos (Schwartz et al., 1999; Voigt et al., 2000; Hikiji et al., 2004; Heisler et al., 2002; 2006). Existe uma intensa projeção de fibras serotoninérgicas dos NMR e NDR ao ARC e ao PVN, e há uma grande expressão de receptores 5-HT_{2A} no PVN e 5-HT_{2C} no ARC (Gundlah et al., 1999; Heisler et al., 2006). A ativação de receptores 5-HT_{2C} estimula neurônios do ARC que expressam POMC, o qual é peptídeo precursor do α -MSH (anorexígeno), enquanto que a ativação de receptores 5-HT_{1B} do ARC inibe a atividade neuronal de neurônios que expressam AgRP (orexígeno) e reduz os sinais inibitórios pós-sinápticos sobre os neurônios que expressam a POMC. Esse controle do sistema de melanocortinas pode representar um importante mecanismo, pelo qual a 5-HT reduz a ingestão de alimento (Heisler et al., 2002; 2006). A abrangência de

influências serotoninérgicas sobre outras regiões hipotalâmicas, diferente do PVN, se estão relacionadas à atividade fásica ou tônica ainda é desconhecida e precisa ser determinada.

A influência de circuitos serotoninérgicos sobre neurônios hipotalâmicos relacionados à ingestão de alimento, também pode ser mediada por receptores 5-HT_{1A}. Existe uma grande densidade destes receptores em neurônios localizados no núcleo supra-óptico, PVN, VMH, assim como no ARC e AHL (Collin et al., 2002). Neste mesmo estudo, Collin e seus colaboradores também mostraram que existe intensa imunorreatividade para receptores 5-HT_{1A} em neurônios que expressam neuropeptídeos orexígenos (NPY e AgRP) e neuropeptídeos anorexígenos (POMC e CART) no ARC. Na AHL, a imunorreatividade para receptor 5-HT_{1A} foi observada em neurônios que expressam neuropeptídeos orexígenos, tais como o MCH e orexina. Sugerindo, assim, uma importante ação de atividade serotoninérgica, mediada por receptores 5-HT_{1A}, nestes neurônios peptidérgicos localizados no ARC e na AHL. Como a imunorreatividade para 5-HT_{1A} nunca foi identificada em fibras neuronais ou terminações neuronais (Collin et al., 2002), parece que o controle da liberação de neuropeptídeos por 5-HT possa ser mediado por receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A}. Não foi encontrado na literatura, estudos funcionais sobre a possível participação destes receptores nos mecanismos de controle da ingestão de alimentos no ARC e na AHL.

1.4. Influência do ciclo ovariano na ingestão alimentar

Existem poucas diferenças sexuais no comportamento alimentar entre ratos, camundongos e seres humanos. A quantidade de alimento ingerido e o número de refeições são semelhantes entre animais machos e fêmeas. Porém, existe uma evidente diferença sexual no comportamento alimentar em ratos, camundongos e seres humanos: as fêmeas, ciclicamente, ingerem menor quantidade de alimento durante a fase peri-

ovulatória do ciclo ovariano (estro em ratos e camundongos) que nas outras fases do ciclo ovariano (Geary 2001a; b).

Os ratos e camundongos fêmeas têm ciclos ovarianos de 4-5 dias e a ingestão alimentar é de até 25% menor durante a noite em que ocorre a ovulação e estro, em comparação com outras noites do ciclo estral (cerca de 80-90% do consumo alimentar ocorre no período noturno em ratos e camundongos). Este efeito é mediado pelas alterações cíclicas na secreção de estradiol (Asarian e Geary, 2006). A concentração plasmática de estradiol é mais elevada imediatamente antes do pico do hormônio luteinizante e é muito baixa durante o estro. No entanto, em virtude da ativação de receptores estrogênicos estimularem fatores de transcrição (a maioria dos efeitos fisiológicos do estradiol tem uma latência de 12h ou mais), é perfeitamente plausível que a diminuição na ingestão alimentar na fase de estro em ratos e camundongos é causada pelo precedente aumento na secreção de estradiol (Asarian e Geary, 2002; 2006).

A realização de gonadectomia revela outras diferenças sexuais na regulação da ingestão de alimento em ratos e camundongos. Os animais fêmeas submetidos a ooforectomia apresentam maior ingestão de alimento e os machos, submetidos a orquiectomia, ingerem menor quantidade de alimento (Chai et al. 1999; Wallen et al. 2001). Importante ressaltar que, as duas alterações desencadeadas pela gonadectomia na ingestão alimentar são expressas de maneiras diferentes, nos machos ocorre redução na frequência da ingestão de alimento e nas fêmeas ocorre um aumento na quantidade total de alimento ingerido (Chai et al. 1999; Asarian e Geary, 2002). Essas alterações na ingestão de alimento são totalmente revertidas pela administração de testosterona nos machos (Chai et al. 1999; Wallen et al. 2001) e de estradiol nas fêmeas (Wade 1972; Geary 2001a; b). Sendo assim, esses achados sugerem que influências do eixo

hipotalâmico-hipofisário-gonadal na regulação da ingestão de alimento envolvem dois componentes funcionais, uma inibição tônica revelada pelo aumento do consumo alimentar após a ooforectomia e uma inibição fásica ou cíclica revelada pela ausência de redução na ingestão alimentar na fase peri-ovulatória.

O estradiol tem sido demonstrado em vários estudos como inibidor do consumo de alimento em várias espécies de animais (Geary et al., 1994; Geary e Asarian, 1999; Geary, 2001a; 2001b; Asarian e Geary, 2006; Roepke, 2009). O mecanismo pelo qual o estrógeno exerce o efeito hipofágico, ainda não está totalmente elucidado. Relatos da literatura demonstram que os neurônios serotoninérgicos apresentam alterações decorrentes da ação de esteróides ovarianos (Bethea et al., 1998). Tradicionalmente estes efeitos dos esteróides são atribuídos à ativação de receptores nucleares (McEwen, 2001). Em primatas não-humanos, os estrógenos, especificamente o estradiol, modulam várias funções homeostáticas através de fatores de transcrição via subtipos de receptores estrogênicos (RE): RE α e RE β (Couse e Korach, 1999), estimulando a expressão da enzima triptofano hidroxilase nos neurônios serotoninérgicos localizados no diencéfalo, diminuindo a expressão do transportador de 5-HT na rafe mediana (Bethea et al., 1998) e diminuindo a expressão de receptores 5-HT_{2C} nos núcleos hipotalâmicos (Gundlah et al., 1999). No quadro 4 estão relacionados os efeitos do estrogênio na expressão dos principais neuropeptídeos presentes no hipotálamo e na ingestão de alimento.

Em ratas, a regulação do comportamento alimentar por circuitos serotoninérgicos, também parece ser influenciada por alterações fisiológicas na concentração dos esteróides ovarianos que ocorrem durante o ciclo estral. Estes animais em fase de diestro apresentam efeitos hiperfágicos mais significativos após a injeção sistêmica de 8-OH-DPAT que em fase de estro (Uphouse et al., 1991).

Quadro 4. Efeitos do estrogênio sobre a ingestão de alimento e sobre a expressão de peptídeos orexígenos e anorexígenos em núcleos hipotalâmicos de roedores (adaptado de Roepke, 2009).

Núcleo	Peptídeo	Regulação pelo estrogênio	Efeito na ingestão alimento
ARC	POMC/ α -MSH	+	-
	CART	ND	-
	NP Y	-	+
	AgRP	-	+
VMN	BDNF	NR	-
	NPY	-	+
DMN	NPY	-	+
	CART	ND	-
AHL	MCH	-	+
	Orexina	?	+
	CART	ND	-
PVN	CRF	+/-	-
	TRH	ND	-
	NPY	-	-
	CART	ND	-
	BDNF	ND	-

Abreviaturas: NR: não regulação; ND: não determinado; (+) efeito ou regulação positiva; (-) efeito ou regulação negativa e (?) efeitos mistos.

Além disso, a injeção de MET na região posterior da amígdala basolateral afeta diferentemente o consumo de alimento em diferentes fases do ciclo estral, sendo os efeitos hiperfágicos dessas injeções mais evidentes em ratas fêmeas na fase de diestro que em estro (Parker et al., 2002). Neste mesmo sentido, foi demonstrado que os efeitos anoréticos da fenfluramina são mais intensos em ratas no estro que em diestro, e que a

resposta hipofágica induzida pela fenfluramina é intensificada pelo tratamento com estrogênios em ratas ooforectomizadas (Eckel et al., 2005, Rivera e Eckel, 2005).

Adicionalmente, o tratamento com estrogênio reduz a resposta hiperfágica induzida pela 8-OH-DPAT em ratas ooforectomizadas (Salamanca e Uphouse, 1992). É notável que drogas serotoninérgicas (inibidores seletivos da recaptação de serotonina) e o estradiol são eficazes em aliviar sintomas climatéricos em mulheres (Stearns e Hayes, 2002) e que o estradiol e a 5-HT, através de RE e receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT_{2C}, respectivamente, atuam sinergicamente na regulação do metabolismo energético em adolescentes do sexo feminino (Fuemmeler et al., 2008). Conseqüentemente, compreender as ações dos hormônios esteróides e da 5-HT sobre os neurônios hipotalâmicos poderá fornecer novos dados sobre as diferenças funcionais na regulação da ingestão alimentar e do balanço energético exercido pelo hipotálamo nos animais machos e fêmeas.

O projeto utilizado como base para esta tese de doutorado, representa a continuidade de uma linha de pesquisa em andamento em nosso laboratório que investiga o controle neural do metabolismo e estuda a participação de circuitos glutamatérgicos (Da Silva et al., 2003; Da Silva et al., 2006; Lopes et al., 2007; da Cunha et al., 2008) catecolaminérgicos (Sabi et al., 2002; Maidel et al., 2007; dos Santos et al., 2009) e serotoninérgicos (Steffens et al., 1997; Da Silva et al., 2004; Häckl et al., 2005; Da Silva et al., 2007; Steffens et al., 2008) no controle da ingestão de alimento em aves e mamíferos. Sobre a participação do sistema serotoninérgico na regulação da ingestão de alimento, em 1997, investigamos o efeito da administração central de serotonina (5-HT) em pombos (*Columbia livia*), no qual encontramos que a injeção i.c.v. de 5-HT e de 8-OH-DPAT (agonista de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₇) desencadeava uma resposta dipsogênica e hipofágica (Steffens et al., 1997). Da Silva et

al., em 2004 mostraram que a injeção i.c.v. de 8-OH-DPAT em pombos desencadeava um efeito lipolítico e dipsogênico e a administração i.c.v. de GR 46611 (agonista de receptores 5-HT_{1B/1D}) provocava uma resposta hipofágica, lipólise e hiperglicemia nas aves estudadas. Em seguida, foi examinado em pombos o comportamento alimentar após a administração de metergolina (antagonista de receptores 5-HT₁ e 5-HT₂) e de GR 46611 no PVN, na área póstero-medial do hipotálamo e no núcleo pré-óptico (Da Silva et al., 2007). Os resultados desse estudo mostraram que a injeção de metergolina e de GR 46611 desencadeava uma resposta hiperfágica, demonstrando, assim, que existe uma influência inibitória tônica serotoninérgica sobre a ingestão de alimento nestas áreas hipotalâmicas e sugerindo que esses circuitos serotoninérgicos, possivelmente sejam mediados por receptores 5-HT_{1B/1D}. Posteriormente, sabendo-se da existência de receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ no ARC e na AHL de ratos, decidiu-se iniciar o projeto de pesquisa intitulado: modulação serotoninérgica do comportamento ingestivo em ratos fêmeas em diferentes fases do ciclo estral, com o objetivo de localizar no hipotálamo a presença de uma influência inibitória tônica serotoninérgica sobre a ingestão de alimento, através da injeção de metergolina e de 8-OH-DPAT, administrada em ratos fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral, uma vez que hormônios esteróides ovarianos também modificam as respostas dos neurônios serotoninérgicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Este trabalho teve com objetivo geral examinar a presença de uma influência inibitória tônica da serotonina sobre neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) ou da área hipotalâmica lateral (AHL) e os efeitos da ativação dos receptores 5-HT_{1A} do ARC ou da AHL sobre a ingestão de alimento, assim como a possível influência dos hormônios ovarianos sobre esses receptores serotoninérgicos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar os efeitos da injeção de metergolina no ARC e na AHL sobre a ingestão de alimento em fase de estro e diestro de ratas.

2.2.2. Avaliar os efeitos da injeção de 8-OH-DPAT no ARC e na AHL sobre a ingestão de alimento em fase de estro e diestro de ratas.

2.2.3. Avaliar os efeitos da injeção de 8-OH-DPAT no ARC e na AHL sobre a ingestão de alimento em fase de estro e diestro de ratas pré-tratadas com WAY 100635.

2.2.4. Determinar se existe diferença no consumo de alimentos nas diferentes fases do ciclo estral e entre os diferentes tratamentos efetuados.

2.2.5. Avaliar possíveis alterações na ingestão de água (quantidade ingerida, duração e latência para iniciar a resposta de consumo), bem como as durações e latências para iniciar os comportamentos não ingestivos (exploração vertical, auto-limpeza, locomoção e imobilidade).

3. MATERIAS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC), protocolo de pesquisa número 372/CEUA e 23080.007968/2003-71. Todos os procedimentos experimentais aqui realizados estavam em acordo com os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos (*Rattus norvegicus*), fêmeas, com peso corporal variando entre 200 a 230 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram adaptados durante sete dias em uma sala com temperatura controlada entre 22 a 25°C e um ciclo claro-escuro de 12h (luz das 7h00 às 19h00). As ratas foram mantidas em caixas polipropileno (49 x 34 x 16cm), forradas com maravalha, dispendo de água e ração granulada (CR-1, Nuvilab - Nuvital Nutrientes, Brasil). Composição de macronutrientes em 100 gramas de ração: Carboidratos (56g), Proteína (22g), Gordura (4,5g) e fibras (4,92g) *ad libitum*. Durante esse período os animais foram manipulados somente durante a limpeza das caixas (a cada dois dias).

3.2. Cirurgia estereotáxica

Previamente ao ato cirúrgico, cada rata foi anestesiada com solução de cloridrato de cetamina (100mg/kg) e cloridrato de xilazina (20mg/kg), ambas do laboratório König S.A., administradas por via intraperitoneal (i.p.). Em seguida, o animal foi colocado no aparelho estereotáxico (David Kopf *Instruments*, Califórnia, EUA). Após a assepsia com álcool iodado, uma incisão longitudinal de aproximadamente 1cm foi realizada no escalpo com bisturi, seguida por ressecção com

tesoura; de forma a expor a calota craniana. A calota craniana foi exposta pela ressecção do periósteo e seca com algodão cirúrgico, com o objetivo de melhorar a adesão do acrílico. Em seguida, foi marcada a posição para a perfuração e implantação da cânula-guia, de acordo com as coordenadas descritas por Paxinos e Watson (2007). Para o núcleo arqueado (ARC): plano frontal (posterior bregma) -3,6mm, plano sagital (lateral à sutura sagital) 0,2mm e plano horizontal (abaixo da calota craniana) -7,8mm. Para a área hipotalâmica lateral (AHL): plano frontal (posterior bregma) -3,6mm, plano sagital (lateral à sutura sagital) 1,5mm e plano horizontal (abaixo da calota craniana) -7,2mm.

As cânulas-guias (0,6mm de diâmetro externo e 18mm de comprimento) foram confeccionadas a partir de agulhas injetoras hipodérmicas de 23G (Becton Dickinson indústria cirúrgica – Brasil), sendo que a ponta desta cânula foi posicionada a 2mm acima do ARC ou da AHL. Na posição previamente determinada, foi realizado um orifício na calota craniana com aproximadamente 1mm de diâmetro, por intermédio de uma broca esférica de uso odontológico. A cânula-guia foi introduzida e ancorada à calota craniana, juntamente com um parafuso inoxidável de joalheiro contra-lateral e fixada com acrílico polimerizável líquido (monômero de metil metacrilato – Laboratório Dencril – Brasil) e pó acrílico (co-polímero metil metacrilato – Laboratório Artigos Odontológicos Clássicos Ltda. – Brasil); formando uma estrutura sólida capaz de resistir aos eventuais choques mecânicos com a caixa e a grade de proteção. Em cada cânula-guia foi ajustado um mandril de aço inoxidável para evitar sua obstrução. Imediatamente após o procedimento cirúrgico, cada animal retornou ao biotério onde foi mantido individualmente em caixas de polipropileno. Após um período de recuperação, que variou de cinco a sete dias, iniciaram-se os procedimentos experimentais.

3.3. Drogas administradas

Neste estudo as doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios sobre efeitos da injeção central de 8-OH-DPAT (Dourish et al., 1985; Gilbert e Dourish, 1987; Dourish et al., 1988; Coscina et al., 2000; Häckl et al., 2005), de MET (Fletcher, 1988; Stallone e Nicolaidis, 1989; Coscina et al., 1994; Currie e Coscina, 1996; Da Silva et al., 2007) e de WAY 100635 (Mancilla-Diaz, 2005) efetivas em influenciar seletivamente o comportamento ingestivo e não ingestivo em ratos ou pombos. De acordo com o protocolo experimental, as seguintes drogas foram utilizadas:

3.3.1. Veículo (Veic): solução de ácido ascórbico 5% (estéril, livre de pirógenos, pH 7,4) utilizada nos experimentos de controle e sendo também usada como diluente das demais drogas deste estudo.

3.3.2. Metergolina (MET): antagonista de receptores 5-HT₁ e de 5-HT₂ (Tocris Cookson Inc., Ellisville MO, EUA) nas doses de 2 e 20 nmol.

3.3.3. 8-hidroxi-2-(di-*n*-propilamino)-tetralina (8-OH-DPAT): agonista de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₇ (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) nas doses de 0,6 e 6 nmol.

3.3.4. Maleato de ciclo hexano carboxamida *n*-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-*n*-(2-piridinil) (WAY 100635): antagonista seletivo de receptor 5-HT_{1A} (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) na dose de 37 nmol.

3.4. Administração das drogas

A administração de veículo ou das drogas foi realizada através de agulha injetora, confeccionada a partir de uma agulha gengival, 30G (Injecta produtos odontológicos – Brasil) medindo 20mm de comprimento, conectada por um tubo de

polietileno (PE 10) a uma microseringa Hamilton de 1 μ L. Seu tamanho excedeu o da cânula-guia em 2mm. Com o objetivo de minimizar variações de pressão no parênquima, as soluções foram administradas no período de 1min, seguidos por mais 1min (de espera) para permitir uma melhor difusão da solução pelo parênquima neural. O PE 10 foi preenchido com água destilada e o deslocamento de uma bolha de ar no tubo foi utilizado para verificar se a droga foi realmente injetada. O volume injetado foi sempre constante de 0,2 μ L. A injeção das drogas foi realizada em animais despertos, a partir do décimo dia após a implantação da cânula-guia no ARC ou AHL.

3.5. Determinação da fase do ciclo estral

As amostras de epitélio vaginal foram obtidas diariamente entre 10h00 e 11h00 a partir do sétimo dia após o ato cirúrgico para implantação da cânula. Estas amostras foram coletadas com uma pipeta de plástico contendo 10 μ L de solução salina (NaCl 0,9%) inserida no intróito vaginal da rata. O fluido vaginal contido no interior desta pipeta foi colocado em lâminas de vidro. Para cada animal foi usada uma lâmina diferente. Esta lâmina foi observada sob luz de um microscópio óptico, com lentes objetivas de 10 e 40x. A fase do ciclo estral foi determinada, utilizando-se os critérios padrões adotados por Long e Evans (1922) e Freeman (2006). A fase de metaestro foi caracterizada por leucócitos interpostos com pequenos nichos de células vaginais cornificadas e anucleadas ou leucócitos interpostos com células epiteliais nucleadas. O diestro foi caracterizado por leucócitos interpostos com células epiteliais nucleadas. O proestro foi caracterizado por células epiteliais grandes, nucleadas, ausência de leucócitos e, ocasionalmente, presença de pequenos nichos de células vaginais cornificadas. O estro foi caracterizado por células epiteliais grandes e anucleadas e células vaginais escamosas cornificadas. As amostras de epitélio vaginal foram examinadas por dois observadores independentes para se caracterizar a fase do ciclo

estral. A fase de diestro é precedida por baixos níveis plasmáticos de estradiol e o estro é precedido por uma alta secreção de estradiol (Freeman, 2006), assim foram escolhidas essas duas fases do ciclo estral para conduzir este projeto de pesquisa. Uma outra razão para a escolha dessas fases é que as ratas comem menos durante o estro que em diestro (Eckel e Geary, 1999; Eckel et al., 2000, 2004, 2005; Geary, 2001; Asarian e Geary, 2006). Neste estudo todas as ratas utilizadas no experimento exibiam regularmente ciclo estral de 4-5 dias.

3.6. Procedimentos experimentais

3.6.1. Procedimento experimental I

Sete dias após a implantação da cânula-guia, os animais foram colocados dentro da caixa de registro comportamental, que continha em seu interior um recipiente de vidro (Placa de Petri, de 5cm de diâmetro) contendo 20g de ração enriquecida com sacarose 10% (Fletcher, 1988) e uma garrafa de vidro contendo 100mL de água. Essa garrafa possuía um bico de aço inoxidável que projetava para o interior da caixa de registro. Após o período de habituação nesse ambiente durante 1h/dia, por três dias consecutivos, suficiente para os animais atingirem a ingestão máxima e estável da dieta enriquecida com sacarose 10%, as ratas, portanto cânulas-guias na AHL durante o estro receberam uma injeção de veículo (n=7); 8-OH-DPAT 0,6 nmol (n=7) ou 6 nmol (n=7); MET 2 nmol (n=7) ou 20 nmol (n=6) e durante o diestro receberam uma injeção de veículo (n=14); 8-OH-DPAT 0,6 nmol (n=8) ou 6 nmol (n=8); MET 2 nmol (n=7) ou 20 nmol (n=9). Os animais que portavam cânulas-guias no ARC foram igualmente divididos. Todos os experimentos foram realizados entre 13h00 e 15h00.

3.6.2. Procedimento experimental II

Sete dias após a implantação da cânula-guia, os animais foram colocados dentro da caixa de registro comportamental, que continha em seu interior um recipiente de vidro (Placa de Petri, de 5cm de diâmetro) contendo 20g de ração enriquecida com sacarose 10% (Fletcher, 1988) e uma garrafa de vidro contendo 100mL de água. Essa garrafa possuía um bico de aço inoxidável que projetava para o interior da caixa de registro. Após o período de habituação nesse ambiente durante 1h/dia, por três dias consecutivos, suficiente para os animais atingirem a ingestão máxima e estável da dieta enriquecida com sacarose 10%, as ratas, portando cânulas-guias na AHL, foram separadas em estro e diestro e receberam uma injeção de veículo (ácido ascórbico 5%) e, após 7min de espera, receberam outra injeção de veículo (n=8; grupo controle) ou 8-OH-DPAT 6 nmol (n=8); outro grupo, separado em estro e diestro recebeu uma injeção de WAY 100635 37 nmol e, após 7min, recebeu outra injeção de veículo (n=8) ou de 8-OH-DPAT 6 nmol (n=8). Os animais, portando cânulas-guias no ARC, foram igualmente divididos. Cada animal recebeu somente um tratamento (uma dose de droga ou veículo) e foi examinado numa única fase do ciclo estral. Imediatamente, após a injeção, o animal era colocado na caixa de registro, e por um período de 1h, foi realizado o registro dos comportamentos ingestivos e não ingestivos. Todos os experimentos foram realizados entre 13h00 e 15h00.

3.7. Registro comportamental

A caixa experimental foi confeccionada em vidro transparente de 4mm de espessura, possuindo as medidas de comprimento e de largura similares aos da caixa de hospedagem (49 X 34cm). Porém, tendo a medida de altura maior (40cm) para evitar fugas. O assoalho da caixa e as três paredes laterais foram recobertas com plástico

adesivo preto; uma parede lateral da caixa permaneceu com vidro transparente em que está colocado um espelho com uma angulação que não permitia ao animal visualizar sua imagem refletida durante o experimento, mas que possibilitou a visualização lateral dos seus comportamentos e o registro digitalizado dos mesmos para posterior análise.

As seguintes categorias comportamentais (latência para iniciar os comportamentos ingestivos e não ingestivos, bem como, a sua duração) foram utilizadas, como previamente descritas por Halford et al.,1998:

Ingestão de alimento (comer)	Quando o animal ingerir diretamente o alimento (dieta enriquecida com 10% de sacarose) do disco de Petri ou com as patas frontais; a quantidade refere-se à diferença entre a quantidade de ração apresentada no início da sessão experimental e a ração existente ao final da mesma, medida em gramas, representando um registro alimentar do consumo durante os 60min da sessão.
Ingestão de água (beber)	Quando o animal se aproxima do bico do bebedouro e lambe diretamente a sua ponta.
Exploração vertical	Quando o animal explorar o ambiente e apoiado ao solo somente nas patas traseiras, estando as patas dianteiras livres e não apoiadas no fundo da caixa (ereto).
Manutenção (auto-limpeza)	Quando o animal apresentar comportamentos típicos de auto-limpeza, como: limpar a cabeça com as patas, limpar as unhas, coçar o corpo ou genitais, morder a cauda.
Locomoção	Quando o animal deambular pela caixa, sem apresentar qualquer outro dos comportamentos já citado. Quando o animal estiver deambulando pela caixa ou movimentos circulares que envolvam as quatro patas.
Imobilidade	Quando o animal permanecer imóvel, sem apresentar qualquer outro comportamento já citado.

O registro foi realizado com a utilização de uma câmera filmadora de vídeo (Sony CCD-Iris color) colocada numa altura de 60cm sobre o assoalho da caixa de registro, o que permitia uma visualização completa de todos os ângulos da referida caixa. Posteriormente, o registro contido em fita VHS (*Video Home System*) era transcrito em aparelho de videocassete acoplado ao monitor de vídeo e simultaneamente no microcomputador foram analisadas detalhadamente as categorias comportamentais, com utilização do programa Etholog 2.2 (Ottoni, 2000).

3.8. Análise histológica

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados e o correto posicionamento das cânulas, foi verificado pela marcação prévia com Azul de Evans (injeção de 0,2 μ L, administrados através da cânula-guia, com o auxílio da cânula injetora) para marcar os locais de injeção no ARC ou na AHL. Os animais foram perfundidos transcardialmente com solução salina a 0,9% (100 – 150mL), seguida por solução de formol a 10%. Os encéfalos foram removidos e permaneceram em solução de formol a 10% por cinco a sete dias. Posteriormente, foram removidos e cortados em plano coronal com vibrátomo (fatias de 100 μ m). As fatias foram colocadas em lâminas próprias para microscopia e permaneceram em local isolado por sete dias para secagem. Após este período foi realizada a coloração, utilizando-se a técnica de violeta cresil e colocada lamínula, deixando em processo de secagem natural por mais sete dias. Posteriormente, os cortes dispostos nas lâminas foram examinados e documentados por uma câmera atada ao microscópio de luz (lentes objetivas de 100 a 400x). A nomenclatura utilizada para as áreas hipotalâmicas foi àquela adotada por Paxinos e Watson (2007). Os dados provenientes de ratas que exibiam outras áreas hipotalâmicas marcadas, além de ARC ou AHL foram excluídos deste estudo.

3.9. Análise estatística

Os dados obtidos no experimento I foram analisados estatisticamente por intermédio de uma análise de variância de três vias (ANOVA), tendo como fator 1 as doses utilizadas (metergolina 0, 2 e 20 nmol ou 8-OH-DPAT 0, 0,6 e 6 nmol), fator 2 a região hipotalâmica estudada (ARC ou AHL) e como fator 3 a fase do ciclo estral (diestro e estro). No experimento II os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se um teste de análise de variância de três vias (ANOVA), usando como fator 1 os diferentes tratamentos (grupo controle (veículo); Veículo+8-OH-DPAT; Veículo+WAY 100635 e WAY 100635+8-OH-DPAT); fator 2 a região hipotalâmica estudada (ARC ou AHL) e como fator 3, a fase do ciclo estral (diestro e estro). Todos estes testes foram seguidos, quando apropriados, por teste *post-hoc* de Duncam. O $p < 0,05$ foi aceito como sendo estatisticamente significativo neste estudo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) nos testes utilizados.

4. RESULTADOS

A localização dos sítios de injeção dos tratamentos efetuados é mostrada nas figuras 2 e 3. O número de injeções para cada sítio hipotalâmico estudado em cada fase do ciclo estral, bem como, para cada tratamento efetuado está descrito nas tabelas 1 e 2.

4.1. Efeitos da injeção intra-hipotalâmica de metergolina

A análise de variância (ANOVA) de três vias indicou que a ingestão de alimento após a injeção de MET foi afetada significativamente pela região anatômica examinada [$F(1, 77) = 18,15$; $p = 0,000057$] e pelas doses das drogas utilizadas [$F(2, 77) = 26,78$; $p = 0,000001$]. Foi observada também uma interação significativa entre a região anatômica e as doses utilizadas [$F(2, 77) = 7,27$; $p = 0,0012$]. No ARC, injeções de MET, em todas as doses, não alteraram o consumo de alimento em ambos os estágios do ciclo estral estudado (estro/diestro) (Figura 7). Porém, ambas as doses de MET desencadearam uma resposta hipofágica quando administradas na AHL de ratas nas fases de estro e diestro (Figura 4).

A duração da ingestão de alimento após as injeções de MET, também foi afetada significativamente pela região anatômica estudada [$F(1, 77) = 57,92$; $p = 0,000001$], pelas doses utilizadas [$F(2, 77) = 8,73$; $p = 0,00038$] e pelas diferentes fases do ciclo estral [$F(1, 77) = 4,55$; $p = 0,036$]. A duração do consumo de alimentos não foi afetada após a injeção de ambas as doses de MET no ARC em estro ou diestro. Porém, a maior dose de MET (20 nmol) injetada na AHL reduziu a duração de ingestão alimentar somente na fase de estro. A duração do consumo de alimento em ambas as fases do ciclo estral não foi alterada em resposta ao tratamento com a menor dose de MET na AHL. A injeção de ambas as doses de MET na AHL e em ambas as fases do ciclo estral desencadearam uma duração da ingestão de alimento menor que àquela observada nos

experimentos com MET no ARC (Tabela 1). A administração de veículo e de ambas as doses de MET na AHL (em ambas as fases do ciclo estral) causou uma redução na duração do consumo alimentar significativamente menor que àquela observada após o mesmo tratamento no ARC (Tabela 1). A latência para iniciar a ingestão de alimento permaneceu inalterada após o tratamento com ambas as doses de MET na AHL ou no ARC de ratas nas fases de estro e diestro.

Os comportamentos de ingestão de água e a duração de outros comportamentos não ingestivos (exceto imobilidade) não foram afetados pela administração de MET no ARC ou na AHL em ambas as fases do ciclo estral. A análise de variância mostrou que a duração do comportamento de imobilidade foi significativamente afetada pelo tratamento com MET de acordo com a região anatômica estudada [$F(1, 77) = 8,67$; $p = 0,0042$] e com as doses utilizadas [$F(2, 77) = 4,18$; $p = 0,018$]. Na fase de estro, a administração da menor dose de MET na AHL aumentou a duração do comportamento de imobilidade. A duração de imobilidade após o tratamento com a menor dose de MET e durante a fase de diestro na AHL foi significativamente maior que àquela exibida por animais na mesma fase do ciclo estral e tratadas com a mesma dose de MET no ARC (Tabela 1).

4.2. Efeitos da injeção intra-hipotalâmica de 8-OH-DPAT

A ingestão de alimento após a administração de 8-OH-DPAT foi significativamente afetada pela região anatômica estudada [$F(1, 77) = 5,93$; $p = 0,017$] e pelas doses do tratamento utilizado [$F(2, 77) = 29,22$; $p = 0,000001$]. Ocorreu uma interação significativa entre a região anatômica estudada e as doses utilizadas neste estudo [$F(2, 77) = 3,05$; $p = 0,048$]. A injeção de ambas as doses de 8-OH-DPAT na AHL e em ambas as fases do ciclo estral nas ratas causou uma redução significativa na

ingestão de alimento. No entanto, no ARC este mesmo tratamento desencadeou uma significativa resposta hipofágica somente quando utilizada a maior dose de 8-OH-DPAT (6 nmol) e apenas durante a fase de estro (Figura 5). A administração da maior dose de 8-OH-DPAT na AHL desencadeou uma resposta hipofágica durante a fase de estro, semelhante àquela obtida no experimento do ARC (Figura 5).

A duração total do comportamento de ingestão de alimento após a injeção de 8-OH-DPAT também foi afetada pela região anatômica estudada [$F(1, 77) = 55,94$; $p = 0,000001$] e pelas doses utilizadas [$F(2, 77) = 10,43$; $p = 0,000097$]. Interações significativas entre as doses empregadas e as fases do ciclo estral estudadas [$F(2, 77) = 6,48$; $p = 0,0024$] e entre todos os fatores examinados [$F(2, 77) = 3,63$; $p = 0,03$] também foram observadas. Na fase de estro, a administração da maior dose de 8-OH-DPAT no ARC e na AHL desencadeou uma redução significativa na duração do consumo alimentar, mas este tratamento durante a fase de diestro em ambas as regiões hipotalâmicas não alterou a duração deste comportamento. O tratamento com o veículo e ambas as doses de 8-OH-DPAT na AHL, em ambas as fases do ciclo estral estudadas, desencadeou uma redução na duração da ingestão alimentar que foi significativamente menor que àquela desencadeada pelo mesmo tratamento no ARC (Tabela 2). Interessante notar que o tratamento com 8-OH-DPAT, em ambas as regiões do hipotálamo estudadas, não alterou significativamente a latência para a ingestão de alimento nas diferentes doses utilizadas e nas diferentes fases do ciclo estral. Os comportamentos de ingestão de água e a duração de outros comportamentos não ingestivos não foram afetados pela injeção de 8-OH-DPAT no ARC ou na AHL em ambas as fases do ciclo estral.

4.3. Efeitos da injeção intra-hipotalâmica de 8-OH-DPAT em ratas pré-tratadas com WAY 100635

A ingestão de alimento foi afetada pelo tratamento realizado [$F(2, 103) = 24,51$; $p = 0,00000$] e pela região anatômica examinada [$F(1, 103) = 8,18$; $p = 0,005$]. Ocorreu também uma significativa interação entre o tratamento realizado e as fases do ciclo estral estudadas [$F(2, 103) = 2,92$; $p = 0,037$] e entre o tratamento efetuado, fases do ciclo estral estudadas e região anatômica examinada [$F(3, 103) = 2,75$; $p = 0,046$]. A injeção de 8-OH-DPAT na AHL reduziu a ingestão de alimento em ambas as fases do ciclo estral estudadas. O pré-tratamento com WAY 100635 bloqueou o efeito hipofágico desencadeado pela administração de 8-OH-DPAT durante ambas as fases do ciclo estral. É interessante observar que a injeção isolada de WAY 100635 desencadeou uma significativa redução na ingestão de alimento em diestro (Figura 6). O tratamento com 8-OH-DPAT no ARC provocou uma redução no consumo de alimento somente na fase de estro. Esta resposta hipofágica foi bloqueada pela injeção prévia de WAY 100635 no ARC (Figura 9).

A análise de variância mostrou que a duração da ingestão de alimento foi afetada pelo tratamento realizado [$F(3, 103) = 3,36$; $p = 0,021$] e ocorreu também uma significativa interação entre o tratamento realizado e as fases do ciclo estral utilizadas no estudo [$F(3, 103) = 3,87$; $p = 0,011$]. A injeção de 8-OH-DPAT no ARC reduziu a duração do consumo de alimento somente na fase de estro. O pré-tratamento com WAY 100635 bloqueou a redução da duração da ingestão de alimento desencadeada pela administração de 8-OH-DPAT em ratas durante o estro. A duração do consumo de alimento permaneceu inalterada após todos os demais tratamentos realizados na AHL em estro ou diestro (Tabela 3). A latência para iniciar o consumo de alimento não foi

afetada por qualquer tratamento efetuado na AHL ou no ARC em ambas as fases do ciclo estral (Tabela 3).

A análise de variância também revelou que a duração total da atividade locomotora foi afetada pelo tratamento realizado [$F(3, 123) = 5,30; p = 0,019$] e pelas fases do ciclo estral estudadas [$F(1, 123) = 4,38; p = 0,0387$]. A injeção de 8-OH-DPAT na AHL desencadeou um aumento significativo na duração da atividade locomotora em ratas pré-tratadas com WAY 100635 durante a fase de diestro (Tabelas 3 e 4). A ingestão de água e a duração de outros comportamentos não ingestivos não foram afetadas pelos diferentes tratamentos realizados, região hipotalâmica examinada (ARC ou LH) e/ou fase do ciclo estral estudada (estro e diestro) (Tabelas 3 e 4).

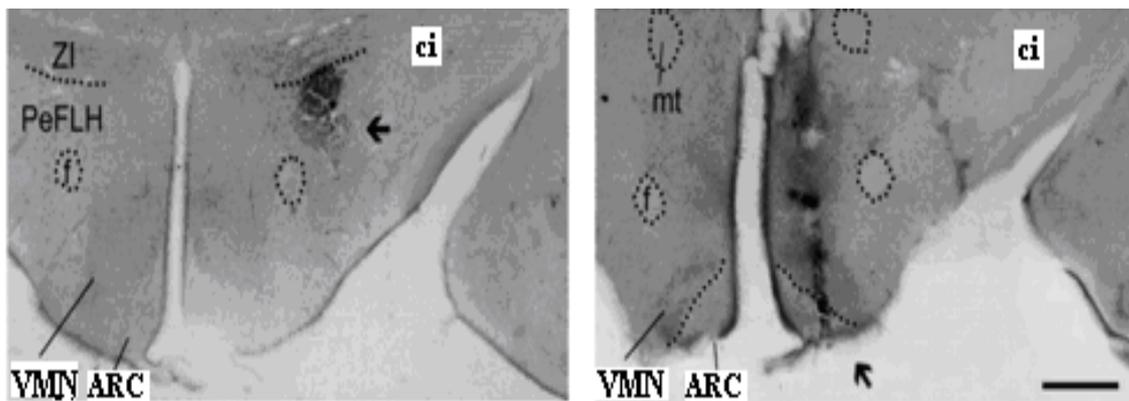


Figura 2. Microfotografia de um corte coronal (coloração pelo método de Nissl) do hipotálamo de rato, ilustrando o trajeto de uma cânula-guia e injetora no ARC e na AHL. A flecha indica o sítio da micro-injeção localizada na AHL à direita e no ARC à esquerda. Abreviaturas: AHL: área hipotalâmica lateral; ARC: núcleo arqueado do hipotálamo; ci - cápsula interna; f – fórnix; mt - trato mamilo-talâmico; PeFLH - parte perifornical do hipotálamo lateral; VMN - núcleo ventromedial; ZI - zona incerta. Escala da barra = 100 μ m.

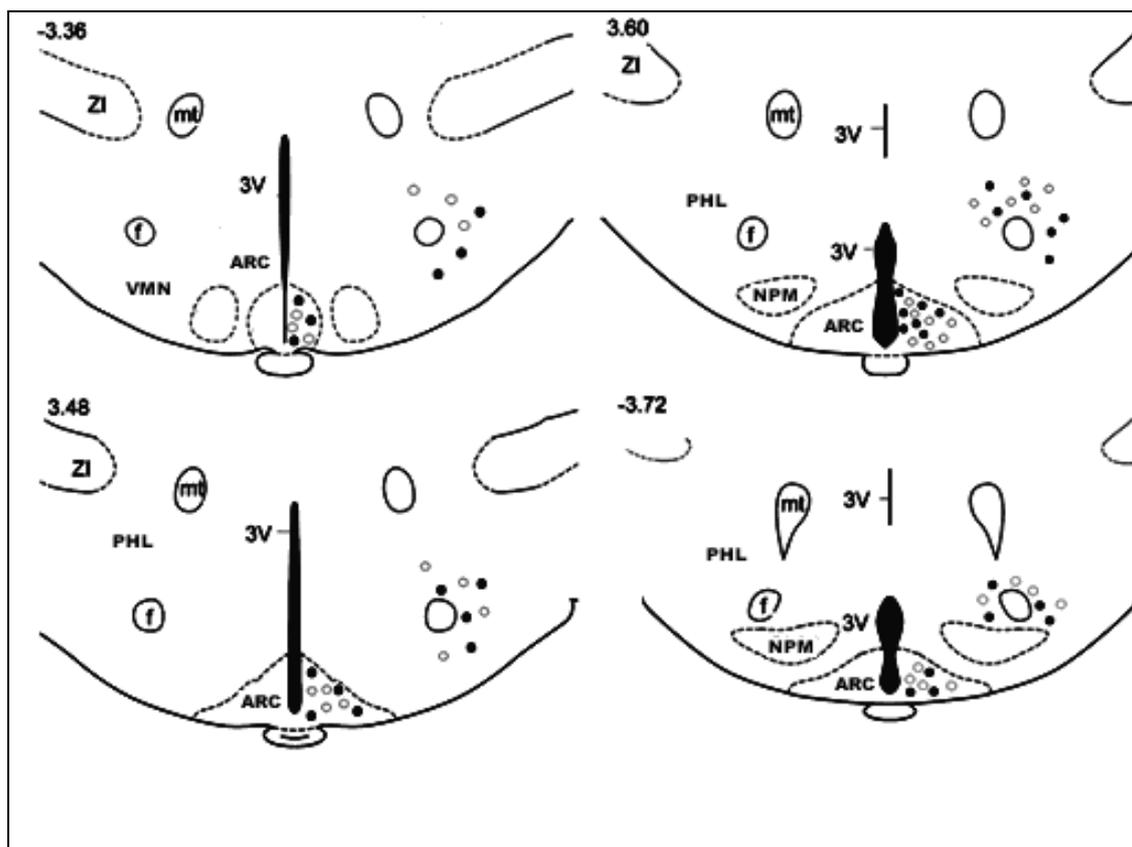


Figura 3. Desenho esquemático de um corte coronal do hipotálamo de rato, ilustrando o sítio aproximado das injeções de veículo; 8-OH-DPAT; metergolina e 8-OH-DPAT em ratas pré-tratadas com WAY 100635 na fase de estro (●) ou diestro (○). Abreviaturas: 3V - Terceiro ventrículo; ARC - núcleo arqueado do hipotálamo; cp - pedúnculo cerebral; f - fórnix; mt - trato mamilo-talâmico; PHL - parte peduncular do hipotálamo lateral; NPM - parte ventral do núcleo pré-mamilar; VMN - núcleo ventromedial; ZI - zona incerta. Os números no topo se referem às coordenadas estereotáxicas ântero-posteriores, obtidas do Atlas de Encéfalo de Rato (Paxinos e Watson, 2007).

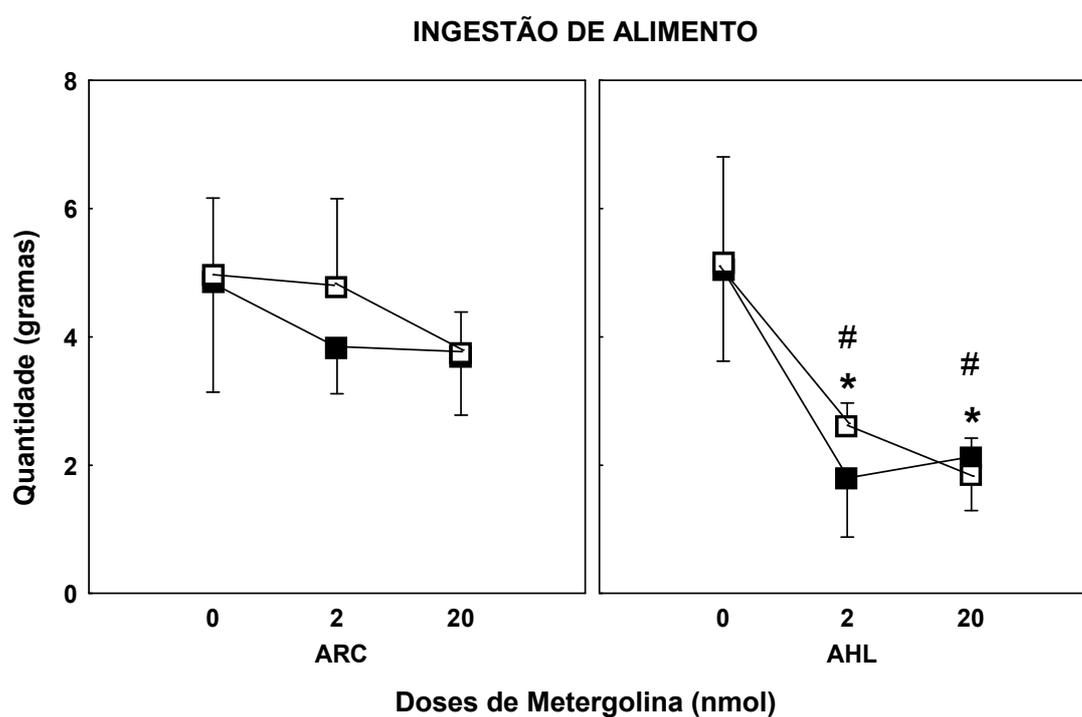


Figura 4. Ingestão de alimento 1h após o tratamento com metergolina (MET; 0, 2 e 20nmol) injetada no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) e na área hipotalâmica lateral (AHL) de ratas em fase de estro (□) ou diestro (■). Todos os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ quando comparado ao veículo injetado no mesmo sítio; (#) $p < 0,05$ quando comparado à mesma dose injetada no ARC.

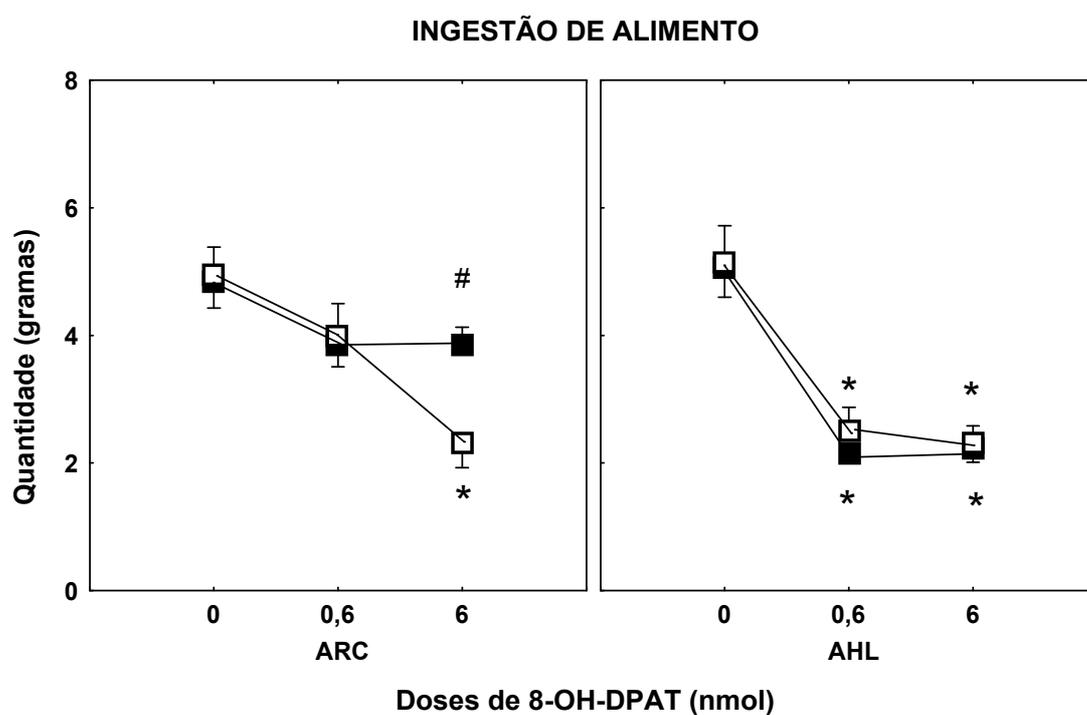


Figura 5. Ingestão de alimento 1h após o tratamento com 8-OH-DPAT (0, 0,6 e 6nmol) injetado no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) e na área hipotalâmica lateral (AHL) de ratas em fase de estro (□) ou diestro (■). Todos os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ quando comparado ao veículo injetado no mesmo sítio; (#) $p < 0,05$ quando comparado à mesma dose injetada na AHL.

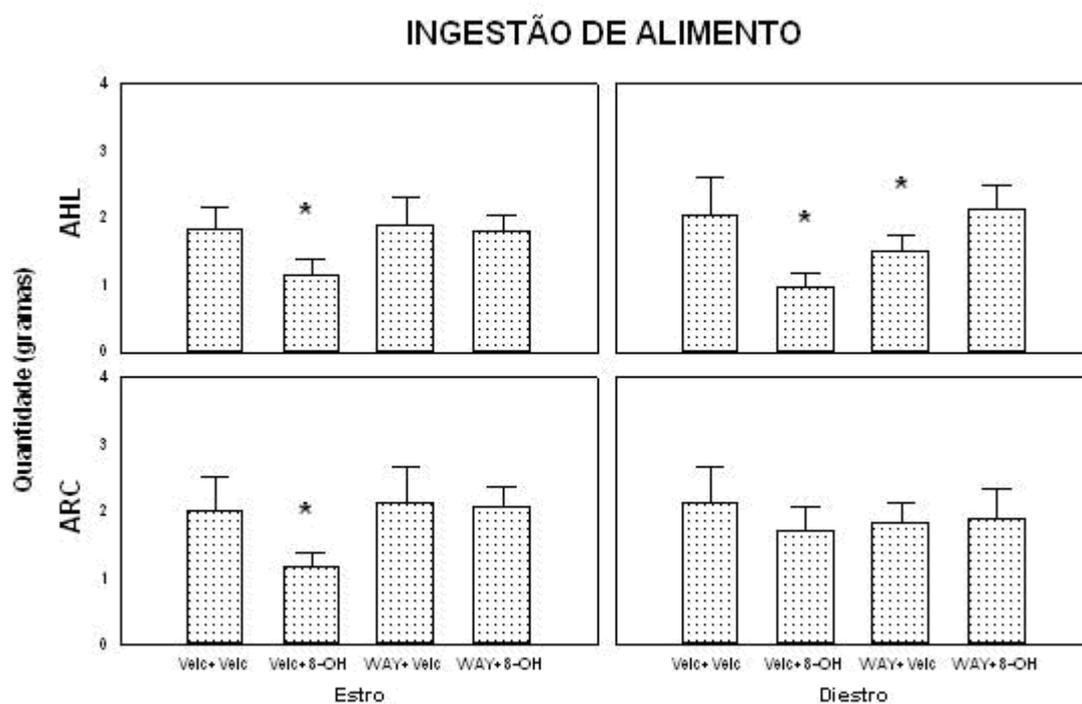


Figura 6. Efeito da injeção de 8-OH-DPAT (6nmol) sobre a ingestão de alimento em ratas pré-tratadas com WAY 100635 (37nmol) em diferentes fases do ciclo estral. Todos os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 8 animais por grupo (n=8). (*) $p < 0,05$ quando comparado ao veículo injetado no mesmo sítio. Abreviaturas: ARC: núcleo arqueado do hipotálamo; AHL: área hipotalâmica lateral; Veic: veículo; WAY: WAY 100635 e 8-OH: 8-OH-DPAT.

Tabela 1. Latência e duração de comportamentos ingestivos e não ingestivos durante 1h após o tratamento com diferentes doses de Metergolina (0, 2 ou 20nmol) injetada no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) ou na área hipotalâmica lateral (AHL) de ratas em fase de estro ou diestro.

Núcleo hipotalâmico	ARC						AHL					
	Estro			Diestro			Estro			Diestro		
Fase do ciclo estral	0 (n=7)	2nmol (n=7)	20nmol (n=6)	0 (n=14)	2nmol (n=7)	20nmol (n=9)	0 (n=7)	2nmol (n=7)	20nmol (n=6)	0 (n=14)	2nmol (n=7)	20nmol (n=9)
Latência comer	511±92	472±91	352±85	530±62	468±71	587±55	413±42	480±11	383±25	511±42	385±11	487±25
Duração comer	200±42	196±31	157±25	159±42	159±32	148±25	189±32	74±31* #	57±29* #	149±37	72±41* #	66±32* #
Duração auto-limpeza	584±56	542±120	519±133	553±69	516±128	603±98	480±67	401±132	440±80	560±88	426±120	589±89
Duração locomoção	243±28	279±44	234±25	257±31	245±19	357±46	270±19	327±31	279±37	342±24	265±22	336±23
Duração exploração vertical	357±79	264±57	374±69	351±43	265±39	296±47	267±43	286±48	292±43	212±40	281±21	253±60
Duração imobilidade	1117±127	1191±133	941±91	975±113	916±138	1027±176	915±162	1712±227*	1069±160	1222±105	1386±166#	1106±248

Todos os dados são expressos em segundos (média ± erro padrão da média). Os números entre parênteses se referem ao número de animais examinados para cada tratamento. Durante os experimentos todos os animais exibiram atividade locomotora imediatamente após serem colocados na caixa experimental e nenhum dos animais ingeriu água. (*) p<0,05 quando comparado ao veículo injetado no mesmo sítio; (#) p<0,05 quando comparado ao mesmo tratamento no ARC.

Tabela 2. Latência e duração de comportamentos ingestivos e não ingestivos durante 1h após o tratamento com diferentes doses de 8-OH-DPAT (0, 0.6 ou 6nmol) injetado no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) ou na área hipotalâmica lateral (AHL) de ratas em fase de estro ou diestro.

Núcleo hipotalâmico	ARC				AHL							
	Estro		Diestro		Estro		Diestro					
Fase do ciclo estral	0 (n=7)	0,6nmol (n=7)	6nmol (n=7)	0 (n=14)	0,6nmol (n=8)	6nmol (n=8)	0 (n=7)	0,6nmol (n=7)	6nmol (n=7)	0 (n=14)	0,6nmol (n=8)	6nmol (n=8)
Doses de 8-OH-DPAT	0 (n=7)	0,6nmol (n=7)	6nmol (n=7)	0 (n=14)	0,6nmol (n=8)	6nmol (n=8)	0 (n=7)	0,6nmol (n=7)	6nmol (n=7)	0 (n=14)	0,6nmol (n=8)	6nmol (n=8)
Latência comer	611±92	534±98	696±99	530±62	494±78	493±86	413±42	430±28	783±36	511±42	428±28	949±36
Duração comer	200±42	178±28	72±21*	159±42	192±38	173±36	179±32	72±29* #	66±26*	168±37	78±41*#	89±29*#
Duração auto-limpeza	584±56	542±43	477±106	553±69	506±110	611±143	380±67	458±77	513±79	560±88	465±33	716±108
Duração locomoção	243±28	228±64	287±48	257±31	263±37	311±43	270±19	230±41	282±66	242±24	298±58	245±24
Duração exploração vertical	257±79	286±47	218±31	321±43	363±52	344±31	267±43	289±45	266±45	212±40	288±32	266±39
Duração imobilidade	1117±127	1241±213	1221±148	975±113	977±111	843±104	915±162	1141±142	1066±165	1222±105	1117±137	916±138

Todos os dados são expressos em segundos (média ± erro padrão da média). Os números entre parênteses se referem ao número de animais examinados para cada tratamento. Durante os experimentos todos os animais exibiram atividade locomotora imediatamente após serem colocados na caixa experimental e nenhum dos animais ingeriu água. (*) p<0,05 quando comparado ao veículo injetado no mesmo sítio; (#) p<0,05 quando comparado ao mesmo tratamento efetuada no ARC.

Tabela 3. Latência e duração de comportamentos ingestivos e não ingestivos durante 1h após o tratamento com 8-OH-DPAT (6nmol) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) de ratas pré-tratadas com WAY 100635 (37nmol) durante as fases de estro ou diestro.

Fase do ciclo estral	ARC							
	Estro				Diestro			
Tratamento	Veic+Veic	Veic+8-OH	Veic+WAY	WAY+8-OH	Veic+Veic	Veic+8-OH	Veic+WAY	WAY+8-OH
Latência comer	478±90	446±80	388±81	463±69	465±78	406±49	461±65	476±80
Duração comer	156±32	106±15*	162±31	152±42	165±22	146±27	145±25	168±31
Duração auto-limpeza	417±116	465±103	510±110	424±69	619±121	584±97	508±95	503±124
Duração locomoção	258±78	265±55	269±64	331±78	280±79	314±89	357±46	337±81
Duração exploração vertical	387±89	303±79	357±77	308±93	347±69	351±83	280±57	325±88
Duração imobilidade	991±187	1138±211	1063±195	963±153	893±158	957±162	878±176	988±192

Todos os dados são expressos em segundos (média ± erro padrão da média) de 8 animais por tratamento em cada fase do ciclo estral. Durante os experimentos todos os animais exibiram atividade locomotora imediatamente após serem colocados na caixa experimental e nenhum dos animais ingeriu água. (*) $p < 0,05$ quando comparado ao veículo injetado no mesmo sítio. Abreviaturas: Veic: veículo; WAY: WAY 100635 e 8-OH: 8-OH-DPAT.

Tabela 4. Latência e duração de comportamentos ingestivos e não ingestivos durante 1h após o tratamento com 8-OH-DPAT (6nmol) na área hipotalâmica lateral (AHL) de ratas pré-tratadas com WAY 100635 (37nmol) durante as fases de estro ou diestro.

Fase do ciclo estral	AHL							
	Estro				Diestro			
	Veic+Veic	Veic+8-OH	Veic+WY	WAY+8-OH	Veic+Veic	Veic+8-OH	Veic+WY	WAY+8-OH
Latência comer	571±90	566±84	516±84	440±67	406±77	463±49	431±57	469±81
Duração comer	142±62	145±75	160±51	133±62	167±42	153±32	146±31	160±32
Duração auto-limpeza	582±76	610±110	541±113	407±89	486±98	480±67	503±98	578±132
Duração locomoção	221±82	255±65	256±49	289±91	215±79	280±59	241±56	397±61*
Duração exploração vertical	266±89	308±89	276±57	248±63	299±69	310±73	304±67	318±88
Duração imobilidade	976±197	1004±181	1106±139	1005±193	996±188	1027±169	1060±206	965±196

Todos os dados são expressos em segundos (média ± erro padrão da média) de 8 animais por tratamento em cada fase do ciclo estral. Durante os experimentos todos os animais exibiram atividade locomotora imediatamente após serem colocados na caixa experimental e nenhum dos animais ingeriu água. (*) $p < 0,05$ quando comparado ao veículo injetado no mesmo sítio. Abreviaturas: Veic: veículo; WAY: WAY 100635 e 8-OH: 8-OH-DPAT.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelaram que a ingestão de alimentos diminuiu após a injeção de ambas as doses de MET na AHL durante as fases de estro e de diestro. Além disso, a maior dose de MET, aqui utilizada, injetada na AHL reduziu a duração do consumo alimentar somente durante o estágio de estro. Considerando as inúmeras evidências que a atividade dos circuitos 5-HT conduz geralmente a um efeito inibitório sobre a ingestão de alimentos, poderia parecer inesperado que a MET, um antagonista de receptores 5-HT₁ e de 5-HT₂, não desencadeasse uma resposta hiperfágica.

A MET administrada sistemicamente ou i.c.v. em ratos desencadeia uma resposta hiperfágica em vários protocolos experimentais para o estudo da ingestão de alimentos, tais como, no início da parte escura do ciclo claro-escuro (Leibowitz et al., 1993; Currie e Coscina, 1996); durante o ciclo claro (Coscina et al., 1994); animais habituados a comer ração de laboratório própria para roedores (Coscina et al., 1994); animais adaptados a uma dieta mais palatável (Fletcher, 1988); disponibilidade de alimento antes dos experimentos (Fletcher, 1988) ou quando os animais são submetidos à restrição alimentar por 3h previamente ao experimento (Stallone e Nicolaidis, 1989); em experimentos com possibilidade de seleção de macronutrientes (Leibowitz et al., 1993; Stallone e Nicolaidis, 1989), ou ainda, quanto às diferentes durações dos experimentos (Dourish et al., 1989; Stallone e Nicolaidis, 1989; Coscina et al., 1994).

Por outro lado, uma resposta hipofágica tem sido descrita após a administração periférica ou intra-PVN de MET em ratos habituados a ingerir uma dieta líquida mais palatável ou dieta com alto teor de gordura ou em ratos com livre acesso a uma dieta com alto teor de gordura (Hartfield et al., 2003; Lin e York, 2005). A administração

periférica ou central de MET reduziu a frequência de comer, nos experimentos onde o animal era exposto a uma dieta mais palatável (Halford et al., 1998). A administração central de MET, também potencializa a ingestão seletiva de dieta rica em carboidrato (Stallone e Nicolaidis, 1989), aumenta a tendência natural do rato em consumir este macronutriente no início da fase escura (Leibowitz et al., 1993), embora outros autores tenham mostrado que após a administração sistêmica ou i.c.v. de MET, nenhuma alteração ocorreu no consumo de alimento ou nas escolhas calóricas ou de macronutrientes (Grignaschi et al., 1999, Jourdan et al., 2003).

Assim, os efeitos da MET na ingestão de alimento parecem ser complexos desde que respostas hiperfágica/hipofágica ou nenhum efeito sobre o consumo de alimento foram descritos. Conseqüentemente, o efeito hipofágico observado neste estudo não contradiz necessariamente aos efeitos hiperfágicos da MET descritos na literatura.

Os efeitos hipofágicos desencadeados por injeções de MET na AHL no presente estudo poderiam ser atribuídos, parcialmente, a mudanças de comportamentos não ingestivos, desde que a duração do comportamento de imobilidade aumentou após o tratamento com a menor dose de MET na AHL durante a fase de estro. O aumento no comportamento de imobilidade (comportamento considerado semelhante ao sono) após o tratamento com este bloqueador de receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ na AHL, é interessante, em virtude que importantes grupos neuronais presentes nesta região estão envolvidos no controle do despertar e do ciclo sono-vigília. Estes grupos neuronais relacionados ao despertar incluem neurônios histaminérgicos e orexinérgicos da AHL, sendo os neurônios orexinérgicos responsáveis pela interação com circuitos monoaminérgicos do tronco encefálico (incluindo os neurônios 5-HT da rafe) na estabilização da transição entre estágios de sono e de vigília (Saper et al., 2005).

Estes resultados podem sugerir que aferências 5-HT forneçam algum efeito tônico (influências que promovam o despertar sobre circuitos da AHL), uma hipótese que parece consistente com a evidência eletrofisiológica registrada em animais despertos, no qual neurônios 5-HT regulam de forma particular um modelo de baixa descarga nestes animais, que gradativamente deteriora-se através do ciclo sono-vigília (Jacobs e Fornal, 1999), tornando-se virtualmente inativo durante a fase REM (*Rapid Eye Movements*) do sono. Uma interpretação alternativa para o aumento na duração do comportamento de imobilidade em nossos resultados é que este comportamento possa ser uma parte integrante da sequência comportamental de saciedade (alimentação-manutenção-descanso) (Halford e Blundell, 1996; Gundlach et al., 1998; Halford et al., 1998), que foi antecipado por injeções de MET na AHL.

O tratamento com MET no ARC não desencadeou alterações nos comportamentos ingestivos em ambas as fases do ciclo estral das ratas estudadas. Estes resultados, juntamente com os efeitos hipofágicos desencadeados pela injeção de MET na AHL, indicam a ausência de influências inibitórias tônicas serotoninérgicas sobre neurônios, localizados no ARC ou na AHL envolvidos no controle da ingestão de alimento. A administração de MET no PVN de ratos também não desencadeia uma resposta hiperfágica (Coscina et al., 1994). Coletivamente esses resultados indicam a ausência de influência inibitória tônica da 5-HT em três importantes núcleos hipotalâmicos (ARC e AHL, no presente estudo; e PVN) relacionados na regulação da ingestão de alimento.

É importante ressaltar que durante os estados de privação alimentar, ocorre um aumento na síntese e na recaptção de 5-HT, bem como na captação de triptofano na AHL (Kantak et al., 1977; Kantak et al., 1978) e um aumento extracelular de 5-HT nesta região durante a ingestão de uma dieta altamente palatável ou mais saborosa

(Schwartz et al., 1989). Alguns estudos têm descrito que existem impulsos serotoninérgicos no ARC relacionados com a regulação do balanço energético e da ingestão de alimento (Heisler et al., 2002; 2006). A ativação de receptores 5-HT_{1B} no ARC hiperpolariza os neurônios que expressam AgRP (orexígeno) e reduz o efeito inibitório sobre os neurônios que expressam POMC (anorexígeno), enquanto a ativação de receptores 5-HT_{2C} aumenta a atividade de neurônios que contêm o hormônio α -MSH (anorexígeno) (Heisler et al., 2002; 2006). Estes dados sugerem que influências serotoninérgicas direcionadas ao ARC ou AHL possam controlar a ingestão de alimento durante condições específicas, de modo fásico e não tônico inibitório. Como indicado na introdução deste estudo, esta situação contrasta com os efeitos observados após infusão bilateral de MET na região posterior da amígdala basolateral (pBLA), onde ocorre uma resposta hiperfágica em ratos fêmeas (Parker et al., 2001), indicando que existe uma influência tônica inibitória serotoninérgica sobre o consumo de alimento neste sítio extra hipotalâmico.

É interessante notar que em aves (*Columba livia*), em oposição ao observado nos ratos, os impulsos serotoninérgicos, dirigidos para áreas hipotalâmicas ventromediais e para uma região comparável ao PVN de mamíferos, podem exercer uma atividade inibitória tônica sobre a ingestão de alimento. As injeções locais de MET e de GR46611 (agonista de receptores 5-HT_{1D/1B}), no PVN, i.c.v. ou nos núcleos medial e lateral do hipotálamo posterior e no núcleo magnocelular pré-óptico, desencadeiam uma intensa resposta hiperfágica nesta espécie (Da Silva et al., 2007). Estes dados sugerem que em aves e em mamíferos existem circuitos inibitórios mediados por 5-HT que atuam na regulação da ingestão de alimento no hipotálamo e no complexo amigdalóide. Entretanto, as aves exibem perfis diferentes das ações 5-HT em mecanismos hipotalâmicos relacionados ao comportamento alimentar.

Além disso, a resposta na ingestão de alimento desencadeada pela administração de 8-OH-DPAT (agonista de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₇) nos animais difere de acordo com o estado nutricional. Experimentos realizados em ratos, mostram que, após o tratamento sistêmico com 8-OH-DPAT, ocorre redução na ingestão de alimento nos animais submetidos à restrição alimentar e aumento da ingestão de alimento nos animais saciados (Dourish et al., 1985; Ebenezer et al., 1999; Ebenezer et al., 2001; Ebenezer et al., 2007; Ebenezer e Surujbally, 2007). A hiperfagia desencadeada pela administração de 8-OH-DPAT é atribuída à ativação de receptores 5-HT_{1A} (autorreceptor somato-dendrítico) encontrados nos NMR e NDR, que desencadeiam uma inibição da atividade neuronal serotoninérgica, provocando redução na liberação de 5-HT em áreas do prosencéfalo (Fletcher e Coscina, 1993; Currie e Coscina, 1996; Coscina et al., 2000). Este mecanismo proposto sugere a presença de um tônus inibitório serotoninérgico, exercido por neurônios localizados nos núcleos da rafe sobre estruturas prosencefálicas, relacionadas com o controle da ingestão de alimento. Este mecanismo inibitório sobre a ingestão de alimento não foi encontrado no ARC e na AHL no presente experimento, uma vez que o tratamento com MET não desencadeou uma resposta hiperfágica.

No presente estudo, a injeção de 8-OH-DPAT na AHL reduziu a ingestão de alimento em ambas as fases de ciclo estral das ratas. O mesmo tratamento no ARC diminuiu a ingestão de alimento somente durante o estágio de estro e apenas com a maior dose de 8-OHDPAT. Os comportamentos não ingestivos permaneceram inalterados após este tratamento no ARC e na AHL, portanto, os efeitos hipofágicos desencadeados pela administração de 8-OH-DPAT não podem ser atribuídos às mudanças na atividade motora ou em outras categorias comportamentais (não-ingestivas).

Estudos imunohistoquímicos mostraram a presença de receptores 5-HT_{1A} no corpo celular e nos dendritos proximais de neurônios do ARC que expressam peptídeos orexígenos, como o NPY e AgRP ou em neurônios contendo neuropeptídeos anorexígenos, como a POMC (precursor do α -MSH) e o CART (Collin et al., 2002). Como os receptores 5-HT_{1A} em neurônios nunca foram visualizados em fibras ou terminações neuronais, parece que a regulação da liberação, pela 5-HT, dos neuropeptídeos produzidos por neurônios do ARC possa ser mediada por receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos (Collin et al., 2002). Além disso, a 5-HT parece ser liberada em locais do ARC, onde receptores 5-HT_{1A} estão presentes, uma vez que fibras neuronais serotoninérgicas foram encontradas bem próximas aos neurônios contendo receptores 5-HT_{1A} (Collin et al., 2002). Na AHL, receptores 5-HT_{1A} foram encontrados no corpo celular de neurônios que expressam peptídeos orexígenos, como o MCH e a orexina A. Também foram observadas fibras neuronais contendo transportador para a 5-HT próximas a corpos celulares contendo receptores 5-HT_{1A} (Collin et al., 2002).

Como indicado acima, demonstrou-se que influências serotoninérgicas, através da ativação de receptores 5-HT_{1B}, inibem a atividade neuronal de AgRP e reduzem sinais inibitórios pós-sinápticos nos neurônios que expressam POMC, enquanto a ativação de receptores 5-HT_{2C} estimula neurônios relacionados à POMC (Heisler et al., 2002; 2006). Os resultados aqui apresentados sugerem que circuitos serotoninérgicos que controlam os neurônios peptidérgicos do ARC possam também incluir os receptores 5-HT_{1A}, além dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}.

Assim, poderíamos sugerir que a resposta hipofágica induzida pela injeção de 8-OH-DPAT no ARC, no presente trabalho, poderia ser desencadeada pela redução na liberação de NPY e de AgRP e pelo aumento na liberação do α -MSH e CART. Vários estudos têm demonstrado a existência de imunorreatividade para fibras neurais e

axônios que expressam NPY, AgRP e α -MSH na AHL e, que estes, estão em contato com outros neurônios que expressam MCH e orexina (Broberger et al., 1998; Elias et al., 1998; Broberger, 2005; Stanley et al., 2005). Além disso, existe evidência que fibras dos neurônios que expressam orexina se projetam ao ARC (Peyron et al., 1998; Stanley, 2005). Neste estudo, é difícil esclarecer as conexões existentes entre os neurônios peptidérgicos e não peptidérgicos do ARC e da AHL que são responsáveis pelos efeitos hipofágicos desencadeados por injeções de MET ou de 8-OH-DPAT, nestes núcleos hipotalâmicos.

Ao contrário do observado no ARC, ambas as doses de 8-OH-DPAT desencadearam uma resposta hipofágica quando injetadas na AHL. Em ratos alimentados *ad libitum* e que são mantidos com restrição alimentar durante 2h antes do experimento, a administração periférica de 8-OH-DPAT desencadeia uma redução na liberação extracelular de 5-HT. Quando o alimento estava disponível para ratos saciados durante a sessão experimental, a resposta alimentar desencadeada pela injeção de 8-OH-DPAT induziu um aumento na 5-HT extracelular comparado ao grupo com restrição alimentar após a injeção 8-OH-DPAT. A concentração de 5-HT extracelular não foi afetada pelo tratamento com 8-OH-DPAT em animais privados de alimento com ou sem restrição alimentar durante o período experimental. Em animais não saciados e que, após o tratamento com 8-OH-DPAT, tiveram acesso ao alimento ocorreu uma redução na ingestão alimentar, a liberação de 5-HT extracelular permaneceu inalterada nesta condição, o que poderia ser atribuído ao baixo consumo de alimento observado neste experimento (Voigt et al., 2000).

Estes resultados sugerem que influências serotoninérgicas para o hipotálamo lateral sejam ativas somente quando o consumo alimentar ocorre realmente. Interessante observar é que a ativação dos receptores 5-HT_{1B} ou 5-HT_{2C} na AHL não

afeta a ingestão de alimentos (Hijiki et al., 2004), sugerindo que a influência serotoninérgica à AHL sobre os efeitos hipofágicos pode ser mediada por outro subtipo de receptor 5-HT. No entanto, os presentes dados sugerem que os receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A} poderiam mediar os efeitos hipofágicos da 5-HT na AHL.

Na AHL, a presença de receptor 5-HT_{1A} e de transportadores de 5-HT foi observada em corpos celulares de neurônios que contêm dois peptídeos orexígenos (MCH e orexina A) (Collin et al., 2002). Estes dados indicam que a resposta hipofágica induzida pelo tratamento com 8-OH-DPAT na AHL poderia ser mediada pela diminuição na liberação de MCH e/ou da orexina A. Em ratos, a administração i.c.v. de MCH também desencadeia uma resposta dipsogênica independente da ingestão de alimento (Clegg et al., 2003; Morens et al., 2005). Os dados apresentados aqui excluem uma participação dos receptores 5-HT_{1A} dos neurônios da AHL no controle da ingestão de água; visto que não foram encontradas alterações neste comportamento após o tratamento com 8-OH-DPAT ou MET.

A utilização de doses de agonistas de receptores 5-HT_{1A}, que normalmente aumentam a ingestão de alimento (ração comercial granulada) em ratos saciados, pode reduzir a ingestão de alimento em animais habituados a ingerir alimento palatável (Swiergiel e Dunn, 2000; Ebenezer e Tite, 2003). Concordando com estes resultados, o tratamento com 5-HT no PVN diminui a ingestão de carboidrato, mas não altera o consumo de proteína ou de gordura (Mancilla-Diaz et al., 2005). Este efeito inibitório sobre o consumo de carboidratos é bloqueado pela administração de antagonistas de receptores 5-HT_{1A} ou 5-HT_{1B} (Mancilla-Diaz et al., 2005).

Além disso, a injeção de 8-OH-DPAT no PVN reduz a ingestão de carboidrato em ratos (López-Alonso et al., 2007). Coletivamente estes dados sugerem que a ativação de receptores 5-HT_{1A} parece reduzir a ingestão de carboidratos e que estes receptores

poderiam ser encontrados no PVN (Mancilla-Diaz et al., 2005, López-Alonso et al., 2007), ARC e AHL (no presente estudo). Entretanto, os efeitos de agentes serotoninérgicos na ingestão de alimentos foram mostrados em diferentes modelos experimentais e na dependência de inúmeros fatores, incluindo a palatabilidade da dieta (Dourish et al., 1988; Stallone e Nicolaidis, 1989; Halford e Blundell, 1996), os macronutrientes oferecidos (Leibowitz et al., 1993; Grignaschi et al., 1999; Jourdan et al., 2003), o regime alimentar dos animais e do período do ciclo claro/escuro estudado (Fletcher, 1988; Coscina et al., 1994; Currie e Coscina, 1993; Ebenezer et al., 2001; Ebenezer e Surujbally, 2007). Tal situação implica que as mudanças no comportamento de alimentação observado no presente estudo podem não ser significativas no contexto da ingestão de alimento como um todo, sendo, porém, válidas para situações quando um regime de alimentação programado de uma dieta mais palatável esteja presente.

Este estudo também mostra que os hormônios esteróides ovarianos podem afetar os efeitos hipofágicos desencadeados pelo tratamento com 8-OH-DPAT no ARC. Ao contrário, a resposta hipofágica desencadeada pela administração de 8-OH-DPAT na AHL não foi afetada por esteróides ovarianos, uma vez que a magnitude dessa redução no consumo de alimento na fase de estro foi similar àquela observada na fase de diestro. Este resultado indica que o controle da ingestão de alimento por receptores 5-HT_{1A} do ARC poderia ser influenciado por hormônios esteróides gonadais. O estradiol parece ser o hormônio ovariano envolvido nas alterações de respostas dos neurônios 5-HT do ARC a 8-OH-DPAT, uma vez que a resposta hiperfágica desencadeada pela administração sistêmica de 8-OH-DPAT é diferente nas várias fases do ciclo estral em ratas. Além disso, o tratamento com estradiol em ratas ooforectomizadas atenua a hiperfagia induzida por agonista 5-HT_{1A} (Uphouse et al., 1991; Salamanca e Uphouse, 1992).

Um estudo realizado em fêmeas adultas de macacos *rhesus* (*Macaca mulatta*) mostrou que o número de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos do hipotálamo diminui após tratamento com estrogênio ou com estrogênio combinado com progesterona, porém permanece inalterado quando utilizado a progesterona isoladamente (Lu e Bethea, 2002). Adicionalmente, um regime cíclico de tratamento com estrogênio em ratas ooforectomizadas aumenta o efeito anorético da fenfluramina (Rivera e Eckel, 2005). A resposta hiperfágica observada após a ooforectomia é atribuída ao declínio dos níveis circulantes de estradiol (não de progesterona), uma vez que somente a reposição de estradiol é capaz de reverter a ingestão de alimento em ratas ooforectomizadas (Geary e Asarian, 1999).

Em acordo com os resultados aqui apresentados, estudos prévios da literatura sugerem que a sensibilidade à influência inibitória tônica exercida pela 5-HT no controle da ingestão de alimento parece ser mais evidente durante o estro que em outras fases do ciclo estral em ratas. A infusão de MET na pBLA desencadeia uma intensa resposta hipofágica em ratas durante a fase de estro, quando comparada àquela desencadeada em ratas na fase de diestro. Conseqüentemente, a sinalização inibitória da 5-HT sobre a ingestão de alimento parece ser mais intensa no estro em circuitos da pBLA (Parker et al., 2002).

Adicionalmente, tem sido relatado que a anorexia induzida pelo tratamento com fenfluramina é maior no estro que no diestro (Eckel et al., 2005; Rivera e Eckel, 2005). Ao contrário, a hiperfagia induzida por tratamento com agonista 5-HT_{1A} é mais evidente em ratas na fase de diestro que em proestro ou estro (Uphouse et al., 1991). Como a resposta hiperfágica é mediada pelo autorreceptor pré-sináptico 5-HT_{1A} e a resposta hipofágica é mediada por receptores pós-sinápticos, poderia ser sugerido que o estrógeno afeta diferentemente os receptores pré ou pós-sinápticos de 5-HT.

Em modelos experimentais, nos quais o NDR é estudado, os resultados apresentados são similares e sugerem que o estrogênio reduz a função de receptores 5-HT_{1A} e, que, a secreção pré-ovulatória do estradiol em ratas reduz a expressão de receptores 5-HT_{1A} (Maswood et al., 1995). Também em ratas, o estrogênio diminuiu a capacidade da 8-OH-DPAT em inibir neurônios 5-HT localizados no NDR (Lakoski e Cunningham, 1988).

Em primatas não humanos (*Macaca mulatta*) ooforectomizadas, o tratamento com estrogênio e progesterona diminui a expressão de RNAm de autoreceptores 5-HT_{1A} no NDR (Pecins-Thompson e Bethea, 1999). Adicionalmente, a ligação do receptor com proteína G após estimulação induzida pela 8-OH-DPAT é reduzida por tratamento com hormônios ovarianos em ratas ou macacas ooforectomizadas (Lu e Bethea, 2002, Le Saux e Di Paolo, 2005).

No hipotálamo, a função de receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A} em resposta ao estrógeno foi investigada em ratas ooforectomizadas e os resultados inconsistentes foram atribuídos à espécie estudada, às diferenças nos desenhos experimentais (período de observação diurno/noturno) e devido ao regime de reposição de estrógeno em diferentes doses e/ou durações (Biegon et al., 1982; Frankfurt et al., 1994; Flugge et al., 1999; Gundlah et al., 1999; Lu e Bethea, 2002; Raap et al., 2002).

Entretanto, estudos de microdiálise *in vivo* mostraram que as concentrações de 5-HT diminuíram no hipotálamo durante o estágio de estro em ratas com ciclo estral normal (Gundlah et al., 1998). Conseqüentemente, no curso das flutuações nos níveis de 5-HT durante o ciclo estral, os baixos níveis do neurotransmissor durante a fase de estro poderiam levar ao aumento na expressão de receptores 5HT_{1A} neste estágio do ciclo ovariano, assim aumentando o padrão de resposta dos neurônios localizados no ARC a 8-OH-DPAT. Alternativamente, poderia ser possível que somente um aumento

nos sítios de ligação dos receptores 5-HT_{1A} no ARC (Biegon et al., 1982; Flugge et al., 1999) sem alterar a liberação de 5-HT na fenda sináptica, o que poderia ser suficiente para o efeito hipofágico desencadeado pela administração de 8-OH-DPAT na fase de estro.

De acordo com esta sugestão, tem sido relatado que ratas em fase de estro, mostram concentrações extracelulares, relativamente constantes, de 5-HT no hipotálamo médio-basal entre as transições das fases de claro e escuro no ciclo claro-escuro (Maswood et al., 1995). Além disso, a densidade de transportadores de 5-HT (SERT) no ARC não muda em ratas ooforectomizadas com ou sem reposição de estrógenos (McQueen et al., 1999; Summer et al., 1999). Igualmente em ratas ooforectomizadas, o tratamento com uma combinação de estradiol e progesterona não parece influenciar a síntese de 5-HT na eminência mediana ou na região médio-basal do hipotálamo, verificada através da mensuração de 5-hidroxitriptofano acumulado (King et al., 1986).

Nossos dados sugerem que os hormônios esteróides ovarianos poderiam aumentar a eficácia das influências sobre a saciedade mediadas por ativação de receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A} localizados no ARC, uma vez que a redução na duração do consumo alimentar foi observada somente durante o estágio de estro. De acordo com esta hipótese, foi demonstrado que o estradiol diminui a quantidade e o tempo de consumo de alimento por aumentar o efeito desencadeado pelos compostos anorexígenos (CCK e/ou 5-HT), que sinalizam o término da refeição e diminui o efeito dos compostos orexígenos (MCH e a grelina) que sustentam uma refeição (Geary et al., 1994; Eckel, 2004; Messina et al., 2006; Clegg, 2007). Os dados deste estudo não permitem avaliar se a resposta hipofágica mediada pela ativação de receptores 5-HT_{1A} localizados no ARC é um resultado da mudança na sensibilidade destes receptores induzida pelo

estrógeno ou, poderia ser atribuída aos efeitos do estrógeno, aumentando a eficácia dos sinais neurais que induzem saciedade.

Similar ao observado no ARC, somente o tratamento com a maior dose de 8-OH-DPAT administrada na AHL diminuiu a duração do consumo de alimento e, apenas durante a fase de estro, sugerindo que esteróides ovarianos na AHL, bem como no ARC, poderiam aumentar a eficácia dos sinais de saciedade que desencadeiam o término da refeição mediado pela ativação de receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A}. De acordo com esta sugestão, tem sido relatado que o efeito orexígeno do MCH é mediado por um aumento seletivo do tamanho da refeição, que foi atenuado em ratas ooforectomizadas tratadas com estrógeno e durante a fase de estro, relativo ao diestro, em ratas com ciclo estral normal (Santollo e Eckel, 2008).

Embora vários estudos demonstrem uma redução na ingestão de alimentos durante a fase de estro relativo ao diestro em ratas com ciclo estral normal (Eckel e Geary, 1999; Eckel et al., 2000; Geary, 2001; Eckel e Moore, 2004; Eckel et al., 2005; Asarian e Geary, 2006), este efeito não foi observado neste estudo. A ingestão de alimento exibida por ratas tratadas com veículo durante a fase de estro foi similar àquela verificada no mesmo grupo em fase de diestro. Esta discrepância pode ser explicada pelo treinamento dos animais para comer dieta enriquecida com sacarose no meio da fase clara do ciclo claro-escuro. Tem sido demonstrado que animais testados durante o meio da fase clara exibem consumo de alimento similar em estro e diestro (Parker et al., 2002). A típica redução na ingestão de alimento durante a fase de estro foi observada em experimentos realizados durante o início da fase escura do ciclo claro-escuro (Eckel e Geary, 1999; Eckel et al., 2000; 2005; Asarian e Geary, 2006) quando a maioria do alimento diário é ingerida (Laviano et al., 1996). A intensa ingestão de alimento observada na fase clara no presente trabalho poderia ser devido à elevada

palatabilidade da dieta para os animais. Neste trabalho a fase de estro se refere à fase do ciclo ovariano definida pelo esfregaço vaginal. A fase do ciclo foi definida na manhã seguinte após a ovulação noturna, e os experimentos foram realizados no mesmo dia, o que correspondeu de 13 a 15h após a ovulação. Este período pode não ser completamente representativo de mudanças comportamentais presentes em momentos iniciais dos comportamentos de fase de estro (Becker et al., 2005).

Vários estudos demonstraram que o ARC expressa receptores estrogênicos do tipo α (RE α) e β (RE β) e a AHL expressa RE α (Asarian e Geary, 2006; Woods et al., 2007; Roepke, 2009). No estudo realizado por Sar e colaboradores (1990) foi demonstrado existir uma co-localização de subpopulações de neurônios do ARC que expressam receptores para NPY e estrógeno e que influências do estrógeno sobre MCH poderiam ser sinalizadas indiretamente, via neurônios adjacentes contendo RE α , uma vez que neurônios que expressam MCH não apresentam esses tipos de receptores (Muschamp e Hull, 2007).

Interessante observar que a deficiência da isoforma RE α , que está concentrado principalmente no ARC, induz a obesidade em camundongos, visto que os camundongos deficientes em RE β (que não é expresso na AHL) apresentam peso corpóreo normal (Couse e Korach, 1999), isto sugere um papel específico para o RE α em mediar os efeitos do estrogênio no balanço energético. Se estes receptores de estrógenos também modulam a resposta da ingestão de alimento mediada por ativação de receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A} localizados no ARC ou na AHL é um tópico que merece elucidção.

De acordo com o experimento prévio, a injeção de 8-OH-DPAT na AHL de ratos previamente tratados com o veículo confirmou a hipofagia induzida pelo 8-OH-DAT, tanto em estro como em diestro. Além disso, o presente resultado indica que o

pré-tratamento com WAY 100635 na AHL bloqueia a redução na ingestão de alimento induzida pela administração de 8-OH-DPAT em ambas as fases do ciclo estral. Como o WAY 100635 é considerado um potente e seletivo antagonista de receptores 5-HT_{1A}, os presentes dados reforçam a nossa sugestão de que receptores 5-HT_{1A} localizados na AHL participam de circuitos serotoninérgicos envolvidos no controle da ingestão alimentar. Além disso, a ativação de receptores 5-HT_{1B} ou 5-HT_{2C} na AHL não afeta a ingestão alimentar (Hikiji et al., 2004), sugerindo que o efeito hipofágico da 5-HT na AHL possa ser mediado por outros subtipos de receptores 5-HT como o 5-HT_{1A}.

Os grupos neuronais da AHL que estão envolvidos na regulação da ingestão de alimento e do balanço energético são aqueles que expressam MCH e a orexina (Broberger et al., 1998; Elias et al., 1998; Broberger, 2005; Stanley et al., 2005) e estudos de imunorreatividade na AHL demonstraram a presença de receptores 5-HT_{1A} e de transportador de 5-HT (SERT) em corpos celulares de neurônios que expressam peptídeos orexígenos (MCH e orexina A) (Collin et al., 2002). Sendo assim, a resposta hipofágica induzida pela administração de 8-OH-DPAT na AHL poderia ser então, mediada pela diminuição da liberação de MCH e/ou orexina A. No entanto, outros estudos utilizando agonista e/ou antagonista seletivo de receptor 5-HT₇ são necessários para excluir totalmente a participação desse subtipo de receptor 5-HT no controle da ingestão alimentar.

É importante ressaltar que a administração isolada de WAY 100635 na AHL determinou um efeito hipofágico significativo apenas na fase de diestro. Para nosso conhecimento, nenhum outro estudo na literatura mostrou que WAY 100635 quando utilizado em estudos comportamentais de dor, ansiedade ou de ingestão de alimento tivesse algum efeito. Ao contrário, estudos em roedores e suínos mostraram que a administração de WAY 100635 não desencadeia alterações no consumo alimentar

(Fletcher et al., 1996, Swiergiel e Dunn, 2000; Ebenezer et al., 2001). As razões para esta discrepância não foram ainda estabelecidas. É possível que fatores como a dose de WAY 100635 utilizada no presente estudo, a inativação de outros subtipos de receptores 5-HT, assim como a inativação de circuitos neuronais canabinóides na AHL, poderiam justificar a resposta hipofágica induzida pela injeção de WAY 100635 na AHL no presente estudo.

Na última década, tem sido relatado que o sistema canabinóide participa na regulação da ingestão alimentar (Bellocchio et al., 2008). A administração central ou sistêmica de canabinóides, endógenos ou exógenos, provoca a ativação de receptores canabinóides tipo 1 (CB-1) que desencadeia uma resposta hiperfágica em ratos saciados (Hao et al., 2004). Por outro lado, o bloqueio farmacológico dos receptores CB-1 reduz o consumo de alimento mais palatável em animais saciados (Simiand et al., 1998) e reduz a ingestão de alimento em animais submetidos à restrição alimentar previamente ao experimento (Colombo et al., 1998).

Além da sinalização canabinóide via receptores CB-1, os canabinóides (endógenos, sintéticos, e fito-canabinóides) também podem agir como agonistas de receptores $5HT_{1A}$ *in vivo* ou *in vitro* (Mishima et al., 2005; Russo et al., 2005). Estudos imunohistoquímicos demonstraram a expressão de receptores CB-1 no hipotálamo, particularmente na AHL de ratos (Moldrich e Wenger, 2000).

Recentemente, outros trabalhos imunohistoquímicos mostraram que muitos neurônios da AHL expressam RNAm para receptores CB-1, o que não foi demonstrado no ARC (Jelsing et al., 2008). Também tem sido relatado que neurônios que expressam MCH/orexina sintetizam RNAm para receptores CB-1, nos quais já foi demonstrada a presença de receptores $5-HT_{1A}$ na AHL (Collin et al., 2002). Como o sistema canabinóide interage com receptores $5-HT_{1A}$, então podemos admitir que o bloqueio dos

receptores 5-HT_{1A} por WAY 100635 impede a influência endocanabinóide excitatória sobre a ingestão alimentar e, conseqüentemente, desencadeia uma resposta hipofágica.

Embora a dose de WAY 100635 utilizada nesse estudo tenha sido escolhida com base em estudos de comportamento alimentar, onde essa droga foi administrada diretamente no parênquima (PVN) (Mancilla-Diaz et al., 2005), a dose injetada foi maior que àquela utilizada em experimentos de dor e de ansiedade. Em altas doses, essa droga pode atuar como agonista dos receptores dopaminérgicos (Marona-Lewicka e Nichols, 2009) ou antagonista de receptores adrenérgicos do tipo alfa 1A, 1B e 1D (Testa et al., 1999). Assim, o efeito hipofágico desencadeado pela administração de WAY 100635 poderia ser atribuído ao bloqueio de receptores catecolaminérgicos. No entanto, o pré-tratamento com WAY 100635 completamente reverteu o efeito hipofágico provocado pela injeção de 8-OH-DPAT nos animais, fornecendo fortes evidências que os efeitos provocados pela administração de 8-OH-DPAT na ingestão alimentar sejam mediados por receptores 5-HT_{1A}.

Nossos resultados sugerem que a regulação do consumo alimentar mediada por receptores 5-HT_{1A} da AHL parece ser afetada por flutuações de hormônios ovarianos, uma vez que o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} pelo WAY 100635 induziu uma resposta hipofágica apenas em fase de diestro. Os dados obtidos no experimento I nos permitem sugerir que os efeitos da ativação de receptores 5-HT_{1A} da AHL possam ser atribuídos a influências dos hormônios ovarianos, uma vez que ocorreu uma redução na duração da ingestão alimentar apenas durante o estro, embora no experimento II, essa alteração não tenha sido reproduzida (Steffens et al., 2008).

Além disso, os resultados aqui apresentados mostraram que a injeção de 8-OH-DPAT na AHL de ratas pré-tratadas com WAY 100635 desencadeou um aumento na

duração do comportamento locomotor durante a fase de diestro. Este aumento da atividade motora poderia afetar o comportamento alimentar, porém o consumo de alimento nos animais pré-tratados com WAY 100635 que receberam injeção de 8-OH-DPAT foi similar ao grupo controle, indicando que a diminuição do efeito hipofágico induzido por 8-OH-DAPT poderia ser atribuído ao bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} promovido pelo WAY 100635 e reforça a sugestão de que receptores 5-HT_{1A} localizados na AHL participam nos circuitos serotoninérgicos envolvidos com a regulação da ingestão de alimento.

Confirmando nossos dados anteriores, o tratamento com 8-OH-DPAT no ARC desencadeou uma redução na ingestão de alimento e reduziu a duração no consumo de alimento, apenas na fase de estro. O bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} com WAY 100635 suprimiu os efeitos ingestivos provocados pela administração de 8-OH-DPAT. Estes resultados indicam que as alterações na ingestão alimentar são especificamente mediadas por receptores 5-HT_{1A} localizados no ARC e validam nossa sugestão anterior de que receptores 5-HT_{1A} do ARC, envolvidos no controle da ingestão de alimento, são influenciados por alterações nos níveis de hormônios ovarianos que ocorrem durante o ciclo estral das ratas (Steffens et al, 2008).

Como já sugerido anteriormente, os resultados aqui mostrados sugerem que os hormônios esteróides ovarianos podem aumentar a sensibilidade dos receptores 5-HT_{1A} do ARC, uma vez que a redução na duração da ingestão de alimento apenas foi observada na fase de estro. Neste estudo, os registros comportamentais não ingestivos permaneceram inalterados após os diversos tratamentos efetuados. Assim, o efeito hipofágico desencadeado pela administração de 8-OH-DPAT no ARC não pode ser atribuído a mudanças na atividade motora ou aos demais comportamentos analisados.

Além dos receptores 5-HT_{1A} localizados no ARC e na AHL, os receptores 5-HT_{1A} do PVN também parecem mediar o efeito hipofágico mediado por circuitos 5-HT, uma vez que o pré-tratamento com WAY 100635 bloqueou a resposta hipofágica induzida pela injeção de 8-OH-DAPT no PVN de ratos alimentados *ad libitum* (Mancilla-Diaz et al., 2005). O papel dos receptores 5-HT_{1A} do PVN na regulação serotoninérgica sobre o comportamento alimentar está diretamente relacionado ao processo de saciedade, uma vez que a administração de WAY 100635, seletivamente, suprimiu a diminuição do consumo de alimento e antecipou o término da alimentação desencadeado pela administração de 8-OH-DPAT, em vez de provocar alterações em outras atividades comportamentais (Mancilla-Diaz et al., 2005).

Os dados apresentados revelaram que neurônios localizados no ARC e na AHL não apresentam influência inibitória tônica serotoninérgica sobre a ingestão alimentar. Adicionalmente, este estudo mostrou que receptores 5-HT_{1A} do ARC e da AHL são componentes dos circuitos serotoninérgicos, que regulam a ingestão alimentar e que ambos os circuitos 5-HT foram afetados por níveis de hormônios ovarianos, possivelmente por flutuação da concentração sérica de estrogênio, a qual poderia diretamente aumentar a sensibilidade dos neurônios do ARC ao efeito hipofágico desencadeado pela administração de 8-OH-DPAT ou que poderia aumentar a eficácia de influências sobre a saciedade no ARC e AHL provocadas pela ativação de receptores 5-HT_{1A}.

Quando os animais foram pré-tratados com WAY 100635 e receberam injeção de 8-OH-DPAT, os resultados confirmaram nossa sugestão prévia que receptores 5-HT_{1A} localizados no ARC e na AHL estão envolvidos na regulação serotoninérgica da ingestão de alimento. Novamente foi demonstrada que a sensibilidade dos receptores 5-HT_{1A} do ARC foi afetada pelos hormônios esteróides ovarianos que influenciaram no

aparecimento de sinais de saciedade após a administração de 8-OH-DPAT. Os circuitos serotoninérgicos localizados na AHL também podem ser afetados pelos hormônios ovarianos, uma vez que o tratamento isolado com WAY 100635 desencadeou uma resposta hipofágica apenas durante a fase de diestro. Esse efeito hipofágico do WAY 100635 poderia ser atribuído ao bloqueio de influências excitatórias endocanabinóides sobre o consumo alimentar, uma vez que existem evidências que os endocanabinóides podem atuar como agonistas de receptores 5HT_{1A}.

6. CONCLUSÕES

6.1. No ARC, a injeção de metergolina, em todas as doses, não alterou o consumo de alimento em ambos os estágios do ciclo estral. Porém, ambas as doses de metergolina desencadearam uma resposta hipofágica quando administradas na AHL de ratas nas fases de estro e diestro.

6.2. A injeção de ambas as doses de 8-OH-DPAT na AHL e em ambas as fases do ciclo estral nas ratas causou uma redução significativa na ingestão de alimento. No entanto, no ARC este mesmo tratamento desencadeou uma significativa resposta hipofágica somente quando utilizada a maior dose de 8-OH-DPAT e apenas durante a fase de estro. A administração da maior dose de 8-OH-DPAT na AHL desencadeou uma resposta hipofágica durante a fase de estro, semelhante àquela obtida no experimento do ARC.

6.3. A injeção de 8-OH-DPAT na AHL de animais pré-tratados com WAY 100635 reduziu a ingestão de alimento em ambas as fases do ciclo estral. O pré-tratamento com WAY 100635 bloqueou o efeito hipofágico desencadeado pela administração de 8-OH-DPAT durante ambas as fases do ciclo estral. A injeção de WAY 100635 desencadeou uma redução no consumo de alimento em ratas durante a fase de diestro. O tratamento com 8-OH-DPAT no ARC provocou uma redução no consumo de alimento somente na fase de estro. A resposta hipofágica foi bloqueada pela injeção prévia de WAY 100635 no ARC.

6.4. O consumo alimentar exibido por ratas tratadas com veículo durante a fase de estro foi similar àquele verificado no mesmo grupo em fase de diestro.

6.5. O comportamento dipsogênico não foi afetado pela administração de metergolina, 8-OH-DPAT ou de WAY 100635 no ARC e na AHL em ambas as fases do ciclo estral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem*. 2004;279:12005-8.
- Arkle M, Ebenezer IS. Ipsapirone suppresses food intake in food-deprived rats by an action at 5-HT(1A) receptors. *Eur J Pharmacol*. 2000;408(3):273-6.
- Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav*. 2002;42:461-71.
- Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361:1251-63.
- Bai FL, Yamano M, Shiotani Y, Emson PC, Smith AD, Powell JF, et al. An arcuate-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res*. 1985;331:172-5.
- Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol*. 2004;490(1-3):5-12.
- Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*. 1996;17(2):305-11.
- Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 1999;38(8):1083-152.
- Baxter G, Kennett G, Blaney F, Blackburn T. 5-HT₂ receptor subtypes: a family reunited? *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16(3):105-10.
- Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, et al. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology*. 2005;146:1650-73.
- Bellocchio L, Cervino C, Pasquali R, Pagotto U. The endocannabinoids system and energy metabolism. *J Neuroendocrinol*. 2008;20:850-7.
- Bernardis LL, Bellinger LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res*. 1987;434:321-81.
- Bernardis LL, Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996;20:189-287.
- Berthoud HR. Interactions between the "cognitive" and "metabolic" brain in the control of food intake. *Physiol Behav*. 2007;91(5):486-98.
- Bethea CL, Pecins-Thompson M, Schutzer WE, Gundlach C, Lu ZN. Ovarian steroids and serotonin neural function. *Mol Neurobiol*. 1998;18(2):87-123.
- Bickerdike MJ, Vickers SP, Dourish CT. 5-HT_{2C} receptor modulation and the treatment of obesity. *Diabetes Obes Metab*. 1999;1(4):207-14.
- Biegon A, Fischette CT, Rainbow TC, McEwen, BS. Serotonin receptor modulation by estrogen in discrete brain nuclei. *Neuroendocrinology*. 1982;35(4):287-91.
- Blundell JE. Serotonin manipulations and the structure of feeding behaviour. *Appetite*. 1986;7 Suppl:39-56.

- Blundell JE, Leshem MB. The effect of 5-hydroxytryptophan on food intake and on the anorexic action of amphetamine and fenfluramine. *J Pharm Pharmacol.* 1975;27(1):31-7.
- Bohmker K, Bordi F, Meller, E. The effects of pertussis toxin on dopamine D2 and serotonin 5-HT_{1A} autoreceptor-mediated inhibition of neurotransmitter synthesis: relationship to receptor reserve. *Neuropharmacology.* 1992;31:451-9.
- Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, Marzabadi MR, DeLeon J, Lagu B, et al. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med.* 2002;8:825-30.
- Borowsky B, Hoffman BJN. Neurotransmitter transporters: Molecular biology, function and regulation. *Int Rev Neurobiol.* 1995;38:139-99.
- Bovetto S, Richard D. Functional assessment of the 5-HT_{1A}, 1B, 2A/2C, and 5-HT₃ receptor subtypes on food intake and metabolic rate in rats. *Am J Physiol.* 1995;268:14-20.
- Broadwell RD, Brightman MW. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J Comp Neurol.* 1976;166(3):257-83.
- Broberger C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med.* 2005;258(4):301-27.
- Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol.* 1998;402(4):460-74.
- Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, et al. Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes.* 1999;48:2132-37.
- Campbell RE, Smith MS, Allen SE, Grayson BE, French-Mullen JM, Grove KL. Orexin neurons express a functional pancreatic polypeptide Y4 receptor. *J Neurosci.* 2003;23:1487-97.
- Carr TP, Jesch ED, Brown AW. Endocannabinoids, metabolic regulation, and the role of diet. *Nutr Res.* 2008;28(10):641-50.
- Celada P, Puig M, Amargós-Bosch M, Adell A, Artigas F. The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci.* 2004;29(4):252-65.
- Chaptini L, Peikin S. Neuroendocrine regulation of food intake. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008;24(2):223-9.
- Chai JK, Blaha V, Meguid MM, Laviano A, Yang Z, Varma M. Use of orchietomy and testosterone replacement to explore meal number-to-meal size relationship in male rats. *Am J Physiol.* 1999;276:1366-73.
- Chen P, Li C, Haskell-Luevano C, Cone RD, Smith MS. Altered expression of agouti-related protein and its colocalization with neuropeptide Y in the arcuate nucleus of the hypothalamus during lactation. *Endocrinology.* 1999;140:2645-50.
- Chen P, Williams SM, Grove KL, Smith MS. Melanocortin 4 receptor-mediated hyperphagia and activation of neuropeptide Y expression in the dorsomedial hypothalamus during lactation. *J Neurosci.* 2004;24:5091-100.

- Clegg DJ, Brown LM, Zigman JM, Kemp CJ, Strader AD, Benoit SC, et al. Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes*. 2007;56:1051-8.
- Collin M, Bäckberg M, Önnestam K, Meister B. 5-HT_{1A} receptor immunoreactivity in hypothalamic neurons involved in body weight control. *Neuroreport*. 2002;13:945-51.
- Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa GL. Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci*. 1998, 63(8):113-7.
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Nature*, 2001;25(5):63-7.
- Coscina DV, Feifel D, Nobrega JN, Currie PJ. Intraventricular but not intraparaventricular nucleus metergoline elicits feeding in satiated rats. *Am J Physiol*. 1994;266:1562-7.
- Coscina DV, Currie PJ, Bishop C, Parker GC, Rollins BL, King BM. Posterodorsal amygdala lesions reduce feeding stimulated by 8-OH-DPAT. *Brain Res*. 2000;883(2):243-9.
- Couse JF, Korach KS. Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol*. 1999;60(2):143-8.
- Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF, Cone RD. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron*. 1999;24:155-63.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001;411:480-4.
- Currie PJ, Coscina DV. Diurnal variations in the feeding response to 8-OH-DPAT injected into the dorsal or median raphe. *Neuroreport*. 1993;4(9):1105-7.
- Currie PJ, Coscina DV. Metergoline potentiates natural feeding and antagonizes the anorectic action of medial hypothalamic 5-hydroxytryptamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996;53:1023-28.
- Da Cunha IC, De Nazareth AM, Vargas JC, Ferraz A, Neto JM, Paschoalini MA, et al. The microinjection of AMPA receptor antagonist into the accumbens shell failed to change food intake, but reduced fear-motivated behaviour in free-feeding female rats. *Behav Brain Res*. 2008;193(2):243-7.
- Dalton GL, Lee MD, Kennett GA, Dourish CT, Clifton PG. mCPP-induced hyperactivity in 5-HT_{2C} receptor mutant mice is mediated by activation of multiple 5-HT receptor subtypes. *Neuropharmacology*. 2004;46(5):663-71.
- Da Silva AA, Campanella LC, Ramos MC, Faria MS, Paschoalini MA, Marino-Neto J. Ingestive effects of NMDA and AMPA-kainate receptor antagonists microinjections into the lateral hypothalamus of the pigeon (*Columba livia*). *Brain Res*. 2006;1115(1):75-82.
- Da Silva RA, Da Silva AS, Poffo MJ, Ribas DC, Faria MS, Marino-Neto J, et al. Feeding behavior after metergoline or GR-46611 injections into the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pigeon. *Behav Brain Res*. 2007;179(2):248-57.

Da Silva RA, De Oliveira ST, Hackl LP, Spilere CI, Faria MS, Marino-Neto J, et al. Ingestive behaviors and metabolic fuels after central injections of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1D/1B} receptors agonists in the pigeon. *Brain Res.* 2004;1026(2):275-83.

Da Silva AA, Marino-Neto J, Paschoalini MA. Feeding induced by microinjections of NMDA and AMPA-kainate receptor antagonists into ventral striatal and ventral pallidal areas of the pigeon. *Brain Res.* 2003;966(1):76-83.

Debons AF, Krimsky I, Maayan ML, Fani K, Jemenez FA. Gold thioglucose obesity syndrome. *Federation Proc.* 1977;36:143-47.

De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:322-7.

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.* 2000;24(3):341-53.

Dos Santos RL, Mansur SS, Steffens SM, Faria MS, Marino-Neto J, Paschoalini MA. Food intake increased after injection of adrenaline into the median raphe nucleus of free-feeding rats. *Behav Brain Res.* 2009;197(2):411-6.

Dourish CT, Clark ML, Fletcher A, Iversen SD. Evidence that blockade of post-synaptic 5-HT₁ receptors elicits feeding in satiated rats. *Psychopharmacology.* 1989;97(1):54-8.

Dourish CT, Cooper SJ, Gilbert F, Coughlan J, Iversen SD. The 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT increases consumption of palatable wet mash and liquid diets in the rat. *Psychopharmacology.* 1988;94(1):58-63.

Dourish CT, Hutson PH, Curzon G. Characteristics of feeding induced by the serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin. *Brain Res Bull.* 1985;15(4):377-84.

Erlanson-Albertsson C. Appetite regulation and energy balance. *Acta Paediatr Suppl.* 2005;94(448):40-1.

Ebenezer IS. Effects of the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT on food intake in food-deprived rats. *Neuroreport.* 1992;3(11):1019-22.

Ebenezer IS, Arkle MJ, Tite RM. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin inhibits food intake in fasted rats by an action at 5-HT_{1A} receptors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2007;29(4):269-72.

Ebenezer IS, Parrott RF, Vellucci SV. Effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on operant food intake in food-deprived pigs. *Physiol Behav.* 1999;67(2):213-7.

Ebenezer IS, Surujbally A. The effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin on food intake in non-deprived C57BL6 mice. *Eur J Pharmacol.* 2007;559(2-3):184-8.

Ebenezer IS, Tite RM. Differential effects of the 5-HT_{1A} agonist gepirone on food intake in rats may depend on their motivation to eat. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2003;25:727-31.

Ebenezer IS, Vellucci SV, Parrott RF. 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.* 2001;73(1-2):223-7.

- Eckel LA, Geary N. Endogenous cholecystokinin's satiating action increases during estrus in female rats. *Peptides*. 1999;20(4):451-6.
- Eckel LA, Houtt TA, Geary N. Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. *Physiol Behav*. 2000;70:397-405.
- Eckel LA, Moore SR. Diet-induced hyperphagia in the rat is influenced by sex and exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(5):R1080-5.
- Eckel LA, Rivera HM, Atchley, DP. The anorectic effect of fenfluramine is influenced by sex and stage of the estrous cycle in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288:1486-91.
- Edwards S, Stevens RG. Effects of xylamidine on peripheral 5-hydroxytryptamine-induced anorexia. *Pharmacol Biochem Behav*. 1989;34(4):717-20.
- Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, et al. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*. 1998(a);21(6):1375-85.
- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, et al. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*. 1998(b);402:442-59.
- Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, Flier JS. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci*. 1998;1:445-50.
- Erlanson-Albertsson C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Pharmacol Toxicol*. 2005;97:61-73.
- Fekete C, Legradi G, Mihaly E, Huang QH, Tatro JB, Rand WM, et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci*. 2000;20:1550-8.
- Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, et al. Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis: comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology*. 2002;143:3846-53.
- Fetissov SO, Hallman J, Oreland L, Af Klinteberg B, Grenbäck E, Hulting AL, et al. Autoantibodies against alpha -MSH, ACTH, and LHRH in anorexia and bulimia nervosa patients. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(26):17155-60.
- Fiorella D, Helsley S, Rabin RA, Winter JC. 5-HT_{2C} receptor-mediated phosphoinositide turnover and the stimulus effects of m-chlorophenylpiperazine. *Psychopharmacology*. 1995;122(3):237-43.
- Fletcher PJ. Increased food intake in satiated rats induced by the 5-HT antagonists methysergide, metergoline and ritanserin. *Psychopharmacology*. 1988;96:237-42.
- Fletcher PJ, Burton MJ. Effects of manipulations of peripheral serotonin on feeding and drinking in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1984;20(6):835-40.
- Fletcher PJ, Coscina DV. Injecting 5-HT into the PVN does not prevent feeding induced by injecting 8-OH-DPAT into the raphe. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993;46:487-91.

- Fletcher PJ, Davies M. Dorsal raphe microinjection of 5-HT and indirect 5-HT agonists induces feeding in rats. *Eur J Pharmacol.* 1990;184:265-71.
- Fletcher A, Forster EA, Bill DJ, Brown G, Cliffe IA, Hartley JE, et al. Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Behav Brain Res.* 1996;73(1-2):337-53.
- Flügge G, Pfender D, Rudolph S, Jarry H, Fuchs E. 5HT_{1A} receptor binding in the brain of cyclic and ovariectomized female rats. *J Neuroendocrinol.* 1999;11:243-9.
- Fodor M, Delemarre-van de Waal HA. Are POMC neurons targets for sex steroids in the arcuate nucleus of the rat? *Neuroreport.* 2001;12(18):3989-91.
- Foltin RW, Moran TH. Food intake in baboons: effects of a long-acting cholecystokinin analog. *Appetite.* 1989;12(2):145-52.
- Forster EA, Cliffe IA, Bill DJ, Dover GM, Jones D, Reilly Y, et al. A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635. *Eur J Pharmacol.* 1995;281(1):81-88.
- Frankfurt M, McKittrick CR, Mendelson SD, McEwen BS. Effect of 5,7-dihydroxytryptamine, ovariectomy and gonadal steroids on serotonin receptor binding in rat brain. *Neuroendocrinology.* 1994;59:245-50.
- Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Galuska, DA, Dietz, WH. Trends and correlates of class 3 obesity in the United States from 1990 through 2000. *J Am Med Assoc.* 2002;288:1758-61.
- Freeman ME. In: Knobil, E; Neil, JD, editors. *The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. The physiology of reproduction.* San Diego (CA): Academic Press & Elsevier; 2006. Third edition. p.2327-88.
- Fuemmeler BF, Agurs-Collins TD, McClernon FJ, Kollins SH, Kail ME, Bergen AW, et al. Genes implicated in serotonergic and dopaminergic functioning predict BMI categories. *Obesity.* 2008;16(2):348-55.
- Fuller RW. The involvement of serotonin in regulation of pituitary-adrenocortical function in rats. *Front Neuroendocrinol.* 1992;13(3):250-70.
- Geary N. Estradiol, CCK and satiation. *Peptides.* 2001(a);22(8):1251-63.
- Geary N. Sex differences in disease anorexia. *Nutrition.* 2001(b);17(6):499-507.
- Geary N, Trace D, McEwen B, Smith GP. Cyclic estradiol replacement increases the satiety effect of CCK-8 in ovariectomized rats. *Physiol Behav.* 1994;56:281-9.
- Geary N, Asarian L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiol Behav.* 1999;67:141-7.
- Geyer MA, Puerto A, Menkes DB, Segal DS, Mandell AJ. Behavioral studies following lesions of the mesolimbic and mesostriatal serotonergic pathways. *Brain Res.* 1976;106(2):257-69.
- Gilbert F, Dourish CT. Effects of the novel anxiolytics gepirone, buspirone and ipsapirone on free feeding and on feeding induced by 8-OH-DPAT. *Psychopharmacology.* 1987;93(3):349-52.
- Giraud SQ, Billington CJ, Levine AS. Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. *Brain Res.* 1998;809:302-6.

- Grahame-Smith DG. The biosynthesis of 5-hydroxytryptamine in brain. *Biochem J.* 1967;105:351-60.
- Grignaschi G, Sironi F, Samanin R. The 5-HT_{1B} receptor mediates the effect of d-fenfluramine on eating caused by intra-hypothalamic injection of neuropeptide Y. *Eur J Pharmacol.* 1995;274(1-3):221-4.
- Grignaschi G, Fanelli E, Scagnol I, Samanin R. Studies on the role of serotonin receptor subtypes in the effect of sibutramine in various feeding paradigms in rats. *Br J Pharmacol.* 1999;127(5):1190-4.
- Grinker JA, Drewnowski A, Enns M, Kissileff H. Effects of d-amphetamine and fenfluramine on feeding patterns and activity of obese and lean Zucker rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980;12(2):265-75.
- Guan XM, Yu H, Van der Ploeg LH. Evidence of altered hypothalamic pro-opiomelanocortin/neuropeptide Y mRNA expression in tubby mice. *Brain Res.* 1998;59:273-9.
- Gundlach C, Simon LD, Auerbach SB. Differences in hypothalamic serotonin between estrous phases and gender: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 1998;785:911-6.
- Gundlach C, Pecins-Thompson M, Schutzer WE, Bethea CL. Ovarian steroid effects on serotonin 1A, 2A and 2C receptor mRNA in macaque hypothalamus. *Mol Brain Res.* 1999;63:325-39.
- Gurling J, Sriwam C, Routledge CR, Dourish CT. Increased 5-HT release induced by a 5-HT_{1A} antagonist is determined by arousal state. *J. Psychopharmacol.* 1994;8:Suppl. A13.
- Häckl LP, de Oliveira Richter G, Faria MS, Paschoalini MA, Marino-Neto J. Behavioral effects of 8-OH-DPAT injections into pontine and mesencephalic areas containing 5-HT-immunoreactive perikarya in the pigeon. *Brain Res.* 2005;1035:154-67.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, et al. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:10911-16.
- Halford JC, Blundell JE. The 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence. *Physiol Behav.* 1996;60(3):933-9.
- Halford JC, Wanninayake SCD, Blundell JE. Behavioral Satiety Sequence (BSS) for the Diagnosis of Drug Action on Food Intake. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998;61(2):159-68.
- Hartfield AW, Moore NA, Clifton PG. Serotonergic and histaminergic mechanisms involved in intralipid drinking? *Pharmacol Biochem Behav.* 2003;76:251-8.
- Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, et al. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides.* 1999;20:1099-105.
- Heisler LK, Cowley MA, Tecott LH, Fan W, Low MJ, Smart JL, et al. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science.* 2002;297(5581):609-11.
- Heisler LK, Jobst EE, Sutton GM, Zhou L, Borok E, Thornton-Jones Z, et al. Serotonin Reciprocally Regulates Melanocortin Neurons to Modulate Food Intake. *Neuron.* 2006;51:239-49.

- Hewitt KN, Lee MD, Dourish CT, Clifton PG. 5-HT_{2C} receptor agonists and the behavioural satiety sequence in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;71:691-700.
- Hikiji K, Inoue K, Iwasaki S, Ichihara K, Kirriike N. Local perfusion of mCPP into ventromedial hypothalamic nucleus, but not into lateral hypothalamic area and frontal cortex, inhibits food intake in rats. *Psychopharmacology.* 2004;174:190-6.
- Hjorth S, Tao R. The putative 5-HT_{1B} receptor agonist CP-93,129 suppresses rat hippocampal 5-HT release in vivo: comparison with RU 24969. *Eur J Pharmacol.* 1991;209(3):249-52.
- Hopwood SE, Owesson CA, Callado LF, McLaughlin DP, Stamford JA. Effects of chronic tramadol on pre- and post-synaptic measures of monoamine function. *J Psychopharmacol.* 2001;15(3):147-53.
- Horvath TL, Diano S, van den Pol AN. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci.* 1999;19(3):1072-87.
- Hoyer D, Martin G. 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology.* 1997;36(4-5):419-28.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;71(4):533-54.
- Huang XF, Han M, South T, Storlien L. Altered levels of POMC, AgRP and MC4-R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity. *Brain Res.* 2003;992:9-19.
- Hutson PH, Dourish CT, 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.* 1986;129(3):347-52.
- Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev.* 1992;72(1):165-229.
- Jacobs BL, Fornal CA. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology.* 1999;21(2 Suppl):9S-15S.
- Jamshidi N, Taylor. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol.* 2001;134:1151-54.
- Jelsing J, Larsen PJ, Vrang N. Identification of cannabinoid type 1 receptor expressing cocaine amphetamine-regulated transcript neurons in the rat hypothalamus and brainstem using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Neuroscience.* 2008;154:641-52.
- Jobst EE, Enriori PJ, Cowley MA. The electrophysiology of feeding circuits. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15(10): 488-99.
- Jorgensen H, Knigge U, Kjaer A, Moller M, Warberg J. Serotonergic stimulation of corticotrophin-releasing hormone and pre-opiomelanocortin gene expression. *J Neuroendocrinol.* 2002;14(10):788-95.
- Jourdan D, Piec I, Gaulier JM, Lacassie E, Alliot J. Effect of fenfluramine on caloric intake and macronutrient selection in Lou/c rats during aging. *Neurobiol Aging.* 2003;24(1):67-76.

- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.* 1999;20:68-100.
- Kantak KM, Wayner MJ, Stein JM, Tilson HA. Effect of imipramine on serotonin turnover in the lateral hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav.* 1978;9(5):693-6.
- Kantak KM, Wayner MJ, Tilson HA, Sved A. Turnover of 5-hydroxytryptamine to 5-hydroxyindoleacetic acid and the 3H-5-methoxyindoles in nondeprived and 24 hr food deprived rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1977;6(2):221-5.
- Kastin AJ, Akerstrom V, Pan W. Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *J Mol Neurosci.* 2002;18(1-2):7-14.
- Kelly J, Rothstein J, Grossman SP. GABA and hypothalamic feeding systems. I. Topographic analysis of the effects of microinjections of muscimol. *Physiol Behav.* 1979;23:1123-34.
- Kennett GA, Curzon G. Evidence that hypophagia induced by mCPP and TFMPP requires 5-HT_{1C} and 5-HT_{1B} receptors; hypophagia induced by RU 24969 only requires 5-HT_{1B} receptors. *Psychopharmacology.* 1988;96(1):93-100.
- Kevin GM, Stephen RB. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature.* 2006;444:854-9.
- Kim MS, Rossi M, Abusnana S, Sunter D, Morgan DG, Small CJ, et al. Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes.* 2000;49:177-82.
- King TS, Steger RW, Morgan WW. Effect of ovarian steroids to stimulate region-specific hypothalamic 5-hydroxytryptamine synthesis in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology.* 1986;42:344-50.
- Kirchgessner AL, Liu M. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron.* 1999;24:941-51.
- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol.* 2002;136:550-57.
- Koe BK, Weissman A. Tryptophan hydroxylase inhibitors. *J Pharmacol.* 1971;154(3):499-516.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature.* 1998;393:72-6.
- Kyrkouli SE, Stanley BG, Seirafi RD, Leibowitz SF. Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptide's effects in the brain. *Peptides.* 1990;11:995-1001.
- Lakoski JM, Cunningham KA. The interaction of cocaine with central serotonergic neuronal systems: cellular electrophysiologic approaches. *NIDA Res Monog.* 1988;88:78-91.
- Lam DD, Heisler LK. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. *Expert Rev Mol Med.* 2007;9(5):1-24.
- Lau T, Schloss P. The cannabinoid CB1 receptor is expressed on serotonergic and dopaminergic neurons. *Eur J Pharmacol.* 2008;578(2-3):137-41.

- Laviano A, Meguid MM, Gleason JR, Yang ZJ, Renvyle T. Comparison of long-term feeding pattern between male and female Fischer 344 rats: influence of estrous cycle. *Am J Physiol.* 1996;270:413-9.
- Lee MD, Simansky KJ. CP-94, 253: a selective 5-HT_{1B} agonist that promotes satiety. *Psychopharmacology.* 1997;131(3):264-70.
- Legradi G, Lechan RM. Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 1999;140:3643-52.
- Leibowitz SF, Alexander JT. Hypothalamic Serotonin in Control of Eating Behavior, Meal Size, and Body Weight. *Biol Psychiatry.* 1988;44:851-64.
- Leibowitz SF, Weiss GF, Suh JS. Medial hypothalamic nuclei mediate serotonin's inhibitory effect on feeding behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990;37:735-42.
- Leibowitz SF, Alexander JT, Cheung WK, Weiss GF. Effects of serotonin and the serotonin blocker metergoline on meal patterns and macronutrient selection. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993;45:185-94.
- Le Saux M, Di Paolo T. Chronic estrogenic drug treatment increases preproenkephalin mRNA levels in the rat striatum and nucleus accumbens. *Psychoneuroendocrinology.* 2005;30:251-60.
- Lesch KP. Genetic alterations of the murine serotonergic gene pathway: the neurodevelopmental basis of anxiety. *Handb Exp Pharmacol.* 2005;169:71-112.
- Lin L, York DA. 5-HT_{1B} receptors modulate the feeding inhibitory effects of enterostatin. *Brain Res.* 2005;1062(1-2):26-31.
- Long, JA, Evans, HM. In: Leuschner AO, editor. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomenon. *Memoirs of the University of California.* Oxford' University of California Press. 1922;1-148.
- Lopes AP, da Cunha IC, Steffens SM, Ferraz A, Vargas JC, de Lima TC, et al. GABAA and GABAB agonist microinjections into medial accumbens shell increase feeding and induce anxiolysis in an animal model of anxiety. *Behav Brain Res.* 2007;184(2):142-9.
- López-Alonso VE, Mancilla-Díaz JM, Rito-Domingo M, González-Hernández B, Escartín-Pérez RE. The effects of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2C} receptor agonists on behavioral satiety sequence in rats. *Neurosci Lett.* 2007;416:285-8.
- Lu NZ, Bethea CL. Ovarian steroid regulation of 5-HT_{1A} receptor binding and G protein activation in female monkeys. *Neuropsychopharmacology.* 2002;27:12-24.
- Maidel S, Lucinda AM, de Aquino VW, Faria MS, Paschoalini MA. The adrenaline microinjection into the median raphe nucleus induced hypophagic effect in rats submitted to food restriction regimen. *Neurosci Lett.* 2007;422(2):123-7.
- Mancilla-Diaz JM, Escartin-Perez RE, Lopez-Alonso VE, Floran-Garduño B, Romano-Camacho J. Role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the hypophagic effect of 5-HT on the structure of feeding behavior. *Med Sci Monit.* 2005;11:74-9.
- Marona-Lewicka D, Nichols DE. WAY 100635 produces discriminative stimulus effects in rats mediated by dopamine D(4) receptor activation. *Behav Pharmacol.* 2009;20(1):114-8.

- Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, et al. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:3240-5.
- Maswood S, Stewart G, Uphouse L. Gender and estrous cycle effects of the 5-HT_{1A} agonist (8-OH-DPAT) on hypothalamic serotonin. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995;51:807-13.
- McAllister-William RH, Ferrier IN, Young AH. Mood and neuropsychological function in depression: the role of corticosteroids and serotonin. *Psychol Med*. 1998;28(3):573-84.
- McEwen BS. Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol*. 2001;91(6):2785-801.
- McGuirk J, Goodall E, Silverstone T, Willner P. Differential effects of d-fenfluramine, l-fenfluramine and d-amphetamine on the microstructure of human eating behaviour. *Behav Pharmacol*. 1991;2(2):113-19.
- McQueen JK, Wilson H, Sumner BE, Fink G. Serotonin transporter (SERT) mRNA and binding site densities in male rat brain affected by sex steroids. *Brain Res Mol*. 1999;63:241-7.
- Meister B. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*. 2007;92:263-71.
- Messina MM, Boersma G, Overton JM, Eckel LA. Estradiol decreases the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone in ovariectomized rats. *Physiol Behav*. 2006;88:523-8.
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*. 2004;428:569-74.
- Mishima K, Hayakawa K, Abe K, Ikeda T, Egashira N, Iwasaki K, et al. Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-dependent mechanism. *Stroke*. 2005;36(5):1077-82.
- Moldrich G, Wenger T. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides*. 2000;21(11):1735-42.
- Montgomery AM, Fletcher PJ, Burton MJ. Behavioural and pharmacological investigations of 5-HT hypophagia and hyperdipsia. *Pharmacol Biochem Behav*. 1986;25(1):23-8.
- Morens C, Nørregaard P, Receveur JM, van Dijk G, Scheurink AJ. Effects of MCH and a MCH1-receptor antagonist on (palatable) food and water intake. *Brain Res*. 2005;1062:32-8.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food and body weight. *Nature*. 2006;443:289-95.
- Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K. Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci Lett*. 1999;264:101-4.
- Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*. 2006;444(7121):854-9.

- Muschamp JW, Hull EM. Melanin concentrating hormone and estrogen receptor-alpha are coextensive but not coexpressed in cells of male rat hypothalamus. *Neurosci Lett*. 2007;427(3):123-6.
- Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM, Brownfield M. Localization of 5-HT₇ receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *J Chem Neuroanat*. 2001;21(1):63-73.
- Niswender KD, Schwartz, MW. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol*. 2003;24:1-10.
- Nonaka N, Shioda S, Niehoff ML, Banks WA. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306(3):948-53.
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*. 2006;295(13):1549-55.
- Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 1969;164:719-21.
- Otoni EB. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behaviour observation sessions. *Behav Res Meth Instrum Comput*. 2000;32:446-9.
- Parker GC, Balboul R, Hobday JA, Coscina DV. 5-HT receptor blockade in the posterior amygdala elicits feeding in female rats. *NeuroReport*. 2001;12:911-4.
- Parker GC, Coscina DV. Lesions of the posterior basolateral amygdala block feeding induced by systemic 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001;68:729-34.
- Parker GC, Bishop C, Coscina DV. Estrous cycle and food availability affect feeding induced by amygdala 5-HT receptor blockade. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71:701-7.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2007. 6nd ed., New York: Academic Press & Elsevier Inc.
- Pecins-Thompson M, Bethea CL. Ovarian steroid regulation of serotonin-1A autoreceptor messenger RNA expression in the dorsal raphe of rhesus macaques. *Neuroscience*. 1999;89:267-77.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*. 1998;18(23):9996-10015.
- Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 1996;380:243-47.
- Raap DK, DonCarlos LL, Garcia F, Zhang Y, Muma NA, Battaglia G, et al. Ovariectomy-induced increases in hypothalamic 5-HT_{1A} receptor function in rats are prevented by estradiol. *Neuroendocrinology*. 2002;76(6):348-56.
- Ribeiro-do-Valle LE, Lucena RL. Behavioral correlates of the activity of serotonergic and non-serotonergic neurons in caudal raphe nuclei. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(7):919-37.

- Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, et al. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol*. 2001;15:1748-57.
- Rivera HM, Eckel LA. The anorectic effect of fenfluramine is increased by estradiol treatment in ovariectomized rats. *Physiol Behav*. 2005;86:331-7.
- Roepke TA. Oestrogen modulates hypothalamic control of energy homeostasis through multiple mechanisms. *J Neuroendocrinol*. 2009;21(2):141-50.
- Rogers PJ, Blundell JE. Effect of anorexic drugs on food intake and the micro-structure of eating in human subjects. *Psychopharmacology*. 1979;66(2):159-65.
- Routledge C, Gurling J, Wright IK, Dourish CT. Neurochemical profile of the selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100135: an in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol*. 1993;239(1-3):195-202.
- Rowland NE, Carlton J. Effects of fenfluramine on food intake, body weight, gastric emptying and brain monoamines in Syrian hamsters. *Brain Res Bull*. 1986;17(4):575-81.
- Rueter LE, Fornal CA, Jacobs BL. A critical review of 5-HT brain microdialysis and behavior. *Rev Neurosci*. 1997;8(2):117-37.
- Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1A} receptors. *Neurochem Res*. 2005;30(8):1037-43.
- Sabi M, Raimondi C, Marques S, Paschoalini MA, Marino-Neto J. Adrenergic control of glycemia in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in pigeons. *Neuroreport*. 2002;13(6):871-5.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 1998;92:573-85.
- Salamanca S, Uphouse L. Estradiol modulation of the hyperphagia induced by the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav*. 1992;43:953-5.
- Saller CF, Stricker EM. Hyperphagia and increased growth in rats after intraventricular injection of 5,7-dihydroxytryptamine. *Science*. 1976;192(4237):385-7.
- Samanin R, Mennini T, Bendotti C, Barone D, Caccia S, Garattini S. Evidence that central 5-HT₂ receptors do not play an important role in the anorectic activity of D-fenfluramine in the rat. *Neuropharmacology*. 1989;28(5):465-9.
- Santollo J, Eckel LA. The orexigenic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) is influenced by sex and stage of the estrous cycle. *Physiol Behav*. 2008;93(4-5):842-50.
- Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 2005;437(7063):1257-63.
- Sar M, Sahu A, Crowley WR, Kalra SP. Localization of neuropeptide-Y immunoreactivity in estradiol-concentrating cells in the hypothalamus. *Endocrinology*. 1990;127(6):2752-6.
- Sarkar S, Lechan RM. Central administration of neuropeptide Y reduces alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced cyclic adenosine 5-monophosphate response element binding protein (CREB) phosphorylation in pro-thyrotropin-releasing hormone

- neurons and increases CREB phosphorylation in corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 2003;144:281-91.
- Sawchenko PE, Swanson LW. The organization and biochemical specificity of afferent projections to the paraventricular and supraoptic nuclei. *Prog Brain Res*. 1983;60:19-29.
- Schwartz DH, McClane S, Hernandez L, Hoebel BG. Feeding increases extracellular serotonin in the lateral hypothalamus of the rat as measured by microdialysis. *Brain Res*. 1989;479(2):349-54.
- Schwartz GJ, Salorio CF, Skoglund C, Moran, TH. Gut vagal afferent lesions increase meal size but do not block gastric preload-induced feeding suppression. *Am J Physiol*. 1999;276:1623-29.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661-71.
- Segal-Lieberman G, Bradley RL, Kokkotou E, Carlson M, Trombly DJ, Wang X, et al. Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100:10085-90.
- Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*. 1998;396:670-4.
- Simansky KJ. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res*. 1996;73(1-2):37-42.
- Simiand J, Keane M, Keane PE, Soubrié P. SR 141716, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset. *Behav Pharmacol*. 1998;9(2):179-81.
- Simpson KA, Martin NM, Bloom SR. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53(2):120-28.
- Small CJ, Bloom SR. Gut hormones as peripheral anti obesity targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2004;3(5):379-88.
- Stallone D, Nicolaidis S. Increased food intake and carbohydrate preference in the rat following treatment with the serotonin antagonist metergoline. *Neurosci Lett*. 1989;2:319-24.
- Stanley BG, Chin AS, Leibowitz SF. Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action. *Brain Res Bull*. 1985;14:521-4.
- Stanley BG, Magdalin W, Seirafi A, Thomas WJ, Leibowitz SF. The perifornical area: the major focus of patchily distributed hypothalamic neuropeptide Y-sensitive feeding system(s). *Brain Res*. 1993;104:304-17.
- Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev*. 2005;85(4):1131-58.
- Stearns V, Hayes DF. Approach to menopausal symptoms in women with breast cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2002;3(2):179-90.
- Steffens SM, Casas DC, Milanez BC, Freitas CG, Paschoalini MA, Marino-Neto J. Hypophagic and Dipsogenic Effects of Central 5-HT Injections in Pigeons. *Brain Res Bull*. 1997;44(6):681-88.

- Steffens SM, da Cunha IC, Beckman D, Lopes AP, Faria MS, Marino-Neto J, et al. The effects of metergoline and 8-OH-DPAT injections into arcuate nucleus and lateral hypothalamic area on feeding in female rats during the estrous cycle. *Physiol Behav.* 2008;95(3):484-91.
- Stellar E. The physiology of motivation. *Psychol Rev.* 1954;61:5-22.
- Sumner BE, Grant KE, Rosie R, Hegele-Hartung C, Fritzscheier KH, Fink G. Effects of tamoxifen on serotonin transporter and 5-HT_{2A} receptor binding sites and mRNA levels in the brain of ovariectomized rats with or without acute estradiol replacement. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;73:119-28.
- Swiergiel AH, Dunn AJ. Lack of evidence for a role of serotonin in interleukin-1-induced hypophagia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;65(3):531-7.
- Testa R, Guarneri L, Poggesi E, Angelico P, Velasco C, Ibba M, et al. Effect of Several 5-Hydroxytryptamine_{1A} Receptor Ligands on the Micturition Reflex in Rats: Comparison with WAY 100635. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;290(3):1258-69.
- ter Horst GJ, Luiten PG. The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. *Brain Res Bull.* 1986;16(2):231-48.
- Trillat AC, Malagié I, Mathé-Allainmat M, Anmela MC, Jacquot C, Langlois M, et al. Effects of WAY 100635 and (-)-5-Me-8-OH-DPAT, a novel 5-HT_{1A} receptor antagonist, on 8-OH-DPAT responses. *Eur J Pharmacol.* 1998;347(1):41-9.
- Uphouse L, Salsamanca S, Caldarola-Pastuszka M. Estrous cycle differences in the response to the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991;40:901-6.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008;18(2):158-68.
- Varga V, Kocsis B, Sharp T. Electrophysiological evidence for convergence of inputs from the medial prefrontal cortex and lateral habenula on single neurons in the dorsal raphe nucleus. *Eur J Neurosci.* 2003;17(2):280-6.
- Vickers SP, Clifton, PG, Dourish, CT. Behavioral evidence that d-fenfluramine-induced anorexia in the rat is not mediated by the 5-HT_{1A} receptor subtype. *Psychopharmacology.* 1996;125:168-75.
- Voigt JP, Kienzle F, Sohr R. Feeding and 8-OH-DPAT-related release of serotonin in the rat lateral hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;65:183-9.
- Wade G N. Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. *Physiol Behav.* 1972;8:523-34.
- Wallen WJ, Belanger MP, Wittnich C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. *J Nutr.* 2001;131:2351-57.
- Whitaker-Azmitia PM. The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience. *Neuropsychopharmacology.* 1999;21:2-8.
- Wittmann G, Deli L, Kalló I, Hrabovszky E, Watanabe M, Liposits Z, et al. Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol.* 2007;503(2):270-9.

Woods SC, Gotoh K, Clegg DJ. Gender differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med.* 2007;228:1175-80.

Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, Seeley RJ. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol.* 2000;51:255-77.

Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci.* 2003;6:736-42.

Yamanaka A, Sakurai T, Katsumoto T, Yanagisawa M, Goto K. Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res.* 1999;849:248-52.

Yo JH, Taimage DA, Role LW. Integration of leptin signalling in an appetite-related neural circuit. *Neuron.* 2005;48:1055-66.

Zifa E, Fillion G. 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacol Rev.* 1992;44(3):401-58.

8. ANEXOS

8.1. Artigo publicado.

Título: The effects of metergoline and 8-OH-DPAT injections into arcuate nucleus and lateral hypothalamic area on feeding in female rats during the estrous cycle.

Autores: Steffens SM, da Cunha IC, Beckman D, Lopes AP, Faria MS, Marino-Neto J, Paschoalini MA.

Revista: *Physiol Behav.* 2008;95:484-91.

Physiology & Behavior 95 (2008) 484–491



Contents lists available at ScienceDirect

Physiology & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phb



The effects of metergoline and 8-OH-DPAT injections into arcuate nucleus and lateral hypothalamic area on feeding in female rats during the estrous cycle

Sérgio Murilo Steffens, Isabel Cristina da Cunha, Danielle Beckman, Ana Paula Fraga Lopes, Moacir Serralvo Faria, José Marino-Neto, Marta Aparecida Paschoalini *

Department of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2008
Received in revised form 10 July 2008
Accepted 17 July 2008

Keywords:

Metergoline
8-OH-DPAT
Food intake
Estrous cycle
Hypothalamus

ABSTRACT

The present study examined the effects of local injections of metergoline (MET, an antagonist of 5-HT₁/2 receptors, 2 and 20 nmol) and 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT, selective 5-HT_{1A} receptor agonist, 0.6 and 6 nmol) into the arcuate nucleus (ARC) and the lateral hypothalamus (LH), on ingestive and non-ingestive behaviors of female rats. These effects were examined during the diurnal periods of diestrus and estrus in rats adapted to eat a wet mash diet (enriched with 10% sucrose) during 1h for 3 consecutive days at the recording chamber. The results showed that 8-OH-DPAT injected into the LH significantly reduced food intake at all doses and both cycle stages, while in the ARC these treatments evoked hypophagia only at the highest 8-OH-DPAT dose and only at the estrous phase. MET administered into the ARC (at all doses) failed to affect food intake during both estrous stages. On the other hand, food intake decreased after injection of both doses of MET into the LH of rats during estrous and diestrus phases. In estrus stage, injections of the higher dose of 8-OH-DPAT into the ARC and into the LH decreased the duration of feeding. Latency to start feeding, drinking, and non-ingestive behaviors were not affected by 8-OH-DPAT or MET treatments in the ARC or the LH in both cycle phases. These results indicated that 5-HT_{1A} receptors participate in the serotonergic control of feeding-related mechanisms located at the ARC and the LH. These feeding-related serotonergic circuits in both areas are possibly affected by ovarian hormones that could increase sensitivity of ARC neurons to the hypophagic effects of 8-OH-DPAT or increase the efficacy of satiety signals that terminate feeding. In addition, the present data indicated that serotonergic inputs do not exert a tonic inhibitory activity on the ARC and the LH feeding-related circuits.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

8.2. Artigo submetido.

Data: Maio de 2009.

Título: WAY 100635 suppresses the hypophagia evoked by injection of 8-OH-DPAT into the arcuate nucleus and lateral hypothalamic area of female rats during the estrous cycle.

Autores: Steffens SM, Beckman D, Faria MS, Marino-Neto J, Paschoalini MA.

Revista: European Journal of Neuroscience (Número do manuscrito: EJN-2009-05-15509).

European Journal of Neuroscience



WAY 100635 suppresses the hypophagia evoked by injection of 8-OH-DPAT into the arcuate nucleus and lateral hypothalamic area of female rats during the estrous cycle.

Journal:	<i>European Journal of Neuroscience</i>
Manuscript ID:	EJN-2009-05-15509
Manuscript Type:	Research Report
Date Submitted by the Author:	18-May-2009
Complete List of Authors:	Paschoalini, Marta; UFSC, Physiological Science
Key Words:	8-OH-DPAT, food intake, WAY 100635, hypothalamus, Estrous cycle rat

European Journal of Neuroscience
Behavioral Neuroscience
Dr. Rae Silver

WAY 100635 suppresses the hypophagia evoked by injection of 8-OH-DPAT into the arcuate nucleus and lateral hypothalamic area of female rats during the estrous cycle.

Sérgio Murilo Steffens, Danielle Beckman, Moacir Serralvo Faria, José Marino-Neto, Marta Aparecida Paschoalini.

Department of Physiological Sciences - Centre of Biological Sciences
Federal University of Santa Catarina (UFSC)
Florianópolis, Brazil

Correspondence to:

Dr. Marta Aparecida Paschoalini
Dept. of Physiological Sciences - CCB
Federal University of Santa Catarina
88040-900 Florianópolis, SC, Brazil
Phone: 048 3721 9352 Fax: 048 3231 9672
E-mail: marta@ccb.ufsc.br

Number of pages: 22

Number of figures: 02

Number of tables: 02

Number of words: Manuscript (5393); Abstract (223) and Introduction (557).

Running head: Hypothalamic 5-HT_{1A} receptor blockade and feeding.

Keywords: 8-OH-DPAT; WAY 100635; Food intake; Estrous cycle rats; Hypothalamus.

8.3. Demais artigos que o aluno participou como co-autor

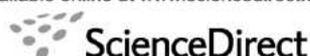
Título: GABA_A and GABA_B agonist microinjections into medial accumbens shell increase feeding and induce anxiolysis in an animal model of anxiety.

Autores: Lopes AP, da Cunha IC, Steffens SM, Ferraz A, Vargas JC, de Lima TC, Neto JM, Faria MS, Paschoalini MA.

Revista: Behav Brain Res. 2007;184:142-9.



Available online at www.sciencedirect.com



Behavioural Brain Research 184 (2007) 142–149



www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

GABA_A and GABA_B agonist microinjections into medial accumbens shell increase feeding and induce anxiolysis in an animal model of anxiety

Ana Paula Fraga Lopes^a, Isabel Cristina da Cunha^{a,c}, Sergio Murilo Steffens^a, Adriana Ferraz^a,
Juliano Cordova Vargas^a, Thereza Christina Monteiro de Lima^b, José Marino Neto^a,
Moacir Serralvo Faria^a, Marta Aparecida Paschoalini^{a,*}

^a Department of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina 88, 040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Department of Pharmacology, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina 88, 040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^c University of the South of Santa Catarina, Brazil

Received 28 March 2007; received in revised form 28 June 2007; accepted 3 July 2007

Available online 7 July 2007

Abstract

This study investigated the effect of GABA_A (muscimol, MUSC) and GABA_B (baclofen, BACL) agonist receptors microinjected into medial accumbens shell on feeding and the level of fear in free-feeding rats submitted to the elevated plus-maze (EPM), an animal model of anxiety. Bilateral microinjections of either MUSC (128 pmol/0.2 μl/side) or BACL (128 and 256 pmol/0.2 μl/side) induced an anxiolytic-like effect since they decreased the occurrence of risk assessment, a defensive behaviour positively correlated with the animal anxiety level. Bilateral BACL microinjection (128 pmol), but not MUSC, also increased the head-dipping frequency over the open arms of the EPM, another representative behaviour of anxiety, but negatively correlated with it. In addition to anxiolysis, the present study also showed that the microinjection of MUSC and BACL agonists into rostral sites of the medial Acb shell (AP, +1.2 to +1.6) increased food intake significantly whereas drinking behaviour kept unchanged. Both doses of MUSC and BACL also decreased feeding latency. BACL but not MUSC dose-dependently increased food length. The data indicated a putative role of GABA receptors (especially GABA_B) in the medial Acb shell for anxiety modulation in rats.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Accumbens; Anxiety; Fear; Food intake; Elevated plus-maze; Baclofen; Muscimol; Rat

Título: The microinjection of AMPA receptor antagonist into the accumbens shell, but not into the accumbens core, induces anxiolysis in an animal model of anxiety.

Autores: Da Cunha IC, Lopes AP, Steffens SM, Ferraz A, Vargas JC, de Lima TC, Marino Neto J, Paschoalini MA, Faria MS.

Revista: Behav Brain Res. 2008;188:91-9.



Available online at www.sciencedirect.com



Behavioural Brain Research 188 (2008) 91–99

**BEHAVIOURAL
BRAIN
RESEARCH**

www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

The microinjection of AMPA receptor antagonist into the accumbens shell, but not into the accumbens core, induces anxiolysis in an animal model of anxiety

Isabel Cristina da Cunha^{a,c}, Ana Paula Fraga Lopes^a, Sergio Murilo Steffens^a, Adriana Ferraz^a,
Juliano Cordova Vargas^a, Thereza Christina Monteiro de Lima^b, José Marino Neto^a,
Marta Aparecida Paschoalini^a, Moacir Serralvo Faria^{a,*}

^a Department of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 88.040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Department of Pharmacology, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 88.040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^c Centre of Biological Sciences and Health, University of the South of Santa Catarina (UNISUL), 88.132-000 Palhoça, SC, Brazil

Received 15 August 2007; received in revised form 22 October 2007; accepted 25 October 2007

Available online 1 November 2007

Abstract

This study investigated the effect of the AMPA receptor antagonist 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) microinjected into the core and shell sub-regions of the accumbens nucleus (Acb), on the level of fear/anxiety and emotional learning, in female rats submitted to the elevated plus-maze (EPM), an animal model of anxiety. Bilateral microinjections of DNQX (330 and 660 ng) into the Acb shell (AP, +1.08 to +2.16) induced an anxiolytic-like effect in relation to rats microinjected with vehicle, since there was an increased percentage of entries in the open arms of the maze. The 660 ng DNQX microinjection into the Acb shell also increased the percentage of entries into the open arms in relation to 660 ng DNQX microinjection into the Acb core. Prior DNQX microinjections in both core and shell sub-regions of the Acb failed to impair the emotional learning, since the animals exhibited an increase of the open arm avoidance on EPM Trial 2 in relation to EPM trial 1. DNQX microinjections into both sub-regions of the Acb did not change the number of entries into the enclosed arms, either in the EPM Trial 1 or in the EPM Trial 2, which indicates an absence of drug-induced locomotor impairment. Similarly, DNQX microinjections into both sub-regions of the Acb failed to alter the total arm entries, rearing, grooming and head-dipping frequency. The anxiolytic-like effect induced by DNQX suggests that the AMPA receptor in the Acb shell, but not in the Acb core, may underlie anxiety regulation in the EPM.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Accumbens; Anxiety; Fear; Elevated plus-maze; AMPA; Glutamate; Rat

Título: Food intake increased after injection of adrenaline into the median raphe nucleus of free-feeding rats.

Autores: Dos Santos RL, Mansur SS, Steffens SM, Faria MS, Marino-Neto J, Paschoalini MA.

Revista: Behav Brain Res. 2009;197(2):411-6.

Behavioural Brain Research 197 (2009) 411–416



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr



Research report

Food intake increased after injection of adrenaline into the median raphe nucleus of free-feeding rats

Rúbia Lima Dias dos Santos, Samira Schultz Mansur, Sérgio Murilo Steffens, Moacir Serralvo Faria, José Marino-Neto, Marta Aparecida Paschoalini*

Department of Physiological Sciences - CCB, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2008

Received in revised form

30 September 2008

Accepted 4 October 2008

Available online 15 October 2008

Keywords:

Adrenaline

Noradrenaline

Food intake

Median raphe nucleus

ABSTRACT

The present study examined the effects of local injections of adrenaline (AD) or noradrenaline (NA) in equimolar doses (6, 20, and 60 nmol) into the median raphe nucleus (MRN) on ingestive and non-ingestive behaviors of free-feeding rats. The results showed that the treatment with AD at doses of 20 and 60 nmol increased food intake. While the hyperphagic response evoked by 60 nmol dose of AD was accompanied by a reduction of the latency to start feeding and an increase in the frequency of feeding, the 20 nmol dose of AD was unable to change these behavioral aspects of feeding response. The meal size and non-ingestive behaviors were not affected by AD treatment in the MRN. While water intake remained unchanged after the treatment with 20 nmol of AD in the MRN, this dose decreased the latency to start drinking. Feeding and drinking behaviors were not affected by treatment with NA in the MRN. These data suggest that adrenergic receptors of MRN participate in mechanisms that control food intake initiation or appetite. In addition, our results also indicate that the availability of energetic substrate could affect the adrenergic influence on MRN neurons since previous data indicated that the injection of AD into the MRN of food restricted rats decreased food intake.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.