

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

Samira Schultz Mansur

**EFEITOS DAS INJEÇÕES DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS
ADRENÉRGICOS NO NÚCLEO MEDIANO DA RAPE SOBRE
COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE E
INGESTÃO DE ALIMENTO EM RATOS**

Florianópolis
2011

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

Samira Schultz Mansur

**EFEITOS DAS INJEÇÕES DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS
ADRENÉRGICOS NO NÚCLEO MEDIANO DA RAFE SOBRE
COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE E
INGESTÃO DE ALIMENTO EM RATOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, na área de Neuropsicobiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria.

Florianópolis
2011

Catologação na fonte elaborada pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

A ficha catalográfica é confeccionada pela Biblioteca Central.

Tamanho: 7cm x 12 cm

Fonte: Times New Roman 9,5

Maiores informações em:

<http://www.bu.ufsc.br/design/Catologação.html>

Samira Schultz Mansur

**EFEITOS DAS INJEÇÕES DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS
ADRENÉRGICOS NO NÚCLEO MEDIANO DA RAFE SOBRE
COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE E
INGESTÃO DE ALIMENTO EM RATOS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Neurociências”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2011.

Prof^a. Dr^a Carla Inês Tasca
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Marta Aparecida Paschoalini
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. José Vanderlei Menani
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Newton Sabino Canteras
Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Severo Rodrigues
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

- Aos meus amados pais, Dalibar e Arlene, por tudo o que representam para mim. À minha família... por tudo!
- À minha orientadora Prof^a. Dr^a Marta Aparecida Paschoalini, pela dedicação profissional, pela disponibilidade em ajudar em todos os momentos e por todo o aprendizado e oportunidades que esta jornada me proporcionou. Muito obrigada também pela confiança!
- Ao meu co-orientador Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria, pelo exemplo profissional, pelos ensinamentos durante todo o doutorado, pela confiança e demonstrações de amizade!
- À Prof. Dr^a. Mariana Graciela Terenzi pelos ensinamentos durante a docência orientada e auxílio na histologia, pelas correções de inglês, por disponibilizar o uso de seu laboratório e pela constante disposição em ajudar.
- Ao Prof. Dr. José Marino Neto pelos ensinamentos, pelo valioso auxílio no aprendizado histológico e por disponibilizar o uso de seu laboratório.
- Aos queridos colegas e amigos que contribuíram de forma essencial para a realização deste trabalho, em especial no início do doutorado, ensinando-me as técnicas e rotina do laboratório: Ana Paula Fraga Lopes, Ana Cláudia Januário, Daniele Beckman, Diana Yae Sakae, Isabel Cristina da Cunha, Juliano Córdova Vargas, Rúbia Dias dos Santos, Sérgio Murilo Steffens e Sociarai Peruzo Iácono. Muito obrigada pela amizade e convivência harmoniosa!
- Ao Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos por disponibilizar os agonistas adrenérgicos- α_1 e β_2 .
- Aos professores membros da banca de qualificação Dr^a. Cilene Lino de Oliveira, Dr^a. Mariana Graciela Terenzi e Dr. Leandro Bertoglio, pelas importantes recomendações.
- Aos professores membros da banca de defesa Dr. José Vanderlei Menani, Dr. Newton Sabino Canteras, Dr^a. Ana Lúcia Severo Rodrigues e Dr. Leandro Bertoglio.
- Aos demais professores do PPG em Neurociências, que se dedicam em transmitir conhecimento e tanto contribuíram para minha formação.
- Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, em especial ao Nivaldo, Dona Vilma e Seu Carlos, por todo o auxílio e informações.

- A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.
- E meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para minha formação profissional e pessoal durante o doutorado e que os nomes estão aqui omitidos.

RESUMO

MANSUR, Samira Schultz. **Efeitos das injeções de agonistas e antagonistas adrenérgicos no núcleo mediano da rafe sobre comportamentos relacionados à ansiedade e ingestão de alimento em ratos.** 2011. Tese (Doutorado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Este estudo investigou a participação de receptores adrenérgicos α_1 , α_2 e β_2 do núcleo mediano da rafe (MR) de ratos saciados no controle dos comportamentos relacionados à ansiedade e ingestão de alimento, a fim de estabelecer uma associação funcional entre eles. O agonista adrenérgico- α_1 fenilefrina (FEN) (0, 0,2, 2, 6, 20 nmol) foi injetado no MR ou no núcleo pontino (Pn); o agonista adrenérgico- α_2 clonidina (CLO) foi injetado no MR (0, 0,2, 2, 6, 20 nmol), no Pn (0,2 e 20 nmol) ou na formação reticular mesencefálica (FRm) (0,2 e 20 nmol); o agonista adrenérgico- β_2 terbutalina (TER) (0, 0,2, 2, 6, 20 nmol) foi injetado no MR ou no Pn. O antagonista adrenérgico- α_1 prazosin (PRA, 40 nmol) ou veículo foram injetados no MR 15 min antes do tratamento com FEN (0,2 nmol); o antagonista adrenérgico- α_2 ioimbina (YOH, 40 nmol) foi administrado 15 min antes da CLO (0,2 nmol e 20 nmol) ou veículo. Os animais foram colocados no labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação de variáveis espaço-temporais e etológicas. Na sequência, os comportamentos ingestivos e não-ingestivos foram registrados durante 30 min e a quantidade de ração e água consumida foram mensuradas. Tanto no LCE quanto na caixa de registro alimentar, todas as doses de FEN injetadas no MR diminuíram a frequência de exibição da avaliação de risco (AR), um parâmetro etológico indicador de ansiólise; as variáveis espaço-temporais permaneceram inalteradas. Não houve alteração de comportamentos relacionados à ansiedade após o tratamento com FEN no Pn. O tratamento prévio com PRA no MR bloqueou o efeito ansiolítico da FEN. A dose mais alta de CLO injetada no MR aumentou a frequência de AR, um efeito ansiogênico; resultado similar foi observado após a injeção da mesma dose da droga no Pn e na FRm. O tratamento prévio com YOH no MR bloqueou o efeito ansiogênico da CLO. Todas as doses de TER injetadas no MR e no Pn diminuíram a frequência de AR, aumentaram a % do tempo de permanência nos braços abertos e aumentaram o número de entradas nos braços abertos do LCE, indicando efeito ansiolítico. A ingestão de alimento não foi afetada pela injeção de FEN no MR ou no Pn. O tratamento isolado com PRA no MR causou hiperfagia, acompanhada por redução na latência para iniciar a alimentação, aumento na duração, bem como aumento na frequência da resposta de alimentação. A maior dose de CLO também causou hiperfagia acompanhada por redução na latência para iniciar a alimentação e aumento na frequência desta resposta quando injetada no MR, mas não no Pn ou na FRm. O tratamento prévio com YOH no MR bloqueou o efeito ingestivo da CLO. A ingestão de alimento não foi afetada após a injeção de TER no MR e no Pn. Os resultados

indicam que: 1) a ativação de receptores adrenérgicos- α_1 do MR têm efeito ansiolítico, enquanto a ativação de receptores adrenérgicos- α_2 deste núcleo causa ansiogênese, sendo que estas respostas comportamentais parecem ser mediadas, respectivamente, pelo aumento e diminuição da liberação de 5-HT do MR; 2) no animal saciado há uma influência adrenérgica mediada por receptores adrenérgicos- α_1 do MR, que ativa tonicamente um circuito inibitório, possivelmente neurônios serotonérgicos deste núcleo, e impede o comportamento ingestivo; 3) a ativação de receptores adrenérgicos- β_2 do MR têm efeito ansiolítico, sem alterar o comportamento de ingestão de alimento; 4) os comportamentos de ansiedade e ingestivos controlados por circuitos adrenérgicos do MR operam por vias neurais independentes.

Palavras-chave: Núcleo mediano da rafe, receptor adrenérgico- α , receptor adrenérgico- β , ansiedade, ingestão de alimento, rato.

ABSTRACT

MANSUR, Samira Schultz. **Effects of adrenergic agonists and antagonists injections into the median raphe nucleus on anxiety-like and ingestive behaviors in rats.** 2011. Thesis (Doctorate in Neuroscience) - Federal of Santa Catarina University, Florianópolis, Brazil

This study investigated the participation of median raphe nucleus (MnR) α_1 , α_2 and β_2 adrenergic receptors of free-feeding rats in the control of anxiety-like behavior and feeding as an attempt to establish a functional correlation between these behaviors. The α_1 -adrenergic agonist phenylephrine (FEN) (0, 0,2, 2, 6, 20 nmol) was injected into the MnR or into the pontine nucleus (Pn); the α_2 -adrenergic agonist clonidine (CLO) was injected into the MnR (0, 0,2, 2, 6, 20 nmol), into the Pn (0,2 e 20 nmol) or into the mesencephalic reticular formation (FRm) (0,2 e 20 nmol); the β_2 -adrenergic agonist terbutaline (TER) (0, 0,2, 2, 6, 20 nmol) was injected into the MnR or into the Pn. The α_1 -adrenergic antagonist prazosin (PRA, 40 nmol) or vehicle was injected into the MnR 15 min before treatment with phenylephrine (PHE, 0.2 nmol). The α_2 -adrenergic antagonist yohimbine (YOH, 40 nmol) was administered 15 min before CLO (0.2 nmol and 20 nmol) or vehicle. The animals were exposed to the elevated plus-maze to evaluate spatial-temporal and ethological variables. Subsequently, the ingestive and non-ingestive behaviors were recorded during 30 min and the quantity of food and water consumed were measured. Both in the elevated plus-maze (EPM) and in the feeding chamber, all PHE doses injected into the MnR decreased the risk assessment frequency, an ethological parameter of anxiolytic-like effect; the spatial-temporal variables remained unchanged. The anxiety-like behavior was not affected by PHE treatment in the Pn. The previous treatment with PRA in the MnR blocked the anxiolytic-like effect of FEN. The highest dose of CLO injected into the MnR increased the RA frequency, an anxiogenic-like effect; similar result was observed after the same dose of CLO injected into the Pn and mRt. The previous treatment with YOH in the MnR blocked the anxiogenic effect of CLO. All TER doses injected into the MnR and into the Pn decreased the frequency of RA, increased the % of the time (seconds) spent in the open arms and increased the number of entrance in the open arms of the EPM, pointing to an anxiolytic effect. Feeding behavior was not affected by PHE into the MnR, such as occurred after the treatment into the Pn. The PRA treatment in the MnR evoked hyperphagy accompanied by a reduction in the latency to start eating, an increase in the feeding duration and an increase in feeding frequency. The highest CLO dose also caused hyperphagy accompanied by a reduction in the latency to start eating and an increase in feeding frequency when injected into the MnR, but not in the Pn or mRt. The previous treatment with YOH in the MnR blocked the ingestive effect of CLO. The food intake was not affected after the injection of TER into the MnR nor into the Pn. The results indicate

that: 1) the MnR α_1 -adrenergic receptors activation have an anxiolytic-like effect, while the activation of α_2 -adrenergic receptors upon this nucleus cause an anxiogenic-like effect, and these behaviors responses seem to be mediated, respectively, by the increase and decrease of the MnR 5-HT release; 2) in free-feeding animals there is an adrenergic influence, mediated by MnR α_1 -adrenergic receptors, which constantly activate an inhibitory circuitry, possibly MnR serotonergic neurons, and blockade the ingestive behavior; 3) the MnR β_2 -adrenergic receptors activation have an anxiolytic effect and unchanged the feeding behavior; 4) the anxiety-like and feeding behaviors controlled by MnR adrenergic circuits operate by independent neural pathways.

Keywords: Median raphe nucleus, α adrenergic receptor, β adrenergic receptor, anxiety, food intake, rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A - Aparelho estereotáxico.....	32
Figura 1B - Local aproximado do orifício feito para atingir o núcleo MR.....	32
Figura 2. Labirinto em cruz elevado.....	35
Figura 3. Caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos..	36
Figura 4. Fotos de secções coronais através da formação reticular mesencefálica (FRm), núcleo mediano da rafe (MR) e núcleo pontino (Pn). As setas nas fotos apontam os sítios de injeção. Os números acima dos desenhos se referem às coordenadas estereotáxicas anteroposteriores.....	41
Figura 5. Alterações na frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco após o tratamento com salina (0, n=6) ou fenilefrina (FEN) nas doses de 0,2 nmol (n=7), 2 nmol (n=6), 6 nmol (n=6) e 20 nmol no núcleo mediano da rafe (MR). Os valores são média ± EPM da exibição do comportamento durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado (A) e durante 30 min na caixa de registro do comportamento alimentar (B). * <i>p</i> < 0,05 em relação à salina. ANOVA de uma via e teste de Duncan.....	43
Figura 6. Alterações na frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco após o tratamento com salina (0, n=6) ou clonidina (CLO) nas doses de 0,2 nmol (n=6), 2 nmol (n=6), 6 nmol (n=6) e 20 nmol (n=8) no núcleo mediano da rafe (MR). Os valores são média ± EPM da exibição do comportamento durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado. * <i>p</i> < 0,05 em relação à salina. ANOVA de uma via e teste de Duncan.....	45
Figura 7. Alterações na quantidade, latência, frequência e duração do consumo de alimento, após o tratamento com salina (0, n=6) ou clonidina nas doses de 0,2 nmol (n=6), 2 nmol (n=6), 6 nmol (n=6) e 20 nmol (n=8) no núcleo mediano da rafe de ratos saciados. Os valores são média ± EPM da exibição do comportamento durante 30 min de registro do comportamento alimentar. * <i>p</i> < 0,05 em relação à salina. ANOVA de uma via e teste de Duncan.....	47
Figura 8. Alterações na frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco após o tratamento com salina (0, n=6) ou clonidina nas doses de 0,2 nmol (n=6) e 20 nmol (n=8) no núcleo mediano da rafe (MR); salina (n= 8) ou clonidina nas doses de 0,2 nmol (n= 8) e 20 nmol (n= 14) no núcleo pontino (Pn); e salina (n= 4) ou clonidina nas doses de 0,2 nmol (n= 8) e 20 nmol (n= 9) na formação reticular mesencefálica (FRm). Os valores são média ± EPM da exibição do comportamento durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado. * <i>p</i> < 0,05 em relação à salina. ANOVA de duas vias e teste de Duncan.....	49

Figura 9. Alterações na quantidade, latência e frequência do consumo de alimento, após o tratamento com salina (0) ou clonidina na dose de 20 nmol no núcleo mediano da rafe (MR, n=6 e n=8, respectivamente); no núcleo pontino (Pn, n=8 e n=14, respectivamente) e na formação reticular mesencefálica (FRm, n=4 e n=9, respectivamente) de ratos saciados. Os valores são média ± EPM da exibição do comportamento durante 30 min de registro na caixa de ingestão. A e B, **p* < 0,05 em relação à salina e CLO injetada no Pn e FRm; C, **p* < 0,05 em relação somente à salina. ANOVA de duas vias e teste de Duncan.....50

Figura 10. Alterações na frequência de exibição dos comportamentos de avaliação de risco, % de tempo de permanência nos braços abertos e % de entradas nos braços abertos, após o tratamento com salina (0, n=6) ou terbutalina nas doses de 0,2 nmol (n=6), 2 nmol (n=8), 6 nmol (n=6) e 20 nmol (n=8) no núcleo mediano da rafe (MR) e salina (n=8) ou terbutalina nas doses de 0,2 nmol (n=5), 2 nmol (n=4), 6 nmol (n=7) e 20 nmol (n=5) no núcleo pontino (Pn). Os valores são média ± EPM da exibição do comportamento durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado. **p* < 0,05 em relação à salina. ANOVA de duas vias e teste de Duncan.....52

Figura 11: Alterações na frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco, após o tratamento com veículo (SPG) ou prazosin (PRA, 40 nmol) 15 min antes do tratamento com veículo (SAL) ou fenilefrina (FEN, 0,2 nmol) no núcleo mediano da rafe de ratos saciados. Os valores são média ± EPM da exibição do comportamento durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado (A) e 30 min de permanência na caixa de registro alimentar (B). **p* < 0,05 em relação à salina. ANOVA de uma via e teste de Duncan. A: n=8 animais/tratamento em SPG-SAL e PRA-SAL, n=7 em SPG-FEN e n=6 em PRA-FEN. B: n=7 animais/tratamento exceto em PRA-FEN (n=6)56

Figura 12: Alterações na quantidade, latência e frequência do consumo de alimento, após o tratamento com veículo (SPG) ou prazosin (PRA, 40 nmol) 15 min antes do tratamento com veículo (SAL) ou fenilefrina (FEN, 0,2 nmol) no núcleo mediano da rafe de ratos saciados. Os valores são média ± EPM da exibição do comportamento durante 30 min de registro na caixa alimentar. **p* < 0,05 em relação à salina. ANOVA de duas vias e teste de Duncan. n=7 animais/tratamento exceto para PRA-FEN (n=6).....59

Figura 13: Alteração na frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco no labirinto em cruz elevado, após o tratamento com veículo (SPG) ou ioimbina (40 nmol) 15 min antes do tratamento com veículo (SAL) ou clonidina (0,2 nmol ou 20 nmol) no núcleo mediano da rafe de ratos saciados. Os valores são média ± EPM da exibição do comportamento durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado (A) e 30 min de permanência na caixa de registro alimentar (B). **p* < 0,05 em relação à salina. ANOVA de uma via e teste de Duncan. n=6 animais/tratamento exceto para SPG-SAL e SAL-CLO 20 (n=7).....60

Figura 14: Alterações na quantidade, latência e frequência do consumo de alimento, após o tratamento com veículo (SPG) ou ioimbina (YOH, 40 nmol) 15 min antes do tratamento com veículo (SAL) ou clonidina (CLO, 0,2 nmol ou 20 nmol) no núcleo mediano da rafe (MR) de ratos saciados. Os valores são média \pm EPM da exibição do comportamento durante 30 min de registro na caixa alimentar. * $p < 0,05$ em relação à salina. ANOVA de duas vias e teste de Duncan. n=6 animais/tratamento exceto em SPG-SAL e SPG-CLO 20 nmol (n=7).....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos do tratamento com salina (SAL) ou fenilefrina (FEN, nmol) no núcleo mediano da rafe sobre variáveis espaço-temporais e etológicas, durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado.....	42
Tabela 2 - Efeitos do tratamento com salina (SAL) ou fenilefrina (FEN) no núcleo mediano da rafe sobre a duração (s) de variáveis não-ingestivas em ratos saciados, durante 30 min de registro.....	44
Tabela 3 - Efeitos do tratamento com salina (SAL) ou clonidina (CLO, nmol) no núcleo mediano da rafe sobre variáveis espaço-temporais e etológicas, durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado.....	45
Tabela 4 - Efeitos do tratamento com salina (SAL) ou clonidina (CLO, nmol) no núcleo mediano da rafe sobre a duração (s) de variáveis não-ingestivas de ratos saciados, durante 30 min de registro.....	48
Tabela 5 - Efeitos do tratamento com salina (SAL) ou terbutalina (TER, nmol) nos núcleos mediano da rafe e pontino sobre variáveis espaço-temporais e etológicas, durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado.....	53
Tabela 6 - Efeitos do tratamento com salina (SAL) ou terbutalina (TER, nmol) no núcleo mediano da rafe sobre a duração (s) de variáveis não-ingestivas em ratos saciados, durante 30 min de registro.....	54
Tabela 7 - Efeitos do tratamento com veículo (SPG) ou prazosin (PRA) 15 min antes do tratamento com veículo (SAL) ou fenilefrina (FEN) no núcleo mediano da rafe sobre variáveis espaço-temporais e etológicas, durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado.....	57
Tabela 8 - Efeitos das injeções de veículo (SPG) ou prazosin (PRA) 15 min antes das injeções de veículo (SAL) ou fenilefrina (FEN) no núcleo mediano da rafe de ratos saciados sobre a duração (s) de variáveis não-ingestivas, durante 30 min de registro.....	58
Tabela 9 - Efeitos do tratamento com veículo (SPG) ou ioimbina (YOH) 15 min antes do tratamento com veículo (SAL), clonidina 0,2 nmol (CLO 0,2) ou clonidina 20 nmol (CLO 20) no núcleo mediano da rafe sobre variáveis espaço-temporais e etológicas, durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado.....	61
Tabela 10 - Efeitos do tratamento com veículo (SPG) ou ioimbina (YOH) 15 min antes do tratamento com veículo (SAL), clonidina 0,2 nmol (CLO 0,2) ou clonidina 20 nmol (CLO 20) no núcleo mediano da rafe de ratos saciados sobre a duração (s) de variáveis não-ingestivas durante 30 min de registro.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina – Serotonina
8-OH-DPAT – 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina
% TA - Porcentagem do tempo (em segundos) de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado
% EA – Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado
AD – Adrenalina
AL – Auto-limpeza
AR – Avaliação de risco
ANOVA – Análise de variância
CLO – Clonidina
EF - Número de entrada nos braços fechados do labirinto em cruz elevado
EV – Exploração vertical
EXALI – Exploração do alimento
FEN – Fenilefrina
FRm – Formação reticular mesencefálica
IC – Imersão da cabeça no labirinto em cruz elevado
IM – Imobilidade
LCE – Labirinto em cruz elevado
MR – Núcleo mediano da rafe
NA – Noradrenalina
Pn – Núcleo pontino
PRA – Prazosin
TE – Número total de entradas efetuadas no labirinto em cruz elevado
TER – Terbutalina
YOH – Ioimbina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Animais.....	31
3.2 Procedimentos cirúrgicos.....	31
3.3 Soluções e drogas injetadas.....	33
3.4 Injeções intracerebrais.....	33
3.5 Registro dos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado.....	33
3.6 Registro dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos.....	35
3.7 Procedimentos experimentais.....	37
3.8 Perfusão e histologia.....	38
3.9 Análise dos dados.....	39
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Injeção do agonista adrenérgico α_1 (FEN).....	42
4.2 Injeção do agonista adrenérgico α_2 (CLO).....	44
4.3 Injeção do agonista adrenérgico β_2 (TER).....	51
4.4 Tratamento prévio com o antagonista adrenérgico α_1 (PRA) seguido da injeção do agonista adrenérgico α_1 (FEN).....	55
4.5 Tratamento prévio com o antagonista adrenérgico α_2 (YOH) seguido da injeção do agonista adrenérgico α_2 (CLO).....	60
5 DISCUSSÃO.....	67
6 CONCLUSÕES.....	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

Os núcleos da rafe são formados por um conjunto de neurônios que se localizam na linha média do tronco encefálico e constituem a principal fonte de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) do sistema nervoso central (SNC) (Wirtshafter, 2001; Adell et al., 2002; Hornung, 2003; Walther e Bader, 2003; Takase e Nogueira, 2008; Mokler et al., 2009). Estes núcleos da rafe (do francês *raphé*, costura) foram organizados em nove grupamentos de células serotoninérgicas identificadas como B1 a B9 por Dahlstrom e Fuxe (1964) (Vertes e Crane, 1997) e se projetam para porções superiores do encéfalo e da medula espinhal (Burt, 1993; Hoffman e Lefkowitz, 1996; Carlson, 2002).

Ao longo do bulbo, localizam-se os núcleos da rafe caudais, denominados pálido (B1), obscuro (B2 e B4) e magno (B3), os quais se projetam ao tronco encefálico inferior (Kandel, Schwartz e Jessel, 2003; Vertes e Linley, 2007) e, por meio de três projeções paralelas, às colunas dorsal, intermédia e ventral da medula espinhal (Hornung, 2003). O núcleo magno se projeta para o corno dorsal da medula espinhal e está reconhecidamente envolvido no controle da dor (Kingsley, 2000). Na ponte e mesencéfalo estão os núcleos da rafe rostrais, denominados pontino (B5), dorsal (B6 e B7), mediano ou central superior (B5, B7 e B8), linear caudal (B8) e supralemniscal (B9), os quais, na maioria, possuem fibras que ascendem ao tronco encefálico superior e prosencéfalo basal (Stamp e Semba, 1995; Kandel, Schwartz e Jessel, 2003; Vertes e Linley, 2007), principalmente pelo feixe prosencefálico medial (Vertes, Fortin e Crane, 1999; Hensler, 2006; Vertes e Linley, 2007), mas também descendem a núcleos do tronco encefálico (Stratford e Wirtshafter, 1988), cerebelo (Torigoe, Blanks e Precht, 1986) e medula espinhal (Bowker, Westwund e Coulter, 1981). O núcleo B9 tem sido pouco estudado, possivelmente por consistir em uma faixa estreita de células localizada dorsalmente ao lemnisco medial na região ventral da formação reticular pontina, dificultando a localização precisa de microinjeção (Stamp e Semba, 1995; Vertes e Crane, 1997).

A 5-HT prosencefálica se origina quase inteiramente de neurônios do núcleo dorsal da rafe (DR) e do núcleo mediano da rafe (MR) (Lucki, 1998; Carlson, 2002, Adell et al., 2002; Lowry, 2002; Perrin et al., 2003), embora tenha sido relatado grande número de neurônios serotoninérgicos fora dos limites da rafe (Vertes e Crane, 1997). Os axônios originários dos DR e MR representam distintos sistemas de

projeção serotonérgica e cada via predomina em uma determinada estrutura terminal (Mokler et al., 2009); por exemplo, as eferências do MR alcançam principalmente o septo medial, o hipocampo dorsal e o hipotálamo (Hensler, 2006), enquanto as eferências do DR atingem o estriado dorsal, hipocampo ventral, amígdala, núcleo accumbens e córtex cerebral (Mokler et al., 2009). É importante ressaltar que axônios do MR se distribuem densamente ao DR, o qual envia recíprocas projeções ao MR, sugerindo uma possível coordenação de ambos os núcleos na liberação da 5-HT prosencefálica (Vertes, Fortin e Crane, 1999). Entre estes núcleos, o MR foi menos estudado do que o DR (Adell e Artigas, 1999; Hopwood e Stamford, 2001; Adell et al., 2002), talvez, pelo tamanho pequeno do núcleo e sua profunda localização no tronco encefálico (Judge e Gartside, 2006).

O núcleo MR se estende a partir do limite caudal da decussação do pedúnculo cerebelar superior até o nível do núcleo motor do trigêmeo (Hensler, 2006). É dividido em uma região mediana (o MR propriamente dito), região paramediana na sua metade caudal e duas extensões laterais na formação reticular (Backer et al., 1991). Seus axônios são espessos (Morin e Meyer-Bernstein, 1999) e alcançam estruturas de localização mediana/paramediana como: núcleos caudais da rafe, núcleo DR, núcleo interpeduncular, corpo mamilar medial, núcleo supramamilar, núcleo posterior e região perifornical do hipotálamo, núcleos medial e intralaminar do tálamo, região dopaminérgica da zona incerta medial, habênula lateral, septo medial e formação hipocampal (Vertes, Fortin e Crane, 1999). Há poucas a moderadas projeções do MR ao córtex entorinal, peririnal e frontal e projeções esparsas às outras regiões corticais (Vertes, Fortin e Crane, 1999).

Os neurônios serotonérgicos do MR estão concentrados na região mediana diminuindo a sua quantidade nas divisões laterais do núcleo (Backer et al., 1991), além disso, seus axônios bastante bifurcados permitem que estas células controlem diversas regiões do SNC simultaneamente (Lucki, 1998). A 5-HT influencia sistemas fisiológicos como o cardiovascular, respiratório e a termoregulação e funções comportamentais que incluem o ritmo circadiano, ciclo sono-vigília, comportamento sexual, reatividade sensoriomotora, agressividade, sensibilidade à dor, aprendizado e apetite (Lucki, 1998). No que tange às projeções serotonérgicas do MR, observa-se que alcançam diversas estruturas como, por exemplo, o hipocampo e a amígdala, que estão envolvidas no controle da ansiedade (Nunes-de-Souza, Canto-de-Souza e Rodgers 1999; Nunes-de-Souza et al., 2000) e

outras como o núcleo accumbens e núcleos hipotalâmicos, que atuam na regulação do comportamento ingestivo (Prat et al., 2009).

O núcleo MR é a região encefálica com a mais alta densidade de receptores 5-HT_{1A} (Kia et al., 1996; Cryan et al., 2002; Adell et al., 2002; Judge e Gartside, 2006). Os receptores 5-HT_{1A} encontrados no MR funcionam como autoreceptores somatodendríticos que regulam a síntese e a liberação serotoninérgica (Hall et al., 1997; Adell et al., 2002; Hensler, 2006), sendo que injeções do agonista do receptor 5-HT_{1A}, 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT), no MR, inibem o disparo de células serotoninérgicas e reduzem a liberação de 5-HT para áreas de projeção (Bonvento et al., 1992; Andrews et al., 1994; Currie, Fletcher e Coscina, 1994; Avanzi e Brandão, 2001; Funk et al., 2005). A injeção de 8-OH-DPAT no MR diminui a liberação de 5-HT ao hipotálamo medial (Fletcher e Coscina, 1993), além de causar hiperfagia (Currie, Fletcher e Coscina, 1994). Em estudo de microdiálise, a injeção de 8-OH-DPAT no MR diminuiu a liberação de 5-HT no hipocampo (-41%) (Bonvento et al., 1992) e apresentou efeito ansiolítico em testes de ansiedade (Andrews et al., 1994; Avanzi e Brandão, 2001).

A quantidade extracelular de múltiplos neurotransmissores, incluindo além da 5-HT e noradrenalina (NA), a dopamina, histamina, glutamato, ácido gama-aminobutírico, glicina, óxido nítrico e também neuropeptídeos, pode influenciar a ação dos neurônios serotoninérgicos no MR (Piñeyro e Blier, 1999; Adell et al., 2002). O MR recebe densa inervação noradrenérgica originada do locus ceruleus (LC), área tegmentar lateral, núcleos pontinos e outros núcleos catecolaminérgicos próximos (Peyron et al., 1996; Hopwood e Stamford, 2001; Adell et al., 2002), além de neurônios serotoninérgicos deste núcleo possuírem receptores adrenérgicos, enzimas sintetizadoras, degradadoras e transportadoras de NA (Peyron et al., 1996; Hoopwood e Stamford, 2001; Adell et al., 2002). Entre os receptores adrenérgicos- α , há níveis altos de receptores α_1 e moderados de α_2 no MR (Adell e Artigas, 1999). As aferências noradrenérgicas ao MR facilitam a liberação de 5-HT deste núcleo por meio de receptores adrenérgicos- α_1 e inibem a liberação de 5-HT via receptores adrenérgicos- α_2 (Adell e Artigas, 1999; Adell et al., 2002). Todavia, as informações sobre a função dos receptores adrenérgicos α_1 e α_2 na regulação da liberação de 5-HT do MR são limitadas (Adell e Artigas, 1999).

Estudos prévios em nosso laboratório revelaram que a injeção de adrenalina (AD) no MR de ratos submetidos à restrição alimentar diminuiu o consumo de ração e a duração do comportamento de

ingestão de alimento, resultados que não ocorreram quando a NA foi injetada no mesmo núcleo (Maidel et al., 2007). Por outro lado, a injeção de AD no MR de ratos saciados aumentou o consumo de ração, aumentou a frequência de exibição do comportamento alimentar e diminuiu a latência para iniciar esse comportamento (dos Santos et al., 2009). Nos animais em restrição alimentar, a hipofagia induzida pela AD pode ter sido causada pela ativação de receptores adrenérgicos- α_1 em neurônios serotonérgicos do MR, resultando na liberação de 5-HT e na ação inibitória indireta da AD sobre a alimentação (Maidel et al., 2007). Nos animais saciados, o efeito das injeções de AD no consumo de alimento pode ser atribuído à ativação de receptores adrenérgicos- α_2 em neurônios serotonérgicos do MR, suprimindo a liberação de 5-HT e sua ação inibitória sobre o comportamento alimentar (dos Santos et al., 2009).

É importante notar que há similaridades entre os efeitos alimentares causados pelas injeções de AD e 8-OH-DPAT no MR. Observou-se hipofagia em animais em restrição alimentar e hiperfagia em animais saciados após o tratamento com 8-OH-DPAT no MR (Schwartz et al., 2000; Ebenezer, Arkle e Tite, 2007; López-Alonso et al., 2007). A hiperfagia induzida pelo 8-OH-DPAT foi atribuída à ativação dos autoreceptores somatodendríticos encontrados no MR, inibindo a atividade de neurônios serotonérgicos e reduzindo a síntese e liberação de 5-HT em áreas terminais prosencefálicas (Currie e Coscina, 1993). Estes dados sugerem o envolvimento dos receptores adrenérgicos- α do MR no controle da ingestão de alimento e que este comportamento, induzido pela ativação de receptores adrenérgicos do MR, pode estar relacionado ao controle da liberação de 5-HT em estruturas de projeção do MR.

Em se tratando de receptores adrenérgicos- β , os receptores β_2 também estão envolvidos no controle do sistema serotonérgico central (Waldmeier, 1981; Hallberg, 1986; Bloom, 1996). A administração intraventricular de agonistas adrenérgicos- β_2 aumenta a liberação de 5-HT no tronco encefálico de ratos *in vivo* (Waldmeier, 1981). Assim, sugere-se também que a hipofagia observada após a injeção de AD em estudo prévio, pode estar relacionada com a ativação de receptores adrenérgico- β_2 no MR, visto que doses equimolares de NA, não modificaram a ingestão de alimento nos animais (Maidel et al., 2007).

Em nível neuroquímico, desordens de ansiedade e alimentares têm em comum várias anormalidades no sistema de 5-HT e outros neurotransmissores (Brewerton, 1995), além disso, projeções

serotonérgicas do MR se conectam a estruturas envolvidas nos comportamentos relacionados à ansiedade (Nunes-de-Souza, Canto-de-Souza e Rodgers 1999; Nunes-de-Souza et al., 2000) e ingestão de alimento (Prat et al., 2009). É importante enfatizar que os receptores adrenérgicos são responsáveis por efeitos biológicos diversos (Philipp e Hein, 2004). Considerando a densa inervação noradrenérgica ao MR (Hopwood e Stamford, 2001; Adell et al., 2002), a NA pode determinar a frequência de disparo de neurônios serotonérgicos do MR e, por conseguinte, as respostas comportamentais causadas pela 5-HT, conforme o tipo de receptor adrenérgico ativado (Mongeau, Blier e Montigny, 1997; Deakin, 1998). Tendo em vista a relevância dos circuitos adrenérgicos na regulação dos comportamentos de ansiedade e ingestão de alimento e sua interação com o sistema serotonérgico no MR, foi elaborado o seguinte questionamento: Quais os efeitos da injeção de agonistas e antagonistas adrenérgicos- α e de agonista adrenérgico- β no núcleo MR sobre comportamentos relacionados à ansiedade e ingestão de alimento em ratos?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da injeção de agonistas e antagonistas adrenérgicos- α e de agonista adrenérgico- β no núcleo MR sobre comportamentos relacionados à ansiedade e ingestão de alimento em ratos (Wistar) saciados.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da ativação adrenérgica- α_1 no núcleo MR, sobre comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado e ingestivos e não-ingestivos na caixa de registro comportamental.
- Avaliar os efeitos da ativação adrenérgica- α_2 no núcleo MR, sobre os comportamentos supracitados.
- Avaliar os efeitos da ativação adrenérgica- β_2 no núcleoMR, sobre os comportamentos supracitados.
- Avaliar os efeitos da inibição adrenérgica- α_1 no núcleo MR, sobre os comportamentos supracitados.
- Avaliar os efeitos da inibição adrenérgica- α_2 no núcleo MR, sobre os comportamentos supracitados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 268 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com massa corporal entre 250-290 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm) forradas com maravalha, contendo cinco ratos em cada caixa e dispondo de água e alimento granulado (CR-1 Nuvilab) *ad libitum*. Foram submetidos a sete dias de adaptação ao novo ambiente, em uma sala com temperatura controlada entre $21 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12 horas (luz das 7 - 19h) e manipulados nesse período somente durante a limpeza das caixas, três vezes por semana.

Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e o protocolo de experimentação submetido à apreciação do Comitê de Ética ao Uso de Animais (CEUA) da UFSC, aprovado sob o número PP00134.

3.2 Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (13 mg kg^{-1}) e cetamina (87 mg kg^{-1}) injetada por via intraperitoneal (i.p.) e, em seguida, adaptados ao aparelho estereotáxico (Figura 1A), tendo a cabeça fixada no focinho e por intermédio de barras posicionadas no conduto auditivo. Após a tricotomia na região entre o Bregma e o Lâmbda, uma incisão longitudinal foi realizada no escalpo de forma a expor a calota craniana. O periósteo foi removido e a região exposta do crânio foi limpa com água oxigenada (10 vol). Com o auxílio de uma broca ortodôntica (n^o 6) foi feito um orifício na calota craniana e colocado um parafuso (do tipo relojoeiro) para fixação do acrílico autopolimerizável. A seguir, uma cânula-guia (30 G) com 18 mm de comprimento, confeccionada a partir de um segmento de agulha hipodérmica, foi posicionada 2 mm acima da região do núcleo MR, em ângulo de 20° , a fim de evitar a passagem pelo seio sagital superior e pelo aqueduto cerebral. As coordenadas usadas, de acordo com Paxinos e Watson (2007), foram: AP (ântero-posterior), 7,8 mm posterior ao Bregma; L (lateral), 3,0 mm lateral à sutura sagital; DV (dorso-ventral), 7,0 mm abaixo da dura máter (Figura 1B). A cânula-guia foi envolvida

parcialmente por acrílico auto-polimerizável para sua fixação na calota craniana.

No término do procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em local aquecido até a recuperação da anestesia e, posteriormente, levados para o biotério do laboratório e alojados individualmente nas caixas de polipropileno. Neste local permaneceram sob temperatura e luminosidade controladas, com água e ração *ad libitum*, recebendo acompanhamento diário durante sete dias e manipulados somente durante a limpeza das caixas. Após esse período, os experimentos no labirinto em cruz elevado (LCE) e na caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos foram iniciados.



Figura 1A. Aparelho estereotático.

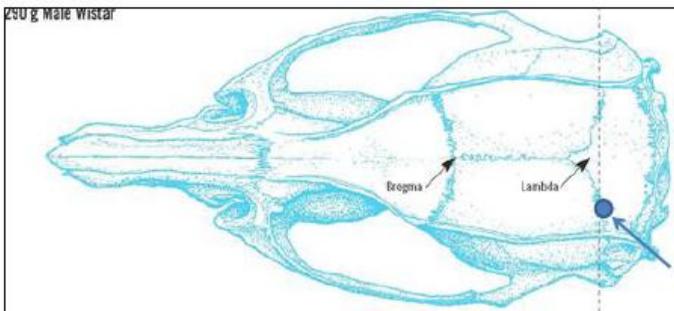


Figura 1B. Local aproximado (apontado pela seta) do orifício feito para atingir o MR.

3.3 Soluções e Doses Injetadas

As seguintes drogas e doses foram utilizadas:

- Veículos: solução de NaCl 0,9%, estéril, livre de pirogênios e pH 7,4 (salina, SAL) e SAL misturada com propileno glicol (SPG, 2/1 v/v).
- Agonistas adrenérgicos (SIGMA): α_1 (cloridrato de fenilefrina, FEN), α_2 (hidrocloro de clonidina, CLO) e β_2 (sulfato de terbutalina, TER) nas doses de 0,2; 2; 6 e 20 nmol.
- Antagonistas adrenérgicos (SIGMA): α_1 (hidrocloro de prazosin, PRA) e α_2 (hidrocloro de ioimbina, YOH) na dose de 40 nmol.

3.4 Injeções Intracerebrais

A injeção intracerebral do veículo e das drogas foi realizada por meio de uma agulha injetora (33 G), excedendo 2 mm o comprimento da cânula-guia e conectada por um tubo de polietileno a uma seringa Hamilton (capacidade de 1 μ l). A agulha injetora foi introduzida na cânula-guia para as injeções intracerebrais. Com o objetivo de minimizar variações na pressão intracerebral, as soluções foram injetadas durante 2 min, com volume de 200 nl para qualquer condição de tratamento.

3.5 Registro dos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado.

O LCE (Figura 2) é constituído por duas passarelas de madeira dispostas perpendicularmente, formando, assim, uma cruz simétrica. Cada um dos quatro braços possui 50 cm de comprimento por 10 cm de largura. Dois braços opostos são fechados por paredes laterais de vidro fumê de 40 cm de altura, enquanto os outros dois braços são abertos, circundados por uma pequena borda de acrílico (1 cm) para reduzir a ocorrência de quedas. Na junção entre os quatro braços delimita-se uma área central de 100 cm². O labirinto como um todo é elevado a 50 cm do solo. Quatro lâmpadas fluorescentes (15 W cada) dispostas igualmente em forma de cruz, 100 cm acima do labirinto, foram utilizadas como fonte de iluminação do experimento. Essas lâmpadas forneceram diferentes médias de luminosidade incidentes nos braços abertos (373

Lux) e fechados (284 Lux), obtendo o gradiente de luminosidade de 89 Lux entre os braços abertos e fechados do labirinto (Sakae et al., 2008).

Para o experimento, cada animal foi colocado no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados, deixando-o explorar o LCE durante um período de 5 minutos (min). Após cada exposição ao LCE, o mesmo foi limpo com tecido umedecido em uma solução de álcool 20% para evitar pistas odoríferas. A eventual queda de um rato do labirinto implicou necessariamente na sua exclusão do estudo. Os comportamentos foram filmados por meio de uma web cam e analisados posteriormente com o Programa Etholog 2.25 (Ottoni, 2000).

A análise comportamental foi realizada considerando-se as variáveis espaço-temporais tradicionais (Pellow et al., 1985): porcentagem de entradas nos braços abertos (% EA), número de entradas nos braços fechados (EF), total de entradas (TE), porcentagem do tempo (em segundos) de permanência nos braços abertos (% TA). Para o cálculo das porcentagens (% EA e % TA) utilizou-se a regra de três simples: % EA = total de EA x 100 ÷ pelo total de entradas (TE = EA + EF); % TA = TA x 100 ÷ por 300 segundos (total de segundos em 5 minutos).

Além da análise espaço-temporal, foi realizada a análise etológica envolvendo a avaliação da frequência dos comportamentos a seguir:

- Avaliação de risco (AR): Movimento no qual o animal investiga em sua volta com as patas traseiras fixas e as dianteiras se movem e retornam à posição original, com a cabeça observando ao redor (Setem et al., 1999). Neste estudo, a AR será identificada pelo movimento chamado *stretched attend posture* (SAP). O SAP é um tipo de AR em que o animal alonga seu corpo ao mover as patas dianteiras (Rodgers e Johnson, 1995).

- Auto-limpeza (AL): Ato de limpar qualquer parte da superfície corporal com a língua, dentes e/ou patas dianteiras (Setem et al., 1999).

- Exploração vertical (EV): Quando o animal estiver explorando o ambiente e elevar o corpo estando apoiado somente nas patas traseiras (Setem et al., 1999).

- Imersão da cabeça (IC): Movimento de projeção da cabeça para fora e para baixo dos braços abertos (Setem et al., 1999).



Figura 2. Labirinto em cruz elevado.

3.6. Registro dos Comportamentos Ingestivos e Não-ingestivos

A caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos (Figura 3) é constituída por vidro transparente de 4 mm de espessura, possuindo as medidas do comprimento e da largura iguais aos da caixa de hospedagem (49 x 34 cm) e a medida da altura maior (40 cm) para evitar fugas. O chão da caixa e três paredes laterais são cobertos com plástico adesivo preto, permanecendo uma parede lateral da caixa com vidro transparente na qual está apoiado um espelho, posicionado em uma angulação que impede o animal de visualizar sua imagem refletida durante o experimento, mas que possibilita a visualização lateral do seu comportamento.

Cada experimento na caixa de registro alimentar teve duração de 30 min, sendo que após cada exposição, a caixa foi limpa com tecido umedecido em uma solução de álcool 20% para evitar pistas odoríferas. Os comportamentos foram filmados por meio de uma web cam e analisados posteriormente com o Programa Etholog 2.25 (Ottoni, 2000).

Na caixa de registro alimentar foram analisados comportamentos ingestivos e não-ingestivos. Os comportamentos ingestivos foram a ingestão de alimento e a ingestão de água. Estes comportamentos foram avaliados quanto à:

- **Quantidade:** Mensurada quanto à diferença entre a quantidade de ração (g) e/ou água (ml) ingeridas entre o início e o término do registro (30 min).

- **Latência:** Tempo, em segundos (s), para iniciar a ingestão de alimento e/ou água.

- **Duração:** Tempo de duração, em segundos (s), da ingestão de alimento e/ou água.

- **Frequência:** Número de vezes em que foi realizada a ingestão de alimento e/ou água.

Os comportamentos não-ingestivos listados a seguir foram analisados quanto à duração (s), exceto a AR, que foi analisada somente quanto à frequência (a AL, AR e EV foram analisadas também na caixa de registro alimentar como comportamentos não-ingestivos e estão definidos no item 3.5):

- **Exploração do alimento (EXALI):** É quando o animal cheira ou manipula a ração, sem ingeri-la (Halford, Wanninayake e Blundell, 1998).

- **Imobilidade (IM):** É quando o animal permanece imóvel, em postura de relaxamento, com a cabeça curvada ao corpo ou apoiada na caixa, sem apresentar qualquer outro comportamento já citado (Halford, Wanninayake e Blundell, 1998).

- **Locomoção (LOC):** É o ato de se deslocar, deambular pela caixa experimental (Halford, Wanninayake e Blundell, 1998).

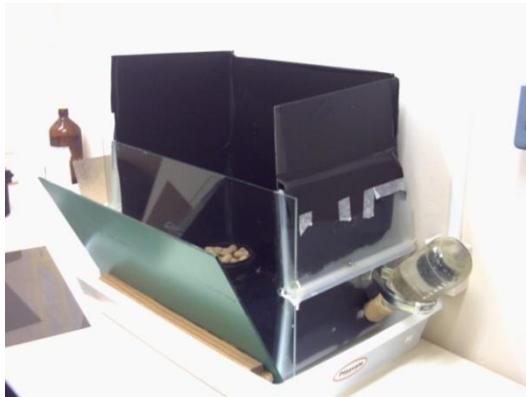


Figura 3. Caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos.

3.7 Procedimentos Experimentais

O início dos procedimentos experimentais ocorreu com a chegada dos animais provenientes do biotério da UFSC ao nosso laboratório, local em que foram alojados em caixas apropriadas (item 3.1). Após sete dias de adaptação e cuidados (item 3.1), os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação da cânula-guia no núcleo MR (item 3.2). Decorrido o período de recuperação cirúrgica (item 3.2), cada animal recebeu injeções locais (item 3.4) de veículo ou drogas (item 3.3). Em seguida à injeção, foram submetidos durante 5 min aos experimentos no LCE (item 3.5) e, imediatamente depois do registro de ansiedade, colocados durante 30 min na caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos (item 3.6). Os experimentos foram realizados entre 12:00 hs e 14:00 hs. Os animais não foram ambientados aos modelos comportamentais. Foi usado um animal para cada tratamento. Abaixo, está descrito o número de animais em cada grupo experimental. É importante dizer que em alguns casos, aleatoriamente a cânula-guia foi implantada no núcleo pontino (Pn) e na formação reticular mesencefálica (FRm), formando-se grupos experimentais em áreas vizinhas ao MR.

Experimento com os agonistas

- **No núcleo MR:** Foi realizado para avaliar os efeitos das injeções de CLO, FEN e TER no MR sobre os comportamentos relacionados à ansiedade e também sobre comportamentos ingestivos e não-ingestivos. Durante o experimento, os ratos foram tratados no MR com: **grupo do agonista α_1 :** FEN nas doses de 0,2 nmol (n=7), 2 nmol (n=6), 6 nmol (n=6), 20 nmol (n=7) e veículo (SAL, n=6); **grupo do agonista α_2 :** CLO nas doses de 0,2 nmol (n=6), 2 nmol (n=6), 6 nmol (n=6), 20 nmol (n=8) e veículo (SAL, n=6); **grupo do agonista β_2 :** TER nas doses de 0,2 nmol (n=6), 2 nmol (n=8), 6 nmol (n=6), 20 nmol (n=8) e veículo (SAL, n=6).

- **Em áreas vizinhas ao núcleo MR:** As doses efetivas verificadas pelo tratamento no MR, que alteraram a resposta comportamental, foram injetadas em áreas vizinhas a este núcleo, como no Pn e/ou na FRm, a fim de confirmar se a ação da FEN, CLO e TER sobre os comportamentos relacionados à ansiedade e ingestão de alimento era específica ao sítio de injeção da droga. Nesses experimentos, os ratos foram tratados no Pn com: **grupo do agonista α_1 :** FEN nas doses de 0,2 nmol (n= 5), 2 nmol (n=5), 6 nmol (n= 5), 20 nmol (n= 6) e veículo (SAL, n= 8); **grupo do agonista α_2 :** CLO nas

doses de 0,2 nmol (n= 8), 20 nmol (n= 14) e veículo (SAL, n= 8); **grupo do agonista β_2** : TER nas doses de 0,2 nmol (n=5), 2 nmol (n=4), 6 nmol (n=7), 20 nmol (n=5) e veículo (SAL, n=8). Na FRm, os tratamentos foram somente com CLO nas doses de 0,2 nmol (n= 8), 20 nmol (n= 9) e veículo (salina, n= 4).

Experimento com os antagonistas

• **Somente no núcleo MR**: A injeção do antagonista adrenérgico α_1 , PRA, foi realizada para bloquear a influência tônica excitatória da FEN sobre receptores adrenérgicos- α_1 de neurônios serotoninérgicos no MR, a qual sugerimos ser elevada em ratos alimentados. O antagonista de receptores adrenérgicos- α_2 , YOH, foi usado para bloquear a influência adrenérgica inibitória da CLO sobre receptores adrenérgicos- α_2 de neurônios serotoninérgicos no MR, a fim de impedir o efeito hiperfágico da CLO e reforçar que este resultado é especificamente mediado por meio de receptores- α_2 . Para tanto, em cada experimento com os antagonistas foram feitas duas injeções: a primeira de veículo ou do antagonista e, após 15 min, a segunda injeção, de veículo ou do agonista. A dose dos antagonistas utilizada foi de 40 nmol e escolhida com base no estudo de Yada et al. (1997). Para compor o grupo do antagonista α_1 , foi eleita a menor dose efetiva de FEN (0,2 nmol) obtida a partir do experimento com o grupo do agonista α_1 . Para o grupo do antagonista α_2 , utilizaram-se as doses efetivas da CLO (0,2 nmol e 20 nmol). Os ratos foram tratados no MR com: **grupo do antagonista α_1** : PRA-SAL (n= 7), PRA-FEN (n= 6), SPG-FEN (n= 7) e SPG-SAL (n= 7); **grupo do antagonista α_2** : YOH-SAL (n= 6), YOH-CLO 0,2 (n= 8), YOH-CLO 20 (n= 6), SPG-CLO 0,2 (n=6), SPG-CLO 20 (n= 7) e SPG-SAL (n=7).

3.8 Perfusão e Histologia

No dia seguinte ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e uma agulha foi colocada no ventrículo esquerdo para ser realizada a perfusão com solução salina 0,9% seguida de formalina 10%. A injeção de 200 nl de azul de Evans no local da injeção facilitou a identificação do ponto de injeção das drogas. Depois de dissecados, os cérebros permaneceram imersos em formalina 10% por um período de sete dias, sendo posteriormente cortados de forma seriada em secções de 100 μ m de espessura por um vibrátomo. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e deixados até secar, em torno de mais sete dias. Após este período, foram coradas pelo método de Nissl (método que utiliza o

cresil violeta, um corante básico para evidenciar o citoplasma de neurônios) e permaneceram secando por igual período antes de serem analisadas ao microscópio óptico. A reprodução gráfica dos cortes e dos pontos de injeção analisados ao microscópio foi realizada com o auxílio do atlas de Paxinos e Watson (2007).

3.9 Análise dos Dados

Experimentos com os agonistas: Os efeitos do tratamento com salina (0) e dos agonistas FEN, CLO e TER nas doses de 0,2; 2; 6; 20 nmol, injetados no MR sobre os comportamentos relacionados à ansiedade e comportamentos ingestivos e não-ingestivos, foram analisados separadamente por intermédio da análise de variância (ANOVA) de uma via. Os efeitos do tratamento com salina (0), FEN, CLO e TER injetados nos núcleos MR, Pn e FRm sobre os comportamentos relacionados à ansiedade e comportamentos ingestivos e não-ingestivos, foram analisados separadamente por meio da ANOVA de duas vias (dose da droga x área injetada). As doses dos agonistas no experimento com núcleos vizinhos ao MR foram as doses efetivas obtidas com o experimento anterior (somente no MR): FEN nas doses de 0,2; 2; 6 e 20 nmol injetadas nos núcleos MR e Pn; CLO nas doses de 0,2 e 20 nmol injetadas nos núcleos MR, Pn e FRm; TER nas doses de 0,2; 2; 6 e 20 nmol injetadas nos núcleos MR e Pn.

Experimentos com os antagonistas: Os efeitos do tratamento com veículo (SPG) ou do antagonista (PRA ou YOH, na dose de 40 nmol), seguido da injeção de veículo (SAL) ou do agonista (FEN na dose de 0,2 nmol ou CLO nas doses de 0,2 e 20 nmol) no MR sobre os comportamentos relacionados à ansiedade e comportamentos ingestivos e não-ingestivos, foram analisados separadamente por intermédio da análise de variância (ANOVA) de uma via.

A análise prévia dos parâmetros avaliados neste estudo mostrou que todos possuem distribuição normal. Para a análise da homogeneidade da amostra foi realizado o teste de Levene e Brown & Forsythe. Quando apropriado, as análises de variância foram seguidas pelo teste de Duncan para múltiplas comparações. Nos casos de variáveis não-homogêneas, as possíveis diferenças entre os tratamentos foram analisadas pela ANOVA não-paramétrica de Kruskal-Wallis (K-W), seguido pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Somente os valores de probabilidade (p) menores do que 5% foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

A Figura 4 ilustra uma seqüência de cortes coronais de áreas atingidas pelas injeções dos agonistas e antagonistas adrenérgicos- α_1 e α_2 e do agonista adrenérgico- β_2 no núcleo MR e em áreas adjacentes como o núcleo Pn ou a FRm.

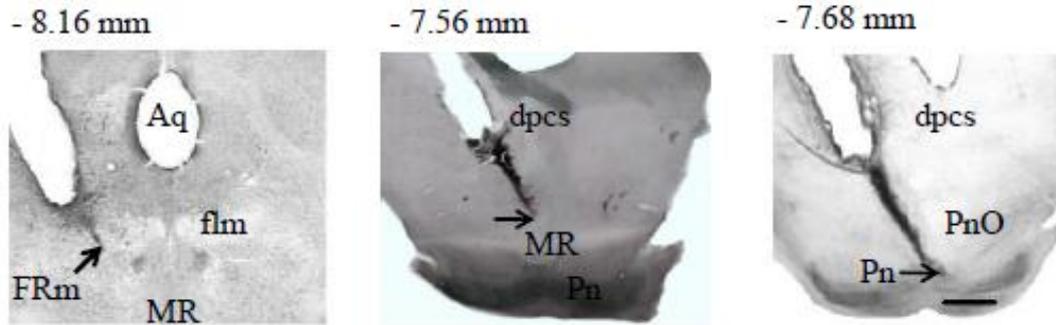


Figura 4. Fotos de seções coronais através da formação reticular mesencefálica (FRm), núcleo mediano da rafe (MR) e núcleo pontino (Pn). As setas nas fotos apontam os sítios de injeção. Os números acima dos desenhos se referem às coordenadas estereotáxicas anteroposteriores. Barra de escala = 100 μ m; flm = fascículo longitudinal medial; Aq = aqueduto; dpcs = decussação do pedúnculo cerebelar superior; PnO = núcleo pontino, parte oral.

4.1 Injeção do Agonista Adrenérgico α_1 (FEN)

A análise histológica mostrou que 32 pontos de injeção com FEN ou salina alcançaram o núcleo MR, enquanto 29 foram encontrados no núcleo Pn.

Efeitos das diferentes doses de FEN injetadas no núcleo MR sobre os comportamentos relacionados à ansiedade:

A ANOVA de uma via mostrou que houve alteração significativa na frequência de exibição do comportamento de AR após o tratamento com diferentes doses de FEN no núcleo MR de ratos saciados, durante a exposição ao LCE ($F_{4,27} = 3,06$; $p = 0,033$). A frequência de exibição do comportamento de AR reduziu após a injeção de todas as doses de FEN no MR quando comparada ao grupo controle (Figura 5A). As variáveis espaço-temporais (% EA, % TA, EF e TE) e os outros comportamentos etológicos relacionados à ansiedade (AL, EV, IC) e avaliados durante a permanência no LCE não foram afetados pelo tratamento com FEN no MR (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos do tratamento com salina (SAL) ou fenilefrina (FEN, nmol) no núcleo mediano da rafe sobre variáveis espaço-temporais e etológicas, durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado.

Variáveis	SAL (6)	FEN 0,2 (7)	FEN 2 (6)	FEN 6 (6)	FEN 20 (7)	ANOVA
% Entrada nos braços abertos	34,9±9,3	21,3±5,7	34,6±13,5	27,7±4,9	30,6±6,3	$F_{4,27} = 0,47$
% Tempo nos braços abertos	16,9±4,3	6,0±2,2	18,5±8,2	9,7±2,0	12,8±2,8	$F_{4,27} = 1,77$
Entrada nos braços fechados	5,7±1,4	7,7±1,9	6,3±1,5	5,8±1,1	7,4±1,9	$F_{4,27} = 0,26$
Total de entradas	9,8±2,6	10,0±2,5	9,9±1,9	7,8±1,1	10,7±2,5	$F_{4,27} = 0,12$
Auto-limpeza	2,5 ± 0,6	1,6± 0,4	3,7± 0,0	3,3± 0,8	1,3± 0,6	$F_{4,27} = 2,61$
Exploração vertical	9,8± 0,8	12,0±2,3	12,5±2,1	11,0±1,9	9,6±2,3	$F_{4,27} = 0,41$
Imersão da cabeça	8,2±2,8	9,6±2,6	12,2±1,9	9,5±2,1	10,0±1,4	$F_{4,27} = 0,40$

Os valores são média ± EPM. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de p não significantes.

Efeitos das diferentes doses de FEN injetadas no núcleo MR sobre os comportamentos ingestivos e não-ingestivos:

A ANOVA de uma via apontou que houve alteração significativa na frequência de exibição do comportamento de AR após o tratamento com diferentes doses de FEN no núcleo MR de ratos saciados, durante o registro do comportamento ingestivo ($F_{4,27} = 2,91$; $p = 0,04$). A frequência de exibição do comportamento de AR foi menor do que a observada no grupo controle após a injeção de todas as doses de FEN no MR (Figura 5B). A quantidade de ração ou água ingerida, a latência para iniciar a ingestão de ração ou água, a frequência de exibição e a duração de ambos os comportamentos ingestivos não foram afetados pelo tratamento com FEN no MR. A ANOVA de uma via também mostrou alteração significativa na duração da AL após o tratamento com FEN no MR, durante o registro do comportamento alimentar (Tabela 2). A duração desse comportamento após a injeção de 6 nmol de FEN no MR foi menor do que a observada no grupo controle (Tabela 2). As durações dos outros comportamentos não-ingestivos avaliados (EXALI, EV, IM e LOC) não foram alterados pelo tratamento com FEN no MR (Tabela 2).

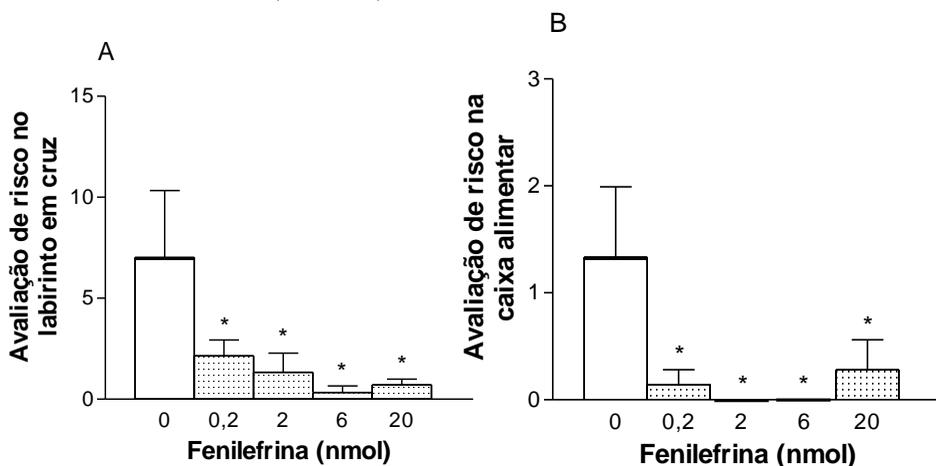


Figura 5. Alterações na frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco após o tratamento com salina (0, n=6) ou fenilefrina (FEN) nas doses de 0,2 nmol (n=7), 2 nmol (n=6), 6 nmol (n=6) e 20 nmol no núcleo mediano da rafe (MR). Os valores são média \pm EPM da exibição do comportamento durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado (A) e durante 30 min na caixa de registro do comportamento alimentar (B). * $p < 0,05$ em relação à salina. ANOVA de uma via e teste de Duncan.

Tabela 2. Efeitos do tratamento com salina (SAL) ou fenilefrina (FEN) no núcleo mediano da rafe sobre a duração (s) de variáveis não-ingestivas em ratos saciados, durante 30 min de registro.

Variáveis	SAL (6)	FEN 0,2 (7)	FEN 2 (6)	FEN 6 (6)	FEN 20 (7)	ANOVA
Auto-limpeza	328,9±51,2	203,6±72,2	400,5±24,5	110,1±16,2*	198,3±73,2	F _{4,27} = 3,96*
Exploração do alimento	176,1±69,2	266,1±169,5	85,5±13,4	78,3±22,4	168, ±40,0	F _{4,27} = 0,72
Exploração vertical	68,0 ±23,2	151,4±66,9	138, ±16,1	106,4±16,4	175,5±64,1	F _{4,27} = 0,76
Imobilidade	430,4±162,7	206,9±131,5	66,6±20,3	237,2±65,6	150,7±30,8	K-W _{4,32} = 8,48
Locomoção	157,0 ±40,0	114,9±22,3	95,3±9,5	73,0 ±11,4	116,8±38,0	K-W _{4,32} = 3,86

Os valores são média ± EPM. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de *p* não significantes, exceto em *.

As doses efetivas de FEN (0,2; 2; 6 e 20 nmol) que causaram **alterações comportamentais após o tratamento no núcleo MR foram injetadas no núcleo Pn**, região vizinha ao MR. Nenhuma das doses de FEN injetadas no Pn causou alteração nas variáveis etológicas ou espaço-temporais avaliadas no LCE, assim como nos comportamentos ingestivos e não-ingestivos.

4.2 Injeção do Agonista Adrenérgico α_2 (CLO)

A análise histológica mostrou que 30 pontos de injeção de CLO ou salina alcançaram o núcleo MR, enquanto 30 foram encontrados no núcleo Pn e 21 na FRm.

Efeitos das diferentes doses de CLO injetadas no núcleo MR sobre os comportamentos relacionados à ansiedade:

A ANOVA de uma via demonstrou que houve alteração significativa na frequência de exibição do comportamento de AR após o tratamento com diferentes doses de CLO no núcleo MR de ratos saciados, durante a exposição ao LCE (F_{4,27} = 11,80; *p* = 0,00001). Enquanto a frequência de exibição do comportamento de AR aumentou estatisticamente após o tratamento com a dose de 20 nmol de CLO no MR, este comportamento diminuiu em relação ao controle após a injeção da dose de 0,2 nmol de CLO no mesmo núcleo (Figura 6). As variáveis espaço-temporais e os outros comportamentos etológicos relacionados à ansiedade no LCE não foram afetados pelo tratamento com CLO no MR (Tabela 3).

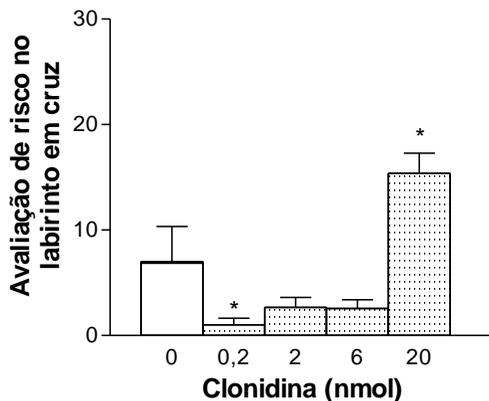


Figura 6. Alterações na frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco após o tratamento com salina (0, n=6) ou clonidina (CLO) nas doses de 0,2 nmol (n=6), 2 nmol (n=6), 6 nmol (n=6) e 20 nmol (n=8) no núcleo mediano da rafe. Os valores são média ± EPM da exibição do comportamento durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado. * $p < 0,05$ em relação à salina. ANOVA de uma via e teste de Duncan.

Tabela 3. Efeitos do tratamento com salina (SAL) ou clonidina (CLO, nmol) no núcleo mediano da rafe sobre variáveis espaço-temporais e etológicas, durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado.

Variáveis	SAL (6)	CLO 0,2 (6)	CLO 2 (6)	CLO 6 (6)	CLO 20 (8)	ANOVA
% Entrada nos braços abertos	34,9±9,3	41,8±4,5	33,9±7,9	34,8±5,3	43,6±7,3	$F_{4,27} = 0,42$
% Tempo nos braços abertos	23,1±7,7	22,9±3,7	12,0±5,5	15,7±4,2	20,0±3,9	$F_{4,27} = 0,83$
Entrada nos braços fechados	5,7±1,4	8,2±1,0	4,7±1,4	8,5± 0,9	5,9±1,3	$F_{4,27} = 1,70$
Total de entradas	9,8±2,6	13,8±1,1	8,0 ±2,7	13,3±1,5	10,4±1,7	$F_{4,27} = 1,46$
Auto-limpeza	2,5 ± 0,5	2,8± 0,9	2,0± 0,7	1,5 ±0,6	3,9±1,0	$F_{4,27} = 1,29$
Exploração vertical	9,8± 0,8	11,7±1,7	9,8±2,2	15,3±2,3	9,5 ±1,7	$F_{4,27} = 1,74$
Imersão da cabeça	8,2±2,1	15,8±1,6	8,7±2,7	9,3±2,9	11,6±1,5	$F_{4,27} = 1,74$

Os valores são média ± EPM. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de p não significantes.

Efeitos das diferentes doses de CLO injetadas no núcleo MR sobre os comportamentos ingestivos e não-ingestivos:

A ANOVA de uma via indicou que ocorreu alteração estatística sobre o consumo de alimento ($F_{4,27} = 4,47$; $p = 0,006$), a latência para iniciar a resposta de consumo de ração ($F_{4,27} = 4,47$; $p = 0,006$) e a frequência do consumo de ração ($F_{4,27} = 4,40$; $p = 0,007$) após o tratamento com diferentes doses de CLO no núcleo MR de ratos saciados, durante 30 min de registro comportamental. O tratamento com a dose de 20 nmol de CLO no MR induziu hiperfagia quando comparada com o controle, todavia, o consumo de ração permaneceu inalterado após a injeção das outras doses no MR (Figura 7A). A resposta hiperfágica promovida pela maior dose de CLO foi acompanhada por redução na latência para iniciar o consumo de ração e aumento na frequência de exibição desse comportamento. A latência para iniciar o consumo de ração e a frequência do consumo de ração não foram afetadas pela administração das demais doses de CLO (Figuras 7B e 7C). A duração do consumo de ração não foi afetada por nenhuma das doses de CLO (Figura 7D). Nenhuma das doses de CLO administradas no MR alterou o consumo de água e os comportamentos não-ingestivos (Tabela 4).

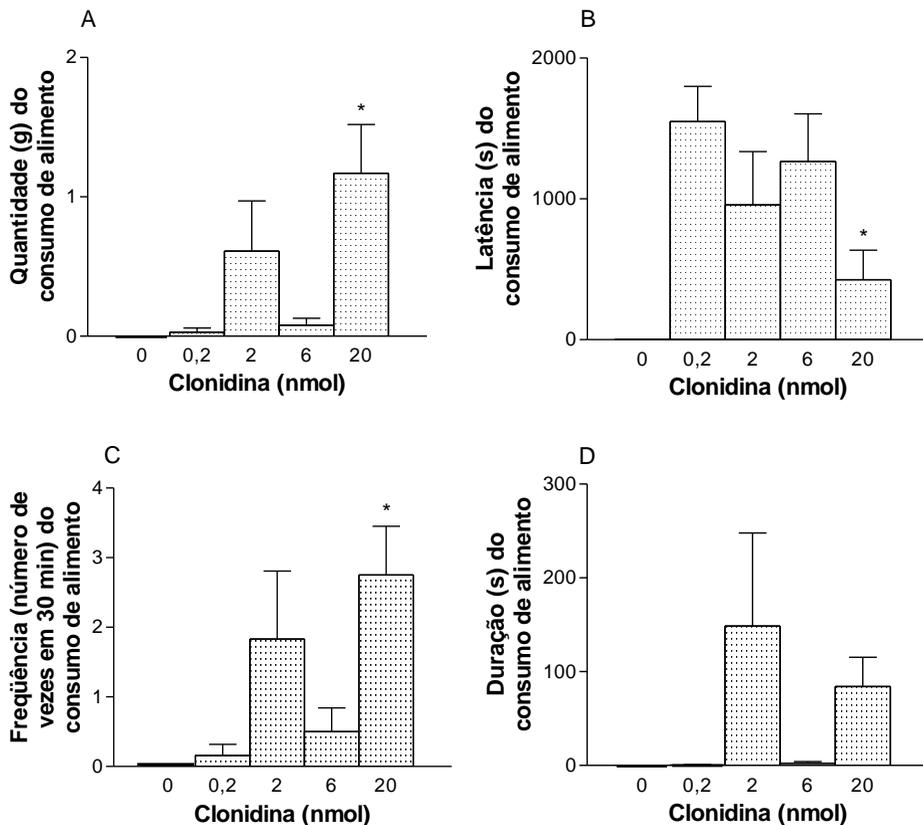


Figura 7. Alterações na quantidade, latência, frequência e duração do consumo de alimento, após o tratamento com salina (0, n=6) ou clonidina nas doses de 0,2 nmol (n=6), 2 nmol (n=6), 6 nmol (n=6) e 20 nmol (n=8) no núcleo mediano da rafe de ratos saciados. Os valores são média \pm EPM da exibição do comportamento durante 30 min de registro na caixa alimentar. * $p < 0,05$ em relação à salina. ANOVA de uma via e teste de Duncan.

Tabela 4. Efeitos do tratamento com salina (SAL) ou clonidina (CLO, nmol) no núcleo mediano da rafe sobre a duração (s) de variáveis não-ingestivas em ratos saciados, durante 30 min de registro.

Variáveis	SAL (6)	CLO 0,2 (6)	CLO 2 (6)	CLO 6 (6)	CLO 20 (8)	ANOVA
Auto-limpeza	19,66±13,07	15,66±3,07	14,83±2,67	18,83±2,24	17,35±2,42	$F_{4,27} = 0,79$
Exploração do alimento	176,1±69,2	224,8±77,7	320,5±132,1	213,7±50,4	305,6±71,4	$F_{4,27} = 0,55$
Exploração vertical	22,16±5,68	26,66±7,13	25,66±5,76	19,33±4,83	21,25±3,58	$F_{4,27} = 0,31$
Imobilidade	34,16±10,6	23,00±8,46	21,16±6,7	28,50±8,15	15,12±5,92	$F_{4,27} = 0,88$
Locomoção	59,16±13,79	70,66±19,71	55,83±10,4	51,33±10,14	51,62±9,79	$F_{4,27} = 0,36$

Os valores são média ± EPM. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de p não significantes.

As doses efetivas de CLO (0,2 e 20 nmol) que causaram **alterações comportamentais após o tratamento no MR, foram injetadas no Pn e na FRm**, regiões vizinhas ao MR. A ANOVA de duas vias apontou que houve diferença significativa na frequência de exibição do comportamento de AR após o tratamento com diferentes doses de CLO nos núcleos MR, Pn e FRm de ratos saciados, durante a exposição ao LCE ($F_{2,62} = 41,28$; $p = 10^{-6}$). A ANOVA de duas vias também mostrou que não ocorreram alterações estatisticamente significantes na frequência da AR quando foi feita a comparação entre os locais de injeção da droga ($F_{2,62} = 0,05$; $p = 0,95$); também não houve interação entre tratamento e local ($F_{4,62} = 0,24$; $p = 0,91$). O tratamento com a dose de 20 nmol de CLO nos três núcleos aumentou a frequência do comportamento de AR em relação ao controle (Figura 8). Este resultado foi semelhante ao observado após o tratamento com a mesma dose de CLO no MR.

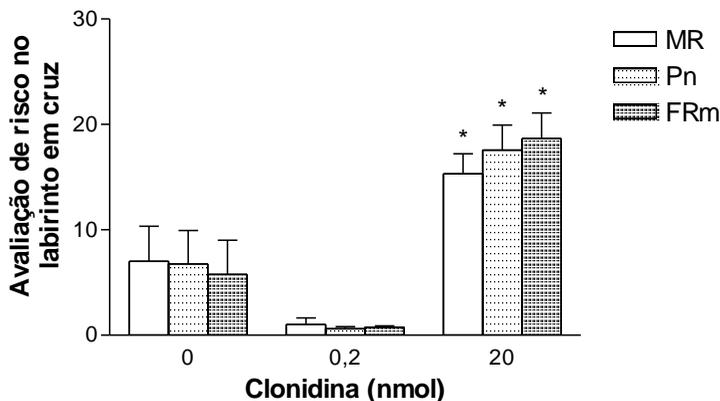


Figura 8. Alterações na frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco após o tratamento com salina (0, n=6) ou clonidina nas doses de 0,2 nmol (n=6) e 20 nmol (n=8) no núcleo mediano da rafe (MR); salina (n= 8) ou clonidina nas doses de 0,2 nmol (n= 8) e 20 nmol (n= 14) no núcleo pontino (Pn); e salina (n= 4) ou clonidina nas doses de 0,2 nmol (n= 8) e 20 nmol (n= 9) na formação reticular mesencefálica (FRm). Os valores são média \pm EPM da exibição do comportamento durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado. * $p < 0,05$ em relação à salina. ANOVA de duas vias e teste de Duncan.

A ANOVA de duas vias mostrou que ocorreu alteração estatística sobre o consumo de alimento ($F_{1,43} = 13,38$; $p = 0,006$), a latência para iniciar o consumo de ração ($F_{1,43} = 18,79$; $p = 0,00008$) e a frequência do consumo de ração ($F_{1,43} = 13,22$; $p = 0,0007$) após o tratamento com veículo ou CLO efetuado nos diferentes núcleos estudados. A ANOVA de duas vias também indicou diferenças entre os locais de injeção da droga para as variáveis consumo de alimento ($F_{2,43} = 3,54$; $p = 0,03$) e latência para iniciar o consumo de ração ($F_{2,43} = 3,61$; $p = 0,03$). A ANOVA de duas vias também indicou interação significativa entre droga e sítio de injeção da droga para as variáveis ingestão de alimento ($F_{2,43} = 3,54$; $p = 0,03$) e latência para iniciar o consumo de alimento ($F_{2,43} = 3,61$; $p = 0,03$). Enquanto a dose de 20 nmol de CLO injetada no MR causou aumento do consumo de alimento, diminuição da latência para iniciar esta resposta ingestiva e aumento da frequência do comportamento de ingestão de alimento, o tratamento com a mesma dose de CLO no Pn e na FRm não provocou nenhuma alteração estatisticamente significativa no comportamento alimentar (Figuras 9A, 9B e 9C).

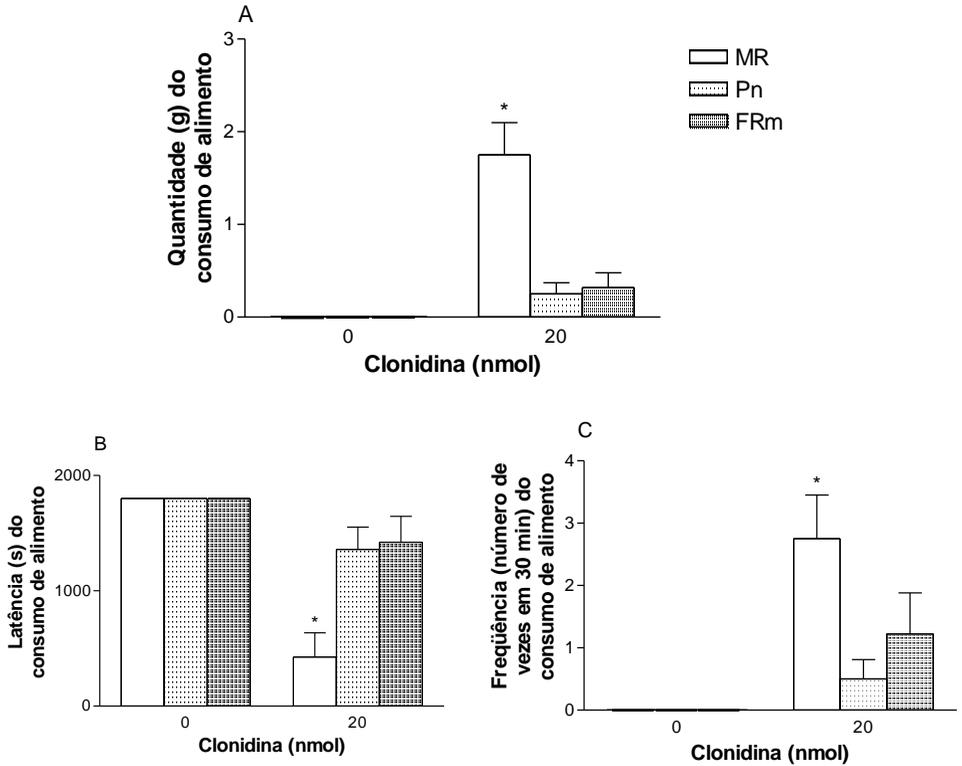


Figura 9. Alterações na quantidade, latência e frequência do consumo de alimento, após o tratamento com salina (0) ou clonidina na dose de 20 nmol no núcleo mediano da rafe (MR, n=6 e n=8, respectivamente); no núcleo pontino (Pn, n=8 e n=14, respectivamente) e na formação reticular mesencefálica (FRm, n=4 e n=9, respectivamente) de ratos saciados. Os valores são média \pm EPM da exibição do comportamento durante 30 min de registro na caixa alimentar. A e B, $*p < 0,05$ em relação à salina e CLO injetada no Pn e FRm; C, $*p < 0,05$ em relação somente à salina. ANOVA de duas vias e teste de Duncan.

4.3 Injeção do Agonista Adrenérgico β_2 (TER)

A análise histológica mostrou que 34 pontos de injeção com TER ou salina alcançaram o núcleo MR, enquanto 29 foram encontrados no núcleo Pn.

Efeitos das diferentes doses de TER injetadas no núcleo MR sobre os comportamentos relacionados à ansiedade:

As doses efetivas de TER (0,2; 2; 6 e 20 nmol) que causaram **alterações comportamentais no LCE após o tratamento no MR foram injetadas no Pn**, região vizinha ao MR. A ANOVA de duas vias mostrou que ocorreu diferença significativa na frequência de exibição da AR após o tratamento com diferentes doses de TER no MR e no Pn de ratos saciados, durante a exposição ao LCE ($F_{4,53} = 5,91$; $p = 0,0005$). A frequência da AR diminuiu em relação ao controle após a injeção de todas as doses de TER em ambos os núcleos (Figura 10A). A ANOVA de duas vias não indicou mudança estatística na frequência da AR entre o local de injeção da droga ($F_{1,53} = 0,19$; $p = 0,66$) e na interação entre o tratamento e os locais de injeção ($F_{4,53} = 0,13$; $p = 0,97$). A ANOVA de duas vias também apontou alteração estatística na % TA após o tratamento com TER no MR e no Pn ($F_{4,53} = 11,55$; $p = 0,000001$). A % TA aumentou em relação ao controle após a injeção de todas as doses de TER em ambos os núcleos (Figura 10B). A ANOVA de duas vias também não indicou mudança estatística na % TA entre o local de injeção da droga ($F_{1,53} = 0,58$; $p = 0,44$) e na interação entre o tratamento e os locais de injeção ($F_{4,53} = 1,15$; $p = 0,34$). A ANOVA de duas vias também mostrou alteração estatística na % EA após o tratamento com TER no MR e no Pn ($F_{4,53} = 3,91$; $p = 0,07$). A % EA aumentou em relação ao controle após a injeção de todas as doses de TER em ambos os núcleos (Figura 10C). A ANOVA de duas vias não apontou mudança estatística na % EA entre o local de injeção da droga ($F_{1,53} = 2,39$; $p = 0,12$) e na interação entre o tratamento e os locais de injeção ($F_{4,53} = 1,49$; $p = 0,21$). As outras variáveis espaço-temporais e os demais comportamentos etológicos relacionados à ansiedade e avaliados no LCE, não foram afetados pelo tratamento com TER no MR (Tabela 5).

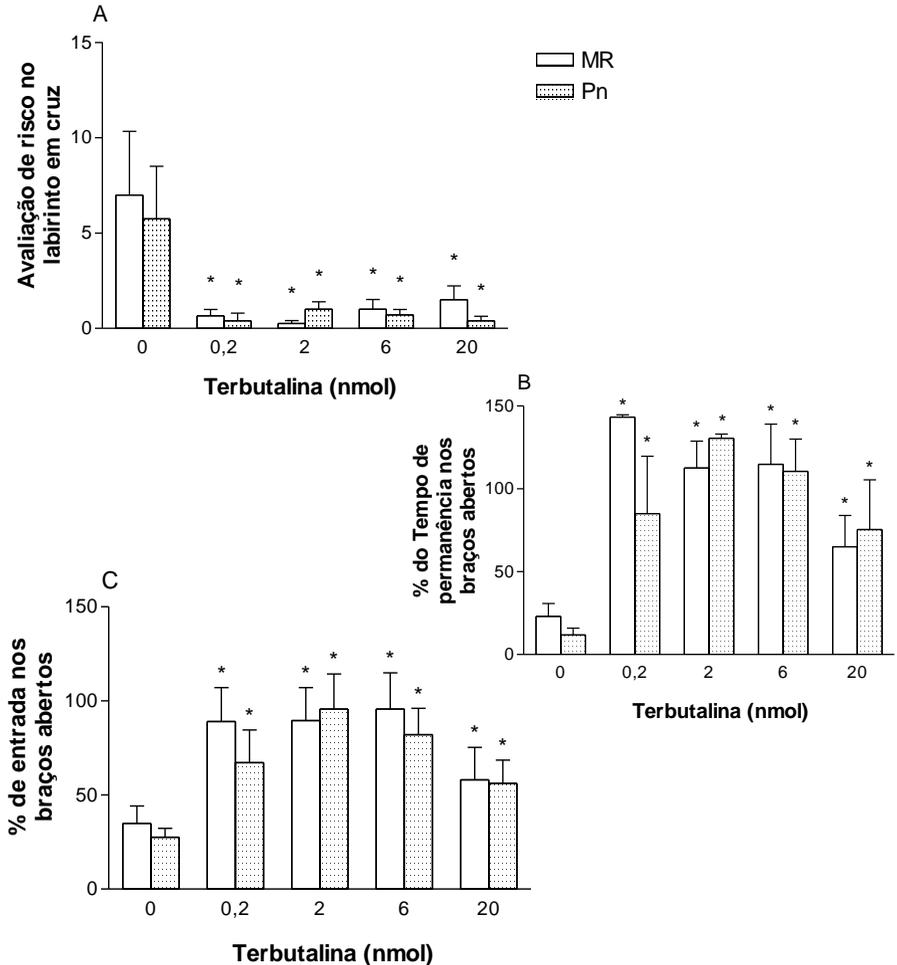


Figura 10. Alterações na frequência de exibição dos comportamentos de avaliação de risco, % do tempo de permanência nos braços abertos e % de entradas nos braços abertos, após o tratamento com salina (0, n=6) ou terbutalina nas doses de 0,2 nmol (n=6), 2 nmol (n=8), 6 nmol (n=6) e 20 nmol (n=8) no núcleo mediano da rafe (MR) e salina (n=8) ou terbutalina nas doses 0,2 nmol (n=5), 2 nmol (n=4), 6 nmol (n=7) e 20 nmol (n=5) no núcleo pontino (Pn). Os valores são média \pm EPM da exibição do comportamento durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado. * $p < 0,05$ em relação à salina. ANOVA de duas vias e teste de Duncan.

Tabela 5. Efeitos do tratamento com salina (SAL) ou terbutalina (TER, nmol) nos núcleos mediano da rafe (MR) e pontino (Pn) sobre variáveis espaço-temporais e etológicas, durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado.

Variáveis	Salina (6)		TERB 0,2 (6)		TERB 2 (8)		TERB 6 (6)		TERB 20 (8)		ANOVA
	MR (6)	Pn (8)	MR (6)	Pn (5)	MR (8)	Pn (4)	MR (6)	Pn (7)	MR (8)	Pn (5)	
Entrada nos braços fechados	5,7±1,4	5,8±1,5	6,2±1,2	6,8±2,1	6,9±1,0	8,0±0,4	6,7±1,6	6,4±1,1	7,8±1,8	8,2±2,0	F _{4,53} = 0,66
Total de entradas	9,8±2,6	8,6±2,4	9,7±2,0	9,0±2,6	10,1±2,1	11,25±1,4	8,2±1,9	8,0±1,4	12,5±3,1	12,8±3,1	F _{4,53} = 1,10
Auto-limpeza	2,5 ± 0,6	2,0±0,7	2,8± 0,8	2,4±0,9	2,5±0 ,5	2,2±0,3	3,8± ,4	1,3±0,5	1,9± 0,5	2,4±0,9	F _{4,53} =0,19
Exploração vertical	9,8± 0,8	8,8±1,3	12,5±2,4	10,0±3,6	9, ±1,4	14,8±1,5	9,2±1,4	9,9±1,1	15,6±2,3	12,2±1,0	F _{4,53} =2,16
Imersão da cabeça	8,2±2,1	7,6±2,1	13,3±3,2	9,8±4,5	6,1± 1,0	10,3±1,9	6,7± ,8	7,6±1,4	12,5±2,7	8,6±2,8	F _{4,53} =1,14

Valores são média ± EPM. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de *p* não significantes.

Efeitos das diferentes doses de TER injetadas no núcleo MR sobre os comportamentos ingestivos e não-ingestivos:

Os comportamentos ingestivos não foram afetados por nenhuma das doses de TER injetadas no MR. No entanto, alguns comportamentos não-ingestivos foram alterados pela ativação de receptores adrenérgicos- β_2 deste núcleo. A ANOVA de uma via apontou que houve diferença significativa na exibição da duração do comportamento de LOC após o tratamento com TER no MR de ratos saciados, durante o registro alimentar (Tabela 6). A duração do comportamento de LOC após a injeção das doses de 0,2, 2 e 6 nmol de TER no MR foi menor do que a observada no grupo controle (Tabela 6). A ANOVA de uma via também mostrou diferença significativa na duração do comportamento de AL após o tratamento com TER no MR durante o registro alimentar (Tabela 6). A duração do comportamento de AL após a injeção das doses de 0,2, 6 e 20 nmol de TER no MR foi menor em relação ao grupo controle (Tabela 6). As durações dos outros comportamentos não-ingestivos avaliados não foram alterados pelo tratamento com TER no MR (Tabela 6).

Tabela 6. Efeitos do tratamento com salina (SAL) ou terbutalina (TER, nmol) no núcleo mediano da rafe sobre a duração (s) de variáveis não-ingestivas em ratos saciados, durante 30 min de registro.

Variáveis	SAL (6)	TER 0,2 (6)	TER 2 (8)	TER 6 (6)	TER 20 (8)	ANOVA
Auto-limpeza	329,0±51,2	111,4±35,5*	225,4±57,0	190,1±37,2*	190,0±19,0*	F _{4,29} =3,05*
Exploração do alimento	17,2±3,1	15, ±5,1	11,4±1,6	15,3±5,8	23,5 ±4,4	F _{4,29} =1,37
Exploração vertical	67,9±23,2	85,7±36,6	41,3±7,5	86,5±24,3	97,1±24,8	F _{4,29} = 0,96
Locomoção	157,0±40,0	55,1±17,0*	42,4±5,2*	79,4±23,0*	102,0±13,0	F _{4,29} =4,58*

Os valores são média ± EPM. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de *p* não significantes, exceto em *

4.4 Tratamento prévio com o antagonista adrenérgico α_1 (PRA) seguido da injeção do agonista adrenérgico α_1 (FEN)

A análise histológica mostrou que 29 pontos de injeção de PRA ou veículo, antes das injeções de FEN ou veículo, alcançaram o núcleo MR.

Efeitos das injeções de PRA ou SPG 15 min antes das injeções de FEN ou SAL no núcleo MR, sobre os comportamentos relacionados à ansiedade:

A ANOVA de uma via mostrou que ocorreu alteração significativa na frequência de exibição da AR após os diferentes tratamentos no núcleo MR de ratos saciados, durante a exposição ao LCE ($F_{3,25} = 4,34$; $p = 0,013$). A redução na frequência de exibição do comportamento de AR induzida pela injeção da dose de 0,2 nmol de FEN no MR foi inibida pelo tratamento prévio com a dose de 40 nmol de PRA (Figura 11A). As variáveis espaço-temporais e os outros comportamentos etológicos relacionados à ansiedade e avaliados no LCE não foram afetados por nenhum dos tratamentos no MR (Tabela 7).

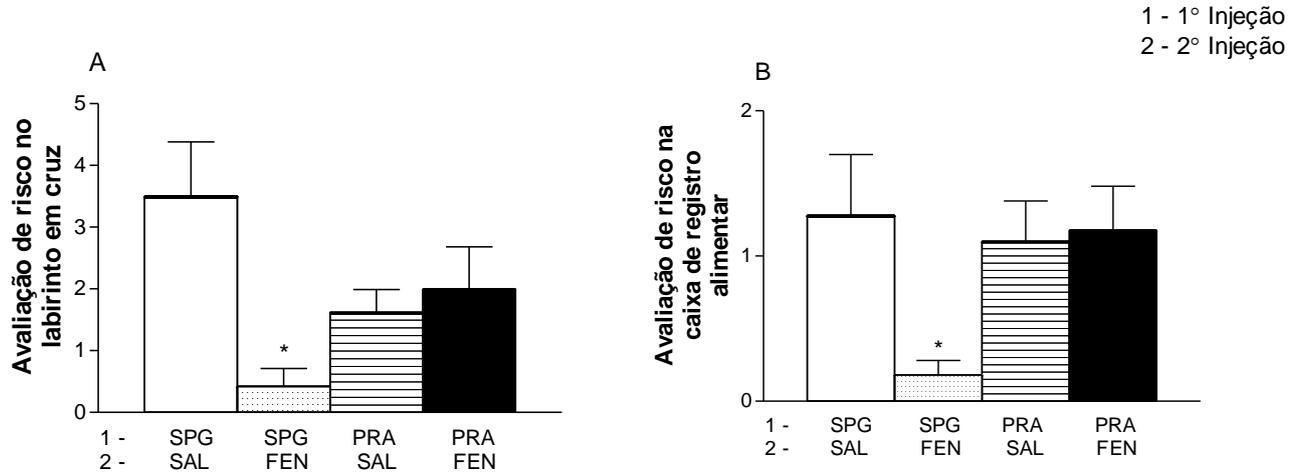


Figura 11: Alterações na frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco após o tratamento com veículo (SPG) ou prazosin (PRA, 40 nmol), 15 min antes do tratamento com veículo (SAL) ou fenilefrina (FEN, 0,2 nmol), no núcleo mediano da rafe de ratos saciados. Os valores são média \pm EPM da exibição do comportamento durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado (A) e 30 min de permanência na caixa de registro alimentar (B). * $p < 0,05$ em relação à salina. ANOVA de uma via e teste de Duncan. A: $n=8$ animais/tratamento em SPG-SAL e PRA-SAL, $n=7$ em SPG-FEN e $n=6$ em PRA-FEN. B: $n=7$ animais/tratamento exceto em PRA-FEN ($n=6$).

Tabela 7. Efeitos do tratamento com veículo (SPG) ou prazosin (PRA) 15 min antes do tratamento com veículo (SAL) ou fenilefrina (FEN) no núcleo mediano da rafe, sobre variáveis espaço-temporais e etológicas, durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado.

Variáveis	SPG-SAL (8)	SPG-FEN (7)	PRA-SAL (8)	PRA-FEN(6)	ANOVA
% Entrada nos braços abertos	27,1±6,6	30,4±5,6	43,2±4,2	24,6±3,8	F _{3,25} = 2,76
% Tempo nos braços abertos	9,3±2,5	11,3±2,9	20,9±5,8	7,7±0,8	F _{3,25} =2,52
Entrada nos braços fechados	2,4±0,7	2,9±0,8	5,4±1,7	1,7±0,3	F _{3,25} =0,45
Total de entradas	6,9±1,7	7,8±1,8	11,7±3,0	6,5±1,8	F _{3,25} =1,21
Auto-limpeza	2,0±0,3	3,1±0,8	2,4±0,4	1,5±0,4	F _{3,25} =1,52
Exploração vertical	8,2±0,7	9,3±1,0	11,0±0,8	11,0±2,0	F _{3,25} =1,48
Imersão da cabeça	7,2±0,8	8,1±2,3	12,7±2,1	6,2±0,9	F _{3,25} =2,97

Os valores são média ± EPM. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de *p* não significantes.

Efeitos das injeções de PRA ou SPG 15 min antes das injeções de FEN ou SAL no núcleo MR, sobre os comportamentos ingestivos e não-ingestivos:

A ANOVA de uma via indicou que o consumo de alimento foi afetado pelos diferentes tratamentos efetuados no núcleo MR de ratos saciados ($F_{3,23} = 5,54$; $p = 0,005$), assim como a latência para iniciar a resposta do consumo de ração ($F_{3,23} = 11,52$; $p = 0,00008$), a frequência de exibição do comportamento de consumo de ração ($F_{3,23} = 8,35$; $p = 0,0006$) e a duração deste comportamento ($F_{3,23} = 8,39$; $p = 0,0005$). O consumo de alimento aumentou estatisticamente após o tratamento com 40 nmol de PRA sozinho no MR (Figura 12A). A hiperfagia após a administração de PRA foi acompanhada por redução na latência para iniciar o consumo de ração, aumento na frequência de exibição do consumo de ração e aumento na duração deste comportamento (Figuras 12B, 12C e 12D). A administração de FEN após o PRA no MR impediu o aparecimento da resposta hiperfágica induzida pelo PRA (Figura

12A). O comportamento ingestivo não foi afetado pelos outros tratamentos (Figura 12).

A ANOVA de uma via também mostrou diferença significativa na frequência de exibição da AR após os diferentes tratamentos efetuados no núcleo MR de ratos saciados, durante o registro do comportamento alimentar ($F_{3,23} = 4,06$; $p = 0,18$). O tratamento com PRA antes da injeção de FEN no MR, bloqueou o efeito ansiolítico da administração da FEN sozinha no mesmo núcleo (Figura 11B). Os outros comportamentos não-ingestivos avaliados na caixa de registro alimentar permaneceram inalterados após os outros tratamentos no MR (Tabela 8).

Tabela 8. Efeitos do tratamento com veículo (SPG) ou prazosin (PRA) 15 min antes do tratamento com veículo (SAL) ou fenilefrina (FEN) no núcleo mediano da rafe de ratos saciados, sobre a duração (s) de variáveis não-ingestivas, durante 30 min de registro.

Variáveis	SPG-SAL (7)	SPG-FEN (7)	PRA-SAL (7)	PRA-FEN (6)	ANOVA
Auto-limpeza	177,4±48,4	201,5±68,9	286,0±64,0	245,8±38,2	$F_{3,23}=0,71$
Exploração do alimento	91,3±13,0	235,4±141,1	218,2±70,2	152,0±31,3	$F_{3,23}= 0,64$
Exploração vertical	118,7±40,0	147,60±60,6	88,6±16,1	81,6±24,0	$F_{3,23}= 0,56$
Imobilidade	418,1±146,3	109,0±27,5	234,0±96,1	255,4±108,4	$F_{3,23}=1,55$
Locomoção	124,6±31,0	112,2±21,1	71,0±12,6	55,9±12,3	$F_{3,23}=2,31$

Os valores são média ± EPM. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de p não significantes.

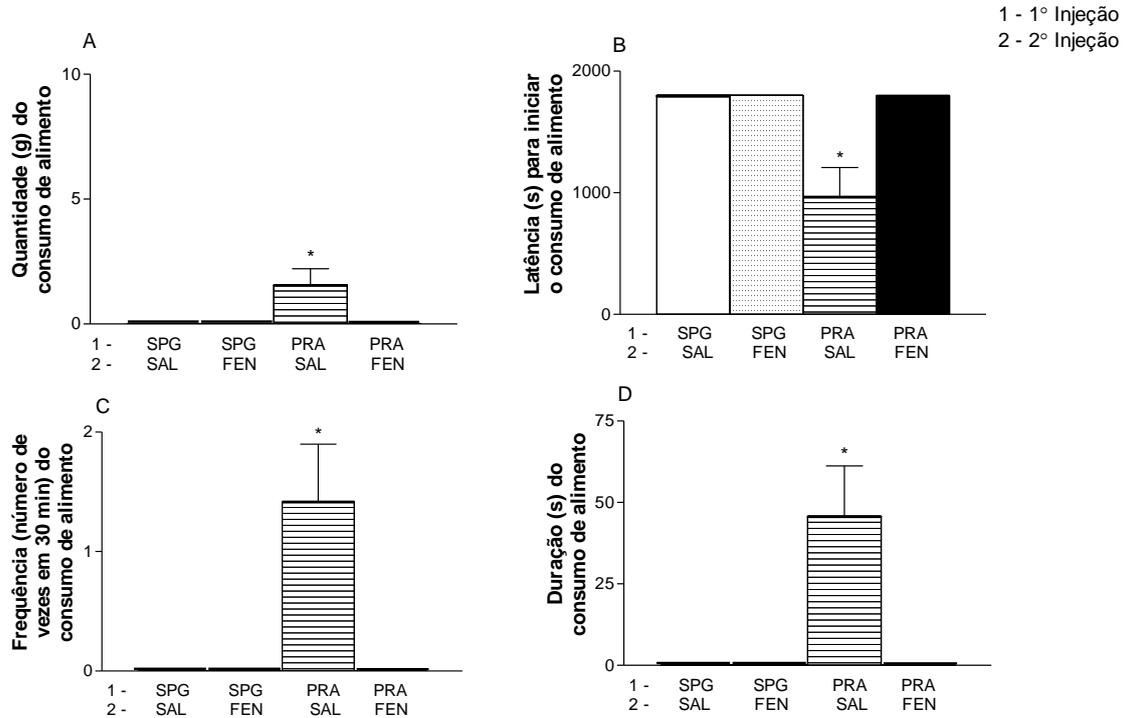


Figura 12: Alterações na quantidade, latência e frequência do consumo de alimento, após o tratamento com veículo (SPG) ou prazosin (PRA, 40 nmol) 15 min antes do tratamento com veículo (SAL) ou fenilefrina (FEN, 0,2 nmol) no núcleo mediano da rafe de ratos saciados. Os valores são média \pm EPM da exibição do comportamento durante 30 min de registro na caixa alimentar. * $p < 0,05$ em relação à salina. ANOVA de duas vias e teste de Duncan. $n=7$ animais/tratamento exceto para PRA-FEN ($n=6$).

4.5 Tratamento prévio com o antagonista adrenérgico α_2 (YOH) seguido da injeção do agonista adrenérgico α_2 (CLO)

A análise histológica mostrou que 38 pontos de injeção de YOH ou veículo, antes das injeções de CLO ou veículo, alcançaram o núcleo MR.

Efeitos das injeções de YOH ou SPG 15 min antes das injeções de CLO ou SAL no MR, sobre os comportamentos relacionados à ansiedade:

A ANOVA de uma via mostrou que ocorreu alteração estatística na frequência de exibição da AR após os diferentes tratamentos no núcleo MR de ratos saciados, durante a exposição ao LCE ($F_{5,32} = 13,98$, $p = 10^{-6}$). O tratamento prévio com YOH bloqueou o efeito ansiolítico da dose de 0,2 nmol de CLO sozinha no MR e o efeito ansiogênico da dose de 20 nmol da droga no mesmo núcleo (Figura 13). As outras variáveis etológicas e espaço-temporais avaliadas no LCE permaneceram inalteradas após os tratamentos no MR (Tabela 9).

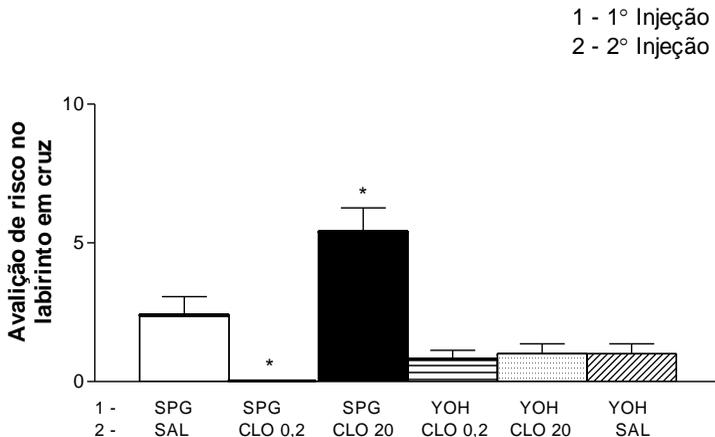


Figura 13: Alteração na frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco após o tratamento com veículo (SPG) ou ioimbina (40 nmol), 15 min antes do tratamento com veículo (SAL) ou clonidina (0,2 nmol ou 20 nmol), no núcleo mediano da rafe de ratos saciados. Os valores são média \pm EPM da exibição do comportamento durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado. * $p < 0,05$ em relação à salina. ANOVA de uma via e teste de Duncan. $n=6$ animais/tratamento exceto para SPG-SAL e SAL-CLO 20 ($n=7$).

Tabela 9. Efeitos do tratamento com veículo (SPG) ou ioimbina (YOH) 15 min antes do tratamento com veículo (SAL), clonidina 0,2 nmol (CLO 0,2) ou clonidina 20 nmol (CLO 20) no núcleo mediano da rafe, sobre variáveis espaço-temporais e etológicas, durante 5 min de exposição ao labirinto em cruz elevado.

Variáveis	SPG-SAL (7)	SPG-CLO 0,2 (6)	SAL-CLO 20 (7)	YOH-SAL (6)	YOH-CLO 0,2 (6)	YOH-CLO 20 (6)	ANOVA
% Entrada nos braços abertos	26,6±7,5	29,5±8,7	32,8±5,7	34,5±6,4	35,1±8,0	27,4±7,3	F _{5,32} =0,25
% Tempo nos braços abertos	8,7±2,5	17,7±3,0	26,6±5,5	33,6±10,8	12,6±4,0	21,9±7,0	F _{5,32} =2,35
Entrada nos braços fechados	5,0±1,5	9,0±2,0	9,4±1,3	10,5±0,9	6,7±1,1	8,5±2,4	F _{5,32} =1,56
Total de entradas	7,4±2,1	12,7±2,8	14,4±2,0	17,3±2,9	10,0±1,2	12,5±3,4	F _{5,32} =1,95
Auto-limpeza	2,1±0,7	0,8±0,4	1,6±0,6	1,2±0,5	2,7±0,5	1,3±0,4	F _{5,32} =1,72
Exploração vertical	10,6±3,3	13,2±1,5	11,4±2,1	16,2±2,7	9,8±0,7	11,9±2,3	F _{5,32} =0,89
Imersão da cabeça	6,2±2,0	13,2±3,3	9,0±2,4	18,3±5,0	10,8±1,3	11,2±4,0	F _{5,32} =1,72

Os valores são média ± EPM. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de *p* não significantes.

Efeitos das injeções de YOH ou SPG 15 min antes das injeções de CLO ou SAL no MR, sobre os comportamentos ingestivos e não-ingestivos:

A ANOVA de uma via indicou que o consumo de alimento foi afetado pelos diferentes tratamentos efetuados no núcleo MR de ratos saciados ($F_{5,34} = 18,9; p = 10^{-6}$), assim como a latência para iniciar a resposta de consumo de ração ($F_{5,34} = 650,10; p = 10^{-2}$), a frequência de exibição do consumo de ração ($F_{5,34} = 16,67; p = 10^{-6}$) e a duração deste comportamento ($F_{5,34} = 9,69; p = 0,000008$), durante 30 min de registro alimentar (Figura 14). O tratamento prévio com YOH no MR bloqueou o efeito hiperfágico causado pela injeção da dose de 20 nmol de CLO sozinha no mesmo núcleo (Figura 14A). O consumo de alimento não foi afetado pelos outros tratamentos (Figura 14A). A hiperfagia após a administração da dose de 20 nmol de CLO sozinha no MR foi acompanhada por redução na latência para iniciar o consumo de ração, aumento na frequência de exibição do consumo de ração e aumento na duração de exibição deste comportamento, todavia, estas variáveis permaneceram inalteradas após os demais tratamentos (Figuras 14B, 14C e 14D). Os outros comportamentos não-ingestivos avaliados permaneceram inalterados após os tratamentos no MR (Tabela 10).

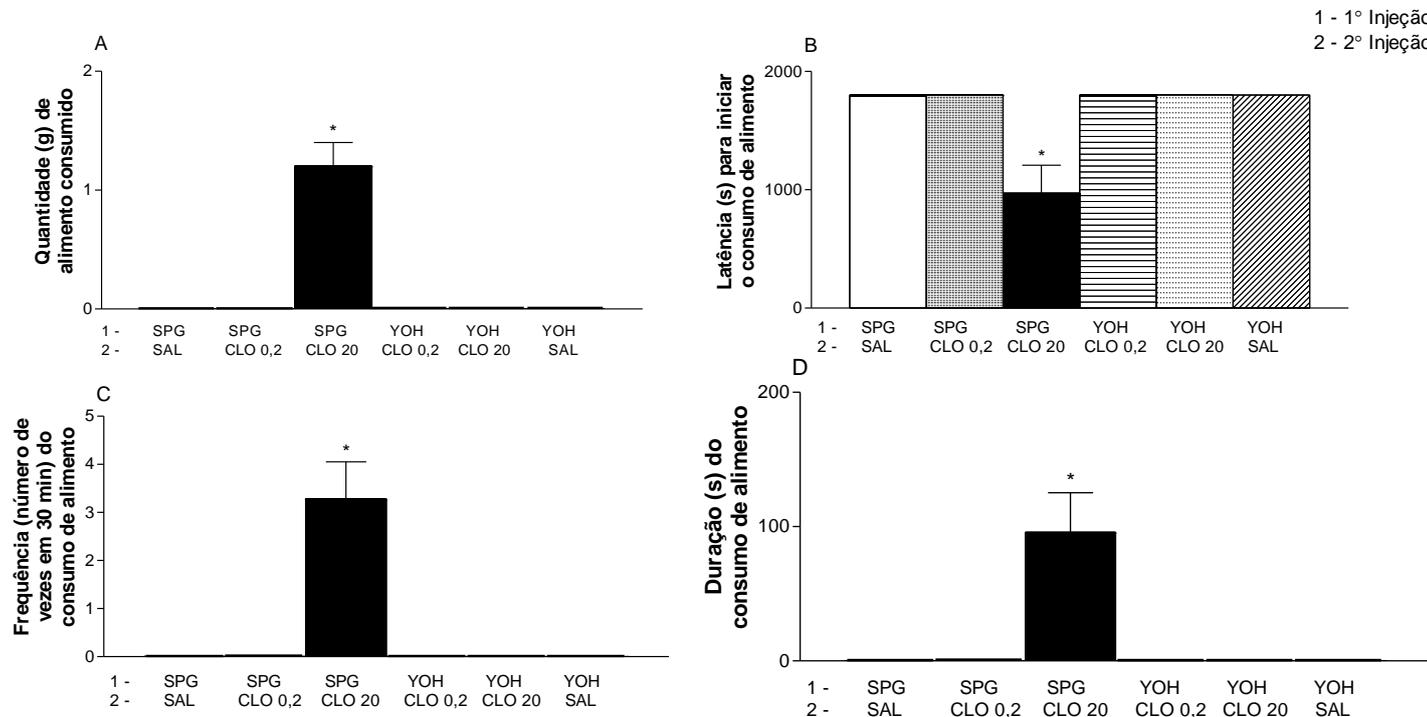


Figura 14: Alterações na quantidade, latência e frequência do consumo de alimento após o tratamento com veículo (SPG) ou ioimbina (YOH, 40 nmol), 15 min antes do tratamento com veículo (SAL) ou clonidina (CLO, 0,2 nmol ou 20 nmol), no núcleo mediano da rafe de ratos saciados. Os valores são média \pm EPM da exibição do comportamento durante 30 min de registro na caixa alimentar. * $p < ,05$ em relação à salina. ANOVA de duas vias e teste de Duncan. $n=6$ animais/tratamento, exceto para SPG-SAL e SPG-CLO 20 nmol ($n=7$).

Tabela 10. Efeitos do tratamento com veículo (SPG) ou ioimbina (YOH) 15 min antes do tratamento com veículo (SAL), clonidina 0,2 nmol (CLO 0,2) ou clonidina 20 nmol (CLO 20) no núcleo mediano da rafe de ratos saciados, sobre a duração (s) de variáveis não-ingestivas, durante 30 min de registro.

Variáveis	SPG-SAL (7)	SPG-CLO 0,2 (6)	SPG-CLO 20 (7)	YOH-SAL (6)	YOH-CLO 0,2 (8)	YOH-CLO 20 (6)	ANOVA
Auto-limpeza	177,4±48,5	145,3±27,1	194,6±32,6	226,4±54,2	192,2±33,0	60,2±17,2	F _{5,34} =0,79
Avaliação de risco	1,2±0,4	1,0±0,3	0,7±0,3	0,6±0,2	0,5±0,2	1,0±0,2	F _{5,34} =0,81
Exploração do alimento	91,3±13,0	127,0±11,2	134,3±18,3	118,6±17,2	132,5±16,8	48,3±20,1	F _{5,34} =3,80
Exploração vertical	118,7±40,0	80,0±25,5	73,4±12,0	148,8±30,0	132,0±20,8	43,0±10,8	F _{5,34} = 2,38
Imobilidade	407,2±148,0	276,1±46,6	300,5±95,1	168,0±29,5	132,0±17,6	267,0±134,0	F _{5,34} =1,20
Locomoção	124,6±31,0	150,3±28,5	181,1±32,6	223,4±55,6	126,7±21,4	82,6±12,7	F _{5,34} =2,18

Os valores são média ± EPM. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. As variáveis acima possuem valores de *p* não significantes.

RESUMO DOS RESULTADOS		
Grupos:	Efeitos das injeções das drogas no núcleo MR sobre os comportamentos:	
Agonistas	Relacionados à Ansiedade	Alimentares
FEN (todas as doses)	Ansiolítico (por diminuição da AR no LCE e na caixa de registro alimentar)	Sem alteração
CLO (0,2 nmol)	Ansiolítico (por diminuição da AR no LCE)	Hiperfagia
CLO (20 nmol)	Ansiogênese (por aumento da AR no LCE)	Sem alteração
TER (todas as doses)	Ansiolítico (por diminuição da AR e aumento da % TA e da % EA)	Sem alteração
Antagonistas		
PRA-FEN	Bloqueou o efeito ansiolítico da FEN	Sem alteração
PRA-SAL	Sem alteração	Hiperfagia
YOH-CLO 0,2 nmol	Bloqueou o efeito ansiolítico da CLO 0,2 nmol	Sem alteração
YOH-CLO 20 nmol	Bloqueou o efeito ansiogênico da CLO 20 nmol	Bloqueou o efeito hiperfágico da CLO 20 nmol

5 DISCUSSÃO

Comportamentos relacionados à ansiedade:

O presente estudo mostra que durante a avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade no LCE, o tratamento com **FEN** no MR manteve os parâmetros espaço-temporais inalterados. Por outro lado, houve diminuição da frequência de exibição da avaliação de risco (AR), uma variável etológica, após a injeção de todas as doses do agonista adrenérgico- α_1 usadas neste estudo. A AR está positivamente relacionada à ansiedade e pode ser considerada um dos parâmetros etológicos mais utilizados para avaliação do comportamento de ansiedade no LCE (Rodgers et al., 1997; Setem et al., 1999). Assim, sugerimos que a ativação de receptores adrenérgicos- α_1 do MR induz ansiólise, dado que é ratificado pelo tratamento prévio com **PRA**, antagonista do receptor adrenérgico- α_1 , no MR, o qual bloqueia o efeito ansiolítico da FEN. Tendo-se em conta que a estimulação de receptores adrenérgicos- α_1 do MR facilita a transmissão serotoninérgica (Adell e Artigas, 1999; Adell et al., 2002) e o tratamento com PRA no MR inibe a liberação de 5-HT em áreas de projeção deste núcleo envolvidas no comportamento de ansiedade, como a amígdala e o hipocampo (Rouquier, Claustre e Benavides, 1994; Adell e Artigas, 1999; Solati, Zarrindast e Salari, 2010), indica-se que o efeito ansiolítico encontrado no presente estudo seja resultado do aumento da liberação de 5-HT em regiões de projeção do MR. O comportamento de ansiólise parece ser sítio específico, pois não ocorreu mudança na frequência da AR quando as doses de FEN foram injetadas em local próximo ao MR, como no núcleo Pn.

A avaliação dos receptores adrenérgicos- α_2 do MR no controle da ansiedade, também mostrou que os parâmetros espaço-temporais permaneceram inalterados após as injeções de **CLO** neste núcleo. Contrariamente, a injeção da maior dose deste agonista aumentou a frequência de exibição da AR, assim sugerimos que a ativação de receptores adrenérgicos- α_2 do MR induz ansiogênese. Como a ativação de receptores adrenérgicos- α_2 do MR inibe a liberação de 5-HT por terminações neurais deste núcleo para suas áreas de projeção (Adell e Artigas, 1999; Adell et al., 2002), o aumento da ansiedade pode ter sido mediado por diminuição na liberação de 5-HT do MR a regiões prosencefálicas que regulam este comportamento. Verificou-se que o comportamento de ansiedade causado pela injeção de CLO no MR foi bloqueado com o tratamento prévio do antagonista adrenérgico- α_2 **YOH** no mesmo núcleo, confirmando que a ativação dos receptores

adrenérgicos- α_2 do MR controlam a ansiedade. É importante lembrar que transtornos de ansiedade respondem ao tratamento com alguns inibidores da recaptação seletiva de serotonina (IRSS), usados como antidepressivos (Baldwin e Tiwari, 2009), os quais bloqueiam a recaptação de 5-HT e aumentam sua quantidade na fenda sináptica (Hood et al., 2010), indicando que a diminuição da 5-HT sináptica promove estados depressivos e de ansiedade, corroborando o dado apresentado.

Este efeito ansiogênico não parece estar circunscrito ao MR, pois a mesma dose de CLO injetada no MR também aumentou a frequência de exibição da AR quando injetada no núcleo Pn ou na FRm, regiões adjacentes ao MR. Neurônios serotoninérgicos também estão presentes no Pn e na FRm, embora em menor quantidade do que no MR (Happe et al., 2004). Ainda, a presença de receptores adrenérgicos- α_2 foi demonstrada no Pn e na maioria das regiões do tronco encefálico (Happe et al., 2004). Entretanto, ainda não há dados indicando o tipo de neurônio que expressa receptores adrenérgicos no Pn e na FRm, podendo ser ou não serotoninérgicos. Adicionalmente, a função dos receptores adrenérgicos nestas estruturas ainda é desconhecida. Não se sabe se os mecanismos de controle serotoninérgico encontrados no MR ocorrem de forma similar nos núcleos Pn e na FRm e ainda precisam ser investigados.

Enquanto a dose mais alta de CLO injetada no MR aumentou a frequência de exibição da AR, o tratamento com a menor dose teve efeito oposto. Este dado indica que a ativação de receptores adrenérgicos- α_2 do MR também pode causar comportamento ansiolítico. Deste modo, dependendo da dose utilizada, pode ser observada ansiólise ou ansiogênese após a injeção de CLO no MR. Efeitos conflitantes também são encontrados após o tratamento com drogas que modificam a neurotransmissão serotoninérgica no MR. Foi relatado que a redução da atividade de neurônios serotoninérgicos do MR provoca alterações em diferentes parâmetros usados na avaliação do comportamento de ansiedade em vários modelos de ansiedade (Andrews et al., 1994; de Almeida et al., 1998; Avanzi e Brandão, 2001; Andrade e Graeff, 2001; Andrade et al., 2004), incluindo o LCE (de Almeida et al., 1998; Andrade e Graeff, 2001). Embora injeções no MR de agonistas 5-HT_{1A} resultam em ansiólise, injeções de WAY 100635, antagonista de receptores 5-HT_{1A}, no MR também causam efeito ansiolítico (Canto-de-Souza, Nunes-de-Souza e Rodgers, 2002). Adicionalmente, lesões (5,7-DHT) de neurônios serotoninérgicos podem causar ansiogênese (Neto et al., 2002), ansiólise (Andrade e Graeff,

2001) ou não alterar os parâmetros relacionados à ansiedade no LCE (Thomas et al., 2000). Tendo-se em conta que a ativação de receptores adrenérgicos- α_2 do MR reduz a liberação de 5-HT deste núcleo (Adell e Artigas, 1999; Adell et al., 2002), sugere-se que as alterações no comportamento de ansiedade provocadas pela injeção de CLO no MR possam ser atribuídas a modificações na neurotransmissão serotoninérgica. É importante relatar que o tratamento com YOH bloqueou também o efeito ansiolítico da CLO no MR, novamente mostrando que os receptores adrenérgicos- α_2 do MR controlam a ansiedade. Este efeito ansiolítico parece estar relacionado ao sítio de injeção da droga, pois a mesma dose de CLO não alterou a AR quando injetada no Pn e na FRm.

O presente estudo mostrou que a injeção de todas as doses de **TER** no núcleo MR aumentou a % TA e a % EA, dois parâmetros espaço-temporais relacionados à ansiedade, enquanto as demais variáveis permaneceram inalteradas após o tratamento com TER. A diminuição das % TA e % EA, são indicativas de aumento do estado de ansiedade (Setem et al., 1999), assim sugerimos que a estimulação de receptores adrenérgicos- β_2 do MR tem efeito ansiolítico. Todas as doses de TER injetadas no MR também causaram diminuição da frequência de exibição do comportamento de AR, reforçando o efeito ansiolítico após a ativação de receptores adrenérgicos- β_2 no MR. A TER não modificou outros parâmetros referentes à exploração locomotora como o EF e a EV (Setem et al., 1999), portanto, o aumento da % EA foi atribuído à preferência pelos braços abertos do LCE, indicativo de diminuição da ansiedade, e não à atividade locomotora. A administração intraventricular de outro agonista adrenérgico- β_2 , o salbutamol, aumenta o metabolismo de 5-HT no estriado e no tronco encefálico de ratos *in vivo*, efeito que é revertido pela injeção intraventricular do antagonista adrenérgico- β propranolol e evidencia a ação central de receptores adrenérgicos- β no controle da liberação de 5-HT (Waldmeier, 1981). Diferente dos receptores adrenérgicos- α_1 e α_2 , não existe evidência da participação dos receptores adrenérgicos- β_2 na liberação de 5-HT do MR, por conseguinte, o circuito ativado por este receptor é desconhecido e merece investigação. O comportamento de ansiólise após as injeções de TER no MR não parece estar circunscrito a este núcleo, pois a % TA e a % EA aumentaram e a frequência de exibição da AR diminuiu após o tratamento com todas as doses de TER no núcleo Pn.

Comportamentos ingestivos e não-ingestivos:

Este estudo também mostrou que a injeção de FEN no núcleo MR manteve inalterada a ingestão de alimento e, por conseguinte, a latência para iniciar a alimentação, a frequência da exibição deste comportamento e a duração da resposta de ingestão de alimento em ratos saciados. Levando-se em consideração que a ativação de receptores adrenérgicos- α_1 do MR aumenta a liberação de 5-HT a áreas de projeção deste núcleo (Adell e Artigas, 1999; Adell et al., 2002), a ausência de resposta hiperfágica após a injeção de FEN no MR pode ser atribuída ao tônus adrenérgico elevado, o qual poderia ativar o tônus serotoninérgico inibitório. Esta sugestão é reforçada pela hiperfagia causada pelo bloqueio dos receptores adrenérgico- α_1 do MR após a injeção de PRA sozinho. Esta resposta hiperfágica foi acompanhada por redução na latência para iniciar a alimentação, aumento na duração, bem como aumento na frequência da resposta de alimentação. Considerando que o tônus serotoninérgico é baixo em animais submetidos à restrição alimentar quando comparados a ratos saciados (Haider e Hallem, 2000; Kang et al., 2001; Kaye, 2008), seria importante a realização de experimentos com animais em restrição alimentar a fim de reforçar a função dos receptores adrenérgicos- α_1 no controle da ingestão de alimento. Vale ressaltar que tanto após estudos de microdiálise *in vivo* (Adell e Artigas, 1999) como em testes por voltametria (Hopwood e Stamford, 2001), a frequência de disparo de células serotoninérgicas do MR diminuiu após a injeção de PRA no MR. Assim, sugerimos que os efeitos ingestivos causados após o tratamento com PRA podem ser mediados por alterações na liberação de 5-HT do MR a áreas de projeção envolvidas com a ingestão de alimento, como os núcleos hipotalâmicos (Prat et al., 2009).

A injeção de PRA-FEN no MR não alterou o comportamento de ingestão de alimento, dado semelhante ao efeito do tratamento com o agonista adrenérgico- α_1 sozinho no MR. Neste estudo, embora a dose de FEN injetada no MR tenha sido menor do que a dose de PRA injetada no mesmo núcleo, a dose do agonista adrenérgico- α_1 pareceu ser suficiente para, possivelmente, estimular a liberação de 5-HT mediada por ativação de receptores adrenérgicos- α_1 e reverter o efeito da injeção isolada de PRA no MR.

No que tange aos comportamentos não-ingestivos, observou-se diminuição da frequência de exibição da AR durante o registro do comportamento alimentar após as injeções de FEN no MR, apontando efeito ansiolítico. Este dado é similar ao encontrado após o tratamento com FEN no MR para avaliação da ansiedade no LCE, reforçando a

sugestão de que o aumento da liberação de 5-HT em áreas terminais do MR pela ativação de receptores adrenérgicos- α_1 , medeia o efeito ansiolítico. Além da AR, a duração do comportamento não-ingestivo de AL também diminuiu, mas somente após a injeção da dose de 6 nmol de FEN no MR. Este resultado não foi relacionado ao efeito ansiolítico da FEN, uma vez que foi observado somente na caixa de registro alimentar e após um único tratamento e, também, por já ter sido considerada (Setem et al., 1999) uma variável não relacionada à ansiedade.

A avaliação dos receptores adrenérgicos- α_2 no controle da ingestão de alimento revelou que o tratamento com a maior dose de CLO injetada no núcleo MR de ratos saciados induziu hiperfagia acompanhada por diminuição na latência para iniciar a alimentação e aumento na frequência da alimentação. Como a ativação de receptores adrenérgicos- α_2 diminui a liberação de 5-HT do MR (Adell e Artigas, 1999; Adell et al., 2002), a hiperfagia induzida pela CLO poderia ser atribuída à diminuição na disponibilidade de catecolaminas na sinapse, reduzindo a ativação de receptores adrenérgicos- α_1 e seus possíveis efeitos sobre a liberação de 5-HT. O efeito hiperfágico induzido pelo agonista adrenérgico- α_2 , associado à resposta hiperfágica provocada pela inibição do receptor adrenérgico- α_1 após a injeção de PRA no MR, indicam que, nos animais saciados, o circuito adrenérgico da rafe ativa continuamente uma influência inibitória sobre a ingestão de alimento, mediada por receptores adrenérgicos- α_1 localizados, possivelmente, sobre neurônios serotoninérgicos do MR. As mudanças no comportamento alimentar induzidas pela CLO parecem estar circunscritas ao MR, haja vista que nenhuma resposta ingestiva foi observada após injeções de CLO no Pn ou na FRm.

Estudo anterior do nosso laboratório mostrou que a injeção de AD no MR causou hiperfagia, redução da latência para iniciar a alimentação, aumento da frequência da alimentação e da duração da resposta de ingestão de alimento (dos Santos et al., 2009). Efeito similar foi obtido neste estudo após o tratamento com PRA sozinho e da CLO no MR. A resposta hiperfágica induzida pela injeção de AD no MR foi atribuída à redução na liberação de 5-HT em regiões prosencefálicas envolvidas no comportamento de ingestão de alimento (dos Santos et al., 2009) e os nossos dados sugerem que o receptor adrenérgico- α_2 é o provável receptor ativado para provocar esta resposta hiperfágica. Estudo prévio também mostrou que a injeção de AD no MR de ratos em restrição alimentar induziu hipofagia (Maidel et al., 2007). Os resultados do presente estudo sugerem que essa resposta hipofágica possivelmente ocorreu por ativação de receptores adrenérgicos- α_1 encontrados em

neurônios serotoninérgicos do MR, resultando em aumento da liberação de 5-HT e uma ação inibitória indireta na alimentação.

A injeção do antagonista adrenérgico- α_2 **YOH** no MR bloqueou os efeitos dos comportamentos ingestivos induzidos pelo tratamento com CLO no mesmo núcleo. Estes dados reforçam a especificidade do efeito hiperfágico mediado pela ativação adrenérgica- α_2 após o tratamento com CLO no MR. Além disso, a ingestão de alimento, a latência para iniciar a alimentação e a frequência e duração dos comportamentos ingestivos não foram afetados pelo tratamento com YOH sozinha no MR, sugerindo que os receptores adrenérgicos- α_2 não foram ativados em condições de saciedade, em que o tônus serotoninérgico é elevado para áreas prosencefálicas, possivelmente ativado por receptores adrenérgicos- α_1 .

É estimado que 60% dos neurônios do MR não são serotoninérgicos (Leger e Wiklund, 1982). Provavelmente, as neurotransmissões gabaérgica ou glutamatérgica no MR (Sotelo et al., 1990) poderiam ser mecanismos adicionais envolvidos na hiperfagia resultante da manipulação farmacológica do circuito adrenérgico do MR, haja vista que a injeção no MR dos agonistas gabaérgicos muscimol (Klitenick e Wirtshafter, 1989; Paris, Mitsushio e Lorens, 1991; Wirtshafter, 2001) e baclofen (Wirtshafter, 2001) e de agonistas (NMDA) (Wirtshafter e Krebs, 1990) e antagonistas glutamatérgicos (Wirtshafter e Trifunovic, 1988), aumentaram a ingestão de alimento em ratos alimentados (Wirtshafter e Trifunovic, 1988; Klitenick e Wirtshafter, 1989; Wirtshafter e Krebs, 1990; Paris, Mitsushio e Lorens, 1991; Wirtshafter, 2001).

Ratos tendem a beber quando consomem alimentos sólidos e, como resultado, qualquer tratamento que aumente a ingestão de alimento deveria aumentar a ingestão de líquido (Wirtshafter, 2001). Por outro lado, a inibição de células do MR pela injeção de muscimol aumenta a ingestão de líquido independente da presença de alimento, demonstrando que o MR tem influência direta no consumo de água (Wirtshafter, 2001) mediada pela neurotransmissão gabaérgica. Inversamente, nosso estudo não mostrou alteração na ingestão de água, o que sugere que o circuito adrenérgico- α do MR não participa do controle deste comportamento. Como os comportamentos não-ingestivos permaneceram inalterados após o tratamento com CLO ou PRA, o efeito hiperfágico obtido com estas drogas não pode ser atribuído a mudanças na atividade motora ou outros comportamentos não-ingestivos.

Os resultados deste estudo também mostraram que a injeção de TER no MR não modificou o comportamento alimentar, assim como a latência, a frequência e a duração da alimentação, possivelmente por se tratar de ratos alimentados. Conforme descrito anteriormente, o efeito hipofágico induzido pela injeção de AD no MR de ratos em restrição alimentar pode ter sido causado por ativação de receptores adrenérgicos- α_1 e a provável elevação do tônus inibitório serotoninérgico (Maidel et al., 2007). Tendo-se em vista que a AD tem mais afinidade do que a NA por receptores adrenérgicos- β_2 (Borkowski, 1990), a ausência de efeito ingestivo após a injeção de NA no MR, associada ao fato de que tanto a AD quanto a NA são agonistas dos receptores adrenérgico- α_1 , foi atribuída à diferença de afinidade entre estas catecolaminas e o receptor adrenérgico- β_2 (Maidel et al., 2007). Ocorre que os resultados do presente estudo não sustentam esta sugestão, uma vez que o tratamento com TER não modificou a ingestão de alimento, excluindo a participação de receptores adrenérgicos- β_2 do MR no controle do comportamento ingestivo.

Os comportamentos não-ingestivos permaneceram inalterados após o tratamento com TER no MR durante o registro na caixa alimentar, exceto em relação às variáveis LOC e AL. A diminuição na duração do comportamento de LOC ocorreu após o tratamento com as doses de 0,2, 2 e 6 nmol de TER no MR, enquanto que a diminuição na duração do comportamento de AL foi observado após as injeções de 0,2, 6 e 20 nmol da droga no mesmo núcleo. De maneira geral, os dados indicam que o tratamento com TER no MR diminui a atividade motora e essas alterações parecem não contribuir para o efeito ansiolítico observado no LCE, uma vez que ocorreram mais tarde, quando os animais estavam dentro da caixa de registro do comportamento alimentar.

É relevante notar que este estudo analisou o comportamento alimentar dos animais após submetê-los durante 5 min ao teste de ansiedade no LCE, o que poderia alterar o efeito da droga sobre aquele comportamento. Em outro desenho experimental, os mesmos comportamentos ingestivos e não-ingestivos deste estudo foram avaliados imediatamente após a injeção da droga no MR, sem a avaliação da ansiedade, e os resultados foram similares aos obtidos neste estudo após o tratamento com CLO e PRA no mesmo núcleo; a injeção de AD no MR de ratos saciados aumentou a ingestão de alimento, a frequência da alimentação e diminuiu a latência para iniciar esta resposta comportamental (dos Santos et al., 2009). Em um desenho experimental semelhante ao do presente estudo, em que se avaliaram os

comportamentos de ingestão de alimento após a avaliação da ansiedade no LCE, a injeção de muscimol e baclofen na concha medial do núcleo accumbens de ratos saciados mostrou hiperfagia e diminuição da latência para iniciar a alimentação; baclofen, mas não o muscimol, aumentou a duração da alimentação (Lopes et al., 2007). Estas respostas concordam com outros estudos (Stratford e Kelley, 1997; Basso e Kelley, 1999; Reynolds e Berridge, 2001; Kelley et al., 2005) que investigaram comportamentos ingestivos imediatamente após a injeção da droga e sem avaliar variáveis relacionadas à ansiedade. Assim sendo, estes dados demonstram que a avaliação da ansiedade durante 5 min no LCE antes da análise do comportamento alimentar, não modifica o efeito da droga sobre este comportamento.

Correlação entre os comportamentos de ansiedade e alimentares:

As alterações relacionadas à ansiedade e ingestão de alimento induzidas após o tratamento com FEN, CLO e TER no MR, sugerem que os circuitos centrais adrenérgicos α_1 , α_2 e β_2 regulam estes comportamentos de forma independente. No tratamento com FEN, observou-se que todas as doses diminuíram a frequência de exibição da AR no LCE e na caixa de registro alimentar, indicando efeito ansiolítico, sem causar alteração na ingestão de alimento. A maior dose de CLO aumentou a frequência de exibição da AR, o que indica um efeito ansiogênico, e aumentou a ingestão de alimento e a frequência da alimentação e diminuiu a latência para iniciar a alimentação; a menor dose diminuiu a frequência de exibição da AR, demonstrando efeito ansiolítico, sem afetar a ingestão de alimento. O tratamento com todas as doses de TER diminuiu a frequência de exibição da AR e aumentou a % TA, indicadores de ansiólise, além de aumentar a % EA contribuindo com o efeito ansiolítico, sem causar alteração no comportamento alimentar.

Estudos clínicos mostram que complicações alimentares e de ansiedade frequentemente ocorrem simultaneamente, sendo que mais de 70% dos pacientes, têm ao menos um transtorno de ansiedade antes da desordem alimentar (Inoue et al., 2004). Por outro lado, 63% dos pacientes com anorexia nervosa e 33% dos pacientes com bulimia nervosa desenvolvem desordens alimentares antes do transtorno de ansiedade (Braun et al., 1994). Não há um modelo considerado adequado para explicar a comorbidade entre transtornos de ansiedade e alimentares (Inoue et al., 2004), além disso, a natureza específica da relação entre esses transtornos é ainda desconhecida (Godart et al., 2000). Em nível neuroquímico, transtornos de ansiedade e alimentares

apresentam anormalidades no sistema serotoninérgico e outros neurotransmissores (Brewerton, 1995). Assim, pode-se considerar que a dieta modifica a atividade funcional desses sistemas levando a alterações psicológicas e comportamentais (Polivy, 1996). Dessa forma, são recomendados os modelos animais que investigam a relação entre os efeitos da ingestão de alimentos e comportamentos relacionados à ansiedade.

6 CONCLUSÕES

- A ativação de receptores adrenérgicos- α_1 do núcleo MR tem efeito ansiolítico, enquanto que a ativação de receptores adrenérgicos- α_2 deste núcleo causa ansiogênese, sendo que estas respostas comportamentais parecem ser mediadas, respectivamente, pelo aumento e diminuição da liberação de 5-HT do MR.

- Há uma influência adrenérgica tônica no animal saciado mediada por receptores adrenérgicos- α_1 do núcleo MR, a qual possivelmente atua sobre o sistema serotoninérgico deste núcleo e inibe o comportamento ingestivo.

- A ativação de receptores adrenérgicos- β_2 do núcleo MR tem efeito ansiolítico, sem alterar o comportamento de ingestão de alimento.

- Os comportamentos de ansiedade e alimentares controlados por circuitos adrenérgicos do MR atuam por vias neurais independentes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELL A, ARTIGAS F. Regulation of the release of 5-hydroxytryptamine in the median raphe nucleus of the rat by catecholaminergic afferents. *Eur J Neurosci*. 11: 2305-11, 1999.

ADELL A, CELADA P, TERESA ABELLÁN M, ARTIGAS F. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Rev*. 39: 154-80, 2002.

ANDRADE TGCS, GRAEFF FG. Effect of electrolytic and neurotoxic lesion of the median raphe nucleus on anxiety and stress. *Pharmacol Biochem Behav*. 70: 1-14, 2001.

ANDRADE TGCS, MACEDO CEA, ZANGROSSI H, GRAEFF FG. Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. *Behav Brain Res*. 153: 55-60, 2004.

ANDREWS N, HOGG S, GONZALES LE, FILE SE. 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviours respectively. *Eur J Pharmacol*. 264: 259-64, 1994.

AVANZI V, BRANDÃO ML. Activation of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in the raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. *Behav Brain Res*. 126: 175-84, 2001.

BAKER KG, HALLIDAY GM, HORNUNG JP, GEFFEN LB, COTTON RGH, TÖRK I. Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. 42: 757-75, 1991.

BALDWIN DS, TIWARI N. The pharmacologic treatment of patients with generalized anxiety disorder: where are we now and where are we going? *CNS Spectr*. 14: 5-12, 2009.

BASSO AM, KELLEY AE. Feeding induced by GABA_A receptor stimulation within the nucleus accumbens shell: regional mapping and characterization of macronutrient and taste preference. *Behav Neurosci*. 113: 324-36, 1999.

BLOOM FE. Neurotransmission and the central nervous system. Chapter 12, 267-93. In: GOODMAN & GILMAN'S. The pharmacological basis of therapeutics. 9 ed. 1905 pp. 1996.

BONVENTO G, SCATTON B, CLAUSTRE Y, ROUQUIER L. Effect of local injection of 8-OH-DPAT into the dorsal or median raphe nuclei on extracellular levels of serotonin in serotonergic projection areas in the rat brain. *Neurosci Letters*. 132: 101-4, 1992.

BORKOWSKI KR. Presynaptic receptors in hypertension. *Ann N Y Acad Sci*. 604: 389-97, 1990.

BOWKER M, WESTLUND KN, COULTER JD. Origins of serotonergic projections to the spinal cord in rat: an immunocytochemical-retrograde transport study. *Brain Res*. 226: 187-99, 1981.

BRAUN DL, SUNDAY SR, HALMI KA. Psychiatric comorbidity in patients with eating disorders. *Psychol Med*. 24: 859-867. 1994.

BREWERTON TD. Toward a unified theory of serotonin dysregulation in eating and related disorders. *Psychoneuroendocrinology*. 20: 561-90, 1995.

BURT AM. Neuroanatomia. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 412 pp, 1993.

CARLSON NC. Fisiologia do Comportamento. Manole: São Paulo. 699 pp, 2002.

CANTO-DE-SOUZA A, NUNES-DE-SOUZA RL, RODGERS RJ. Anxiolytic-like effect of way-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain Res*. 928, 50-9, 2002.

CRYAN JF, PAGE ME, LUCKI I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *Eur J Pharmacol*. 436: 197-205, 2002.

CURRIE PJ, FLETCHER PJ, COSCINA DV. Administration of 8-OH-DPAT into the midbrain raphe nuclei: effects on medial hypothalamic NE-induced feeding. *Am J Physiol.* 266: 1645-51, 1994.

DE ALMEIDA RM, GIOVENARDI M, CHARCHAT H, LUCION AB. 8-OH-DPAT in the median raphe nucleus decreases while in the medial septal area it may increase anxiety in female rats. *Neurosci Biobehav Rev.* 23: 259-64, 1998.

DEAKIN JFW. The role of serotonin in depression and anxiety. *Eur Psychiatry.* 13: 57-63, 1998.

DOS SANTOS RLD, 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.* 197: 411-6, 2009.

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.* 29: 269-72, 2007.

FLETCHER PJ, COSCINA DV. Injecting 5-HT into the PVN does not prevent feeding induced by injecting 8-OH-DPAT into the raphe. *Pharmacol Biochemi Behav.* 46: 487-91, 1993.

FUNK D, LI Z, FLETCHER J, LE AD. Effects of injections of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin or muscimol in the median raphe nucleus on c-fos mRNA in the rat brain. *Neuroscience.* 131: 475-79, 2005.

GODART NT, FLAMENT MF, LECRUBIER Y, JEAMMET P. Anxiety disorders in anorexia nervosa and bulimia nervosa: Comorbidity and chronology of appearance. *Eur Psychiatry.* 15: 38-45. 2000.

HAIDER S, HALEEM DJ. Decreases of brain serotonin following a food restriction schedule of 4 weeks in male and female rats. *Med Sci Monit.* 6: 1061-7, 2000.

HALBERG, H. Central beta-adrenoceptors can modulate 5-hydroxytryptamine-induced tremor in rats. *Br J Pharmacol.* 87: 403-08, 1986.

HALFORD JCG, WANNINAYAKE SCD, BLUNDELL JE. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacol Bioch and Beh.* 61: 159–68, 1998.

HALL H, LUNDKVIST C, HALLDIN C, FARDE L, PIKE VW, MCCARRON JA, FLETCHER A, CLIFFE IA, BARF T, WIKSTRÖM H, SEDVALL G. Autoradiographic localization of 5HT_{1A} receptors in the post-mortem human brain using [3H] WAY-100635 and [11C] WAY 100635. *Brain Res.* 745: 96-108, 1997.

HAPPE HK, COULTER CL, GERETY ME, SANDERS JD, O'ROUKE M, BYLUND DB, MURRIN LC. Alpha-2 adrenergic receptor development in rat CNS: an autoradiographic study. *Neuroscience.* 123: 167-78, 2004.

HENSLER JG. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev.* 30: 203–14, 2006.

HOOD SD, HINCE DA, DAVIES SJ, ARGYROPOULOS S, ROBINSON H, POTOKAR J, NUTT DJ. Effects of acute tryptophan depletion in serotonin reuptake inhibitor-remitted patients with generalized anxiety disorder. *Psychopharmacology.* 2: 223-32, 2010.

HOPWOOD SE, STAMFORD JA. Noradrenergic modulation of serotonin release in rat dorsal and median raphe nuclei via α_1 and α_{2A} adrenoceptors. *Neuropharmacology.* 41: 433–42, 2001.

HOFFMANN B, LEFKOWITZ RJ. Catecholamines, sympathomimetic drugs and adrenergic receptor antagonists. In: Goodman & Gilman's: *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 9 ed. Mc Graw Hill. 1905 pp, 1996.

HORNUNG JP. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanatomy.* 26: 331–43, 2003.

INOUE K, ZORRILLA E, TABARIN A, VALDEZ G, IWASAKI S NOBUO K KOOB G. Reduction of anxiety after restricted feeding in the rat: Implication for eating disorders. 55: 1075-1081. 2004.

JUDGE SJ, GARTSIDE SE. Firing of 5-HT neurones in the dorsal and median raphe nucleus in vitro shows differential alpha1-adrenoceptor and 5-HT_{1A} receptor modulation. *Neurochem Int.* 48: 100-7, 2006.

KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM. Princípios da Neurociência. Manole: São Paulo, 4 ed: 1412 pp, 2003.

KANG M, PARK C, AHN H, HUH Y. Ectopic expression of serotonin-positive neurons in the hypothalamus associated with a significant serotonin decrease in the midbrain of food restricted rats. *Neurosci Lett.* 314: 25–8, 2001.

KAYE W. Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. *Physiol Behav.* 94: 121–35, 2008.

KELLEY AE, BALDO BA, PRATT WE, WILL MJ. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav.* 86:773–95, 2005.

KIA HK, MIQUEL MC, BRISORGUEIL MJ, DAVAL G, RIAD M, EL MESTIKAWY S, HAMON M, VERGÉ D. Immunocytochemical localization of 5-HT_{1A} receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 365: 289-305, 1996.

KINGSLEY RE. Manual de Neurociências. Guanabara & Koogan: Rio de Janeiro, 2 ed: 496 pp, 2000.

KLITENICK MA, WIRTSHAFTER D. Elicitation of feeding, drinking, and gnawing following microinjections of muscimol into the median raphe nucleus of rats. *Behav Neural Biol.* 51: 436-41, 1989.

LEGER L, WIKLUND L. Distribution and numbers of indoleamine cell bodies in the cat brainstem determined with Falck-Hillarp fluorescence histochemistry. *Brain Res Bull.* 9: 245–51, 1982.

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.* 416: 285–8, 2007.

LOWRY CA. Functional subsets of serotonergic neurons: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol.* 14: 911-23, 2002.

LUCKI I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry.* 44: 151-62, 1998.

MAIDEL S, LUCINDA AM, 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 Letters.* 422: 123-7, 2007.

MOKLER DJ, DUGAL JR, HOFFMAN JM, MORGANE PJ. Functional interrelations between nucleus raphé dorsalis and nucleus raphé medianus: a dual probe microdialysis study of glutamate-stimulated serotonin release. *Brain Res Bull.* 78: 132-8, 2009.

MONGEAU R, BLIER P, MONTIGNY C. The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Rev.* 23: 145-95, 1997.

MORIN LP, MEYER-BERNSTEIN EL. The ascending serotonergic system in the hamster: comparison with projections of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuroscience.* 91: 81-105, 1999.

NETO SM, SILVEIRA R, COIMBRA NC, JOCA SRL, GUIMARÃES FS. Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. *Progr Neuro-Psychopharmacol Bio Psychiatry.* 26: 1135-41, 2002.

NUNES-DE-SOUZA RL, CANTO-DE-SOUZA A, RODGERS RJ. Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into ventral but not dorsal hippocampus in mice. *J Psychopharmacology A57: Suppl A,* 1999.

NUNES-DE-SOUZA RL, CANTO-DE-SOUZA A, DA-COSTA M, FORNARI RV, GRAEFF FG, PELA IR. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala

administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology*. 150: 300-10, 2000.

OTTONI EB. Etholog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput*. 32: 446-9, 2000.

PARIS JM, MITSUSHIO H, LORENS SA. Intra-midbrain raphe injections of the neurokinin-3 agonist senktide inhibit food and water intake in the rat. *Pharmacol Bioch Behav*. 38: 223-6, 1991.

PAXINOS G, WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6 ed. San Diego: Academic Press, 463 pp, 2007.

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open and closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Neurosci Meth*. 14: 149-67, 1985.

PERRIN D, MAMET J, GELOEN A, MOREL G, DALMAZ Y, PEQUIGNOT JM. Sympathetic and brain monoaminergic regulation of energy balance in obesity-resistant rats. *Autonomic Neuroscience*. 109: 1-9, 2003.

PEYRON C, LUPPI PH, FORT P, RAMPON C, JOUVET M. Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*. 364: 402-13, 1996.

PIÑEYRO G, BLIER P. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev*. 51: 533-91, 1999.

PRATT WE, BLACKSTONE K, CONNOLLY ME, SKELLY MJ. Selective serotonin receptor stimulation of the medial nucleus accumbens causes differential effects on food intake and locomotion. *Behav Neurosci*. 123: 1046-57, 2009.

PHILIPP M, HEIN L. Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacol Ther*. 101: 65-74, 2004.

POLIVY J, ZEITLIN SB, HERMAN CP, BEAL AL. Food restriction and binge eating: A study of former prisoners of war. *J Abnormal Psychol*. 103: 409-411. 1994.

REYNOLDS SM, BERRIDGE KC. Fear and feeding in the nucleus accumbens shell: rostrocaudal segregation of GABA-elicited defensive behavior versus eating behavior. *J Neurosci.* 21: 3261–70, 2001.

RODGERS RJ, CAO BJ, DALVI A, HOLMES A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Bio Res.* 30: 289-304, 1997.

ROUQUIER L, CLAUSTRE Y, BENAVIDES J. α_1 -adrenoreceptor antagonists differentially control serotonin release in the hippocampus and striatum: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol.* 264: 59-64, 1994.

SAKAE YS, PEREIRA LO, DA CUNHA IC, DE LIMA TCM, PASCHOALINI MA, FARIA MS. Systemic administration of a nitric oxide synthase inhibitor impairs fear sensitization in the plus-maze. *Neurobiol of Learning and Memory.* 90, 455-9, 2008.

SCHWARTZ MW, WOODS SC, PORTE JR D, SEELEY RJ, BASKIN DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 404: 661–71, 2000.

SETEM J, PINHEIRO AP, MOTTA VA, MORATO S, CRUZ APM. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 62: 515-21, 1999.

SOLATI J, ZARRINDAST MR, SALARI AA. Dorsal hippocampal opioidergic system modulates anxiety-like behaviors in adult male Wistar rats. *Psychiatry Clin Neurosci.* 64: 634-41, 2010.

SOTELO C, CHOLLEY B, MESTIKAWY SE, GOZLAN H, HAMON M. Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT_{1A} autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. *Eur J Neurosci.* 2: 1144-54, 1990.

STAMP J, SEMBA K. Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Res.* 677: 39-49, 1995.

STRATFORD TR, KELLEY AE. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci.* 17: 4434–40, 1997.

STRATFORD TR, WIRTSHAFTER D. Evidence for a projection from the B9 serotonergic cell group to the median raphe nucleus. *Brain Res Bull.* 21: 325-8, 1988.

TAKASE LF, NOGUEIRA MI. Patterns of Fos activation in rat raphe nuclei during feeding behavior. *Brain Res.* 1200: 10-18, 2008.

THOMAS H, FINK H, SOHR R, VOITS M. Lesion of the median raphe nucleus: a combined behavioural and microdialysis study in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 65: 15-21, 2000.

TORIGOE Y, BLANKS RH, PRECHT W. Anatomical studies on the nucleus reticularis tegmenti pontis in the pigmented rat. I. Cytoarchitecture, topography, and cerebral cortical afferents. *J Comp Neurol.* 243: 71-87, 1986.

VERTES RP, CRANE AM. Distribution, quantification and morphological characteristics of serotonin-immunoreactive cells of the suprallemniscal nucleus (B9) and pontomesencephalic reticular formation in the rat. *J Comp Neurol.* 378: 411- 24, 1997.

VERTES RP, FORTIN WJ, CRANE AM. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 407: 555- 82, 1999.

VERTES RP, LINLEY SB. Comparison of projections of the dorsal and median raphe nuclei, with some functional considerations. *Inter Congress Series.* 1304: 98-120, 2007.

WALDMEIER PC. Stimulation of central serotonin turnover by beta-adrenoceptor agonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 317: 115-9, 1981.

WALTHER D, BADER M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol.* 66: 1673-80, 2003.

WIRTSHAFTER D, TRIFUNOVIC R. Stimulation of ingestive behaviors following injections of excitatory amino acid antagonists into the median raphe nucleus. *Pharmacol Biochem Behav.* 30: 529-33, 1988.

WIRTSHAFTER D, KREBS JC. Control of food intake by kainate/quisqualate receptors in the median raphe nucleus. *Psychopharmacology*. 101: 137-41, 1990.

WIRTSHAFER D. The control of ingestive behavior by the median raphe nucleus. *Appetite*. 36: 99-105, 2001.