

ANDERSON SAVARIS RIBAS

**EFEITOS INGESTIVOS PROVOCADOS PELAS INJEÇÕES DE  
AGONISTA DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS  $\alpha$ -1 E  $\alpha$ -2 NO  
NÚCLEO MEDIANO DA RAFE DE RATOS PRIVADOS DE  
ALIMENTO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Florianópolis (SC)  
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS- CFS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITOS INGESTIVOS PROVOCADOS PELAS INJEÇÕES DE  
AGONISTA ADRENÉRGICO  $\alpha$ -1 E  $\alpha$ -2 NO NÚCLEO MEDIANO  
DA RAFE DE RATOS PRIVADOS DE ALIMENTO**

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina, para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências  
Fisiológicas.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Marta  
Aparecida Paschoalini

Florianópolis (SC)  
2011

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

R482e Ribas, Anderson Savaris

Efeitos ingestivos provocados pelas injeções de agonista de receptores adrenérgicos a-1 e a-2 no núcleo mediano da rafe de ratos privados de alimento [dissertação] / Anderson Savaris Ribas ; orientador, Marta Aparecida Paschoalini. – Florianópolis, SC, 2011.

51 p.: il., graf., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Inclui referências

1. Ingestão de Alimentos. 2. Núcleos da Rafe. 3. Receptores Adrenérgicos. I. Paschoalini, Marta Aparecida. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 57

**“EFEITOS INGESTIVOS PROVOCADOS PELAS INJEÇÕES DE  
AGONISTA DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS  $\alpha$ -1 E  $\alpha$ -2 NO  
NÚCLEO MEDIANO DA RAFE DE RATOS PRIVADOS DE  
ALIMENTO”**

ANDERSON SAVARIS RIBAS

Essa dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/ Associada Universidade Federal de Santa Catarina.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Aparecida Paschoalini  
Orientadora

Departamento de Ciências Fisiológicas – CCB - UFSC

Alex Rafacho  
Membro

Departamento de Ciências Fisiológicas – CCB – UFSC

Daniel Breseghello Zocal  
Membro

Departamento de Ciências Fisiológicas – CCB – UFSC

Luiz Carlos Carvalho Navegantes  
Membro

Departamento de Ciências Fisiológicas – FMRP - USP

José Marino-Neto  
Suplente

Departamento de Ciências Fisiológicas – CCB - UFSC

## AGRADECIMENTOS

Agradecer a DEUS nesse momento é apenas uma forma expressar o amor a vida e por tudo que somos.

A meus pais e irmão que sempre serão os amores da minha vida e que dão sentido a tudo!

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Marta Paschoalini, inicialmente pelo fato de dar a oportunidade de realizar um sonho quando menos esperava, em segundo lugar pelas cobranças necessárias a alguém que está em processo de formação que me ajudaram a pensar no que estava fazendo e nos meus propósitos e por fim, pela sua ajuda no final desse trabalho a qual sempre ficarei imensamente grato. Obrigado “Chefe”!

Aos colegas de laboratório por estarem na minha vida e eu nas suas durante esse processo, em especial a Larissa e Cida pelo modo de ser e ajudas indispensáveis, a Ana Paula pela cooperação no dia a dia, amizade e incentivo para que fosse longe, a Soci, Dani, Eduardo pelos bons momentos, a Cris por ouvir minhas idéias e projetos mirabolantes estando sempre disposta a me ajudar, e por fim aos colegas do IEB, Martina, Fernandinho e Tiaguinho pela amizade, “galhos quebrados” e pelos papos científicos.

Ao Prof.Dr. Marino por disponibilizar seu laboratório, amizade e disposição em conversar sobre as mais diversas loucuras, dúvidas e pensamentos científicos.

Agradeço especialmente ao aluno de iniciação científica (IC) Rafael o qual começou suas atividades comigo e me presenteou com sua amizade, dedicação, confiança, competência além de ter a paciência em cumprir a risca todos os meus procedimentos por mais rígidos e desnecessários que pudessem parecer demonstrado que é e sempre será um grande homem.

Aos professores do programa de pós-graduação em ciências fisiológicas pelo seu empenho, preocupação e dedicação aos alunos e ao programa. Merecem agradecimentos todos os professores que criaram e compõe o programa multicêntrico de pós-graduação em ciências fisiológicas por possibilitar o acesso ao conhecimento.

Por fim, as pessoas mais carinhosas com os pós-graduandos, Carlão, Dona Vilma, Gilza e Nivaldo pela amizade, disposição em nos ajudar e pelo carinho.

Aos animais que não compreendem sua importância para a humanidade.

Ao CNPQ.

## EPÍGRAFE

*“Moços, nesta escola o Governo vos proporciona os meios de vencer na vida! O vosso sucesso depende, porém, de esforço e persistência no estudo e no trabalho. Lembrai-vos pois, que na vida só o indivíduo pode lançar os alicerces da própria felicidade”.*

Fernando Costa.

## RESUMO

Estudos prévios do nosso laboratório mostraram que a injeção de clonidina (CLON), agonista de receptor  $\alpha$ -2 adrenérgico no núcleo mediano da rafe (NMR) provoca aumento da ingestão de alimento em ratos saciados. Por outro lado, a administração de fenilefrina (FEN), agonista de receptor  $\alpha$ -1 adrenérgico, no NMR, não provoca alteração no consumo alimentar, provavelmente devido a presença de elevada atividade adrenérgica e manutenção de um tônus inibitório persistente (possivelmente serotoninérgico) sobre a ingestão de alimento em animais saciados. O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da injeção de FEN no NMR em ratos que exibem menos influências centrais inibitórias sobre a ingestão de alimento, como é o caso da privação de alimento. Em adição os efeitos da CLON no NMR também foram investigados. Foram utilizados 165 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), peso entre 270-310g com cânulas guia cronicamente implantadas 2 mm acima no NMR e divididos em dois grupos experimentais: ratos em restrição de 15g de ração/dia durante 7 dias e ratos submetidos a jejum noturno. Após a injeção intra NMR de FEN ou CLON o rato foi colocado na caixa de ingestão contendo ração granulada e água previamente pesados. Os comportamentos ingestivos e não ingestivos foram registrados digitalmente por 30 minutos. Os comportamentos foram analisados através do programa Etholog 2.25 e classificados conforme Halford (1998). O posicionamento da agulha injetora no NMR foi verificado por análise histológica. Os resultados mostraram que o tratamento com FEN (6 e 20 nM/L) nos ratos em jejum noturno provocou redução na ingestão de alimento, aumento na latência para iniciar o consumo e redução na duração da resposta de ingestão de alimento. Nos ratos em restrição de alimento de 15g de ração/dia por 7 dias a injeção de FEN (6 e 20 nM/L) induziu a redução na ingestão de alimento e a dose de 6 nM/L também causou diminuição na frequência da ingestão de alimento. Esses dados reforçam a hipótese que a ativação de receptores adrenérgicos do NMR estimula uma influência inibitória sobre a ingestão de alimento que é menos ativa durante a privação de alimento.

**Palavras-Chave:** Ingestão de alimento, Núcleo mediano da rafe, Receptores adrenérgicos.

## **ABSTRACT**

Previous studies from our laboratory showed that clonidine (CLON) injection,  $\alpha$ -2 adrenergic receptor agonist, into the median raphe nucleus (NMR) produced increased food intake in satiated rats. Moreover, phenylephrine (PHE) administration,  $\alpha$ -1 adrenergic receptor agonist, into the NMR did not change feeding behavior, may be due to the presence of a high adrenergic activity and maintenance of persistent inhibitory tone (possibly serotonergic) on food intake in satiated animals. The purpose of this study was to investigate PHE effects into NMR in animals that exhibit less central inhibitory influences on food intake, such as food deprivation. In addition CLON effects into NMR investigated too. Was used 165 male Wistar Rats (*Rattus norvegicus*) weighing 270-310g with guide cannula chronically implanted 2mm above of NMR and divided in two experimental groups: rats maintained with 15g of lab chow/day during 7 days and rats submitted to overnight fasting. After PHE or CLON injection into the NMR the rat was placed in feeding chamber containing rodent chow and water measured previously. Ingestive and non-ingestive behaviors were recorded digitally for 30 minutes. The behaviors was analyzed with EthoLog 2.25 program and classified according to Halford (1998). The Cannula placement into the NMR was observed by histological analysis. The results showed in overnight fast group, the PHE treatment (6 and 20 nM/L) into NMR caused reduction in food intake, increase latency to start feeding and decrease in feeding duration. In rats maintained with 15g of lab chow/day during 7 days the PHE injection (6 and 20 nM/L) induced reduction in food intake and 6 nM/L dose caused also a decrease in food intake frequency. These data confirm the hypothesis that adrenergic receptors activation of NMR stimulates an inhibitory influence on food intake that is less present during food deprivation.

**Key words:** Adrenergic receptors, Food intake, Median raphe nucleus.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Conexões serotoninérgicas no SNC de rato .....	05
Figura2: Representação esquemática das estruturas e neurotransmissores envolvidos na regulação dos neurônios serotoninérgicos .....	07
Figura 3: Aparelho estereotáxico .....	14
Figura 4: Caixa experimental .....	16
Figura 5: Registro digital da sessão experimental .....	17
Figura 6: Desenhos esquemáticos de cortes coronais e corte histológico demonstrando microinjeção no NMR .....	20
Figura 7: Efeitos da Administração de FEN no NMR de ratos em restrição de 15g ração/dia durante 7 dias .....	22
Figura 8: Efeitos da Administração de CLON no NMR de ratos em restrição de 15g ração/dia durante 7 dias .....	24
Figura 9: Efeitos da Administração de FEN no NMR de ratos em jejum noturno.....	27
Figura 10: Efeitos da Administração de CLON no NMR de ratos em jejum noturno.....	29

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Efeitos do tratamento de FEN no NMR sobre a duração e frequência dos comportamentos não ingestivos de ratos em restrição de 15g ração/dia durante 7 dias observados durante 30 minutos após administração de VEH, FEN ou CLON..... 23

Tabela 2 – Efeitos do tratamento de CLON no NMR sobre a duração e frequência dos comportamentos não ingestivos de ratos em restrição de 15g ração/dia durante 7 dias observados durante 30 minutos após administração de VEH, FEN ou CLON..... 25

Tabela 3 – Efeitos do tratamento de FEN no NMR sobre a duração e frequência dos comportamentos não ingestivos de ratos em jejum noturno observados durante 30 minutos após administração de VEH, FEN ou CLON ..... 28

Tabela 4 – Efeitos do tratamento de CLON no NMR sobre a duração e frequência dos comportamentos não ingestivos de ratos em jejum noturno observados durante 30 minutos após administração de VEH, FEN ou CLON ..... 30

## LISTA DE ABREVIATURAS

5- HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
8-OHDPAT	8-hidroxi-2-(Di-N-Propilamino) Tetralin
AD	Adrenalina
AHL	Área hipotalâmica lateral
ANOVA	Análise de variância
ARC	Núcleo arqueado
AGRP	Proteína relacionada ao agouti
CCK	Colecistocinina
CLON	Clonidina
COF	Córtex orbitofrontal
FEN	Fenilefrina
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
HDM	Hipotálamo dorsomedial
HVM	Hipotálamo ventro medial
LC	Locus coeruleus
NA	Noradrenalina
NAcc	Núcleo accumbens
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NMR	Núcleo mediano da rafe
NO	Óxido nítrico
NPV	Núcleo paraventricular
NTS	Núcleo do trato solitário
SNC	Sistema Nervoso Central
VTA	Área Tegmental Ventral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1 Controle Neural da Ingestão de Alimentos.....</b>	<b>01</b>
<b>1.2 Os núcleos da rafe, serotonina e participação no controle da ingestão de alimentos .....</b>	<b>03</b>
<b>1.3 Relação entre o comportamento de ingestão alimentar e o sistema noradrenérgico.....</b>	<b>08</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>11</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
3.1 Geral .....	12
3.2. Específicos .....	12
<b>4. MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1 Animais.....</b>	<b>13</b>
<b>4.2 Procedimentos Cirúrgicos .....</b>	<b>13</b>
<b>4.3 Soluções e Doses Administradas .....</b>	<b>14</b>
<b>4.4 Grupos Experimentais.....</b>	<b>15</b>
<b>4.5 Microinjeções Intracerebrais.....</b>	<b>15</b>
<b>4.6 Caixa de Registro Comportamental.....</b>	<b>16</b>
<b>4.7 Procedimentos Experimentais .....</b>	<b>17</b>
<b>4.8 Categorias Comportamentais Registradas.....</b>	<b>17</b>
<b>4.9 Histologia.....</b>	<b>18</b>
<b>4.10 Análise Estatística .....</b>	<b>19</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
5.1 Efeitos da FEN no NMR sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratos em restrição de 15g ração/dia durante 7 dias.....	21
5.1.1 Efeito sobre a quantidade, latência, duração e frequência da ingestão de alimento.....	21
5.1.2 Efeito sobre os comportamentos de locomoção, imobilidade, exploração vertical, exploração não locomotora e auto limpeza.....	21
5.2 Efeitos da CLON no NMR sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratos em restrição de 15g ração/dia durante 7 dias .....	22
5.2.1 Efeito sobre a quantidade, latência, duração e frequência da ingestão de alimento.....	22
5.2.2 Efeito sobre os comportamentos de locomoção, imobilidade, exploração vertical, exploração não locomotora e auto limpeza.....	24

5.3 Efeitos da FEN no NMR sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratos em jejum noturno.....	26
5.3.1 Efeito sobre a quantidade, latência, duração e frequência da ingestão de alimento.....	26
5.3.2 Efeito sobre os comportamentos de locomoção, imobilidade, exploração vertical, exploração não locomotora e auto limpeza.....	26
5.4 Efeitos da CLON no NMR sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratos em jejum noturno.....	28
5.4.1 Efeito sobre a quantidade, latência, duração e frequência da ingestão de alimento.....	28
5.4.2 Efeito sobre os comportamentos de locomoção, imobilidade, exploração vertical, exploração não locomotora e auto limpeza.....	29
5.5 Efeitos da FEN e CLON no NMR sobre os comportamentos de ingestão hídrica de ratos em restrição de 15g ração/dia durante 7 dias.....	31
5.5.1 Efeitos da FEN sobre a quantidade, latência, duração e frequência da ingestão hídrica.....	31
5.5.2 Efeitos da CLON sobre a quantidade, latência, duração e frequência da ingestão hídrica.....	31
5.6 Efeitos da FEN e CLON no NMR sobre os comportamentos de ingestão hídrica de ratos em jejum noturno.....	31
5.6.1 Efeitos da FEN sobre a quantidade, latência, duração e frequência da ingestão hídrica.....	31
5.6.2 Efeitos da CLON sobre a quantidade, latência, duração e frequência da ingestão hídrica.....	31
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Controle Neural da Ingestão de Alimentos

Nas últimas décadas os temas relacionados a transtornos alimentares tornaram-se problemas de grande relevância em nossa sociedade e despertaram interesse para a compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo. Pesquisadores têm destinado seu trabalho na investigação do referido tema e tem contribuído para nosso conhecimento sobre os circuitos neurais e mediadores químicos que regulam a ingestão de alimento e o peso corporal (Williams et al., 2001).

O “ato de comer” é um comportamento consumatório que envolve a participação de diversos órgãos tecidos e/ou sistemas. A ingestão de alimentos é o meio de obtenção de substrato energético, envolve vários níveis de organização e está sujeita a intensa regulação por sistemas cerebrais homeostáticos e hedônicos (Sapper et al., 2002). O controle homeostático está relacionado a informações ou aferências do estado nutricional/ energético que chegam ao sistema nervoso central oriundo do tecido adiposo, do plasma, do estômago, dos intestinos delgado e grosso, do pâncreas e do fígado (Antunes-Rodrigues et al., 2005). Por outro lado, há o controle hedônico onde o próprio sistema nervoso central avalia tanto as aferências periféricas como as provenientes de outras áreas encefálicas, incluindo as informações visuais, olfatórias, gustativas, orais, sensibilidade lingual e sensibilidade visceral. Observa-se que vários aspectos estão relacionados à ingestão de alimentos, ou seja, seus aspectos nutricionais, sua palatabilidade e quão prazeroso é o alimento (Saper et al., 2002).

O cérebro integra as informações recebidas na forma de sinais hormonais e nervosos sobre as necessidades energéticas ou antecipa as necessidades através de fatores ambientais. é o ponto chave no controle da homeostase energética (Elmquist et al, 2005; Flier, 2004; Schwartz et al, 2000). Os mecanismos de sinalização celular são realizados por várias substâncias químicas tais como os neurotransmissores clássicos, os neuropeptídeos e os hormônios. Os neurotransmissores envolvidos na regulação da ingestão do alimento são as catecolaminas (Van Der Gugtena et al., 1977; Rowland et al., 1996) a serotonina (5-HT) (Blundell, 1984; Montgomery et al., 1986; Fletcher e Paterson, 1989) ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e o glutamato (Stanley et al., 1993a; Stanley et al., 1993b; Burns e Ritter, 1997). Entre os neuropeptídeos estão a galanina, a colecistocinina (CCK) e o neuropeptídeo Y (para revisão Arora e Anubhuti 2006). A leptina, ghrelina (Woods e Seeley,

2000; Reidy e Weber, 2000), peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), insulina, glucagon, GLP-1, GLP-2 são os hormônios que tem destaque nesse processo (Wynne et al., 2005; Suzuki et al., 2010).

Os sinais gerados em resposta ao comportamento alimentar são integrados no córtex cerebral por mecanismos que envolvem principalmente o tronco encefálico e o hipotálamo (Blevins et al., 2002; Funahashi et al., 2002). A sinalização neuroquímica relacionada a saciedade depende de sinais oriundos da passagem de alimentos pelo tubo digestivo, da plenitude gástrica, de informações provenientes dos intestinos e do fornecimento de nutrientes pelo fígado. Esses sinais ascendem o tronco encefálico através do nervo vago com claro papel no término de uma refeição, ou seja, determinando a saciedade (Adan et al., 2008). Quando o nervo vago é seccionado, ocorre aumento na quantidade de alimento ingerido e bem como na frequência das refeições (Yang et al., 1992). Ratos descerebrados os quais receberam uma dieta líquida infundida por cateteres orais não aumentaram o tamanho da refeição (quantidade /volume) quando restritos de alimento, como ratos famintos fazem normalmente (Seeley et al., 1994). Estes dados demonstram o envolvimento dos circuitos neurais do tronco encefálico durante a saciedade (o processo que limita o tamanho da refeição), mas não durante a fome, onde outros circuitos neurais à nível mais rostral são requeridos (Adan et al., 2008).

O hipotálamo contém uma circuitaria neural que conecta diversos núcleos e sítios neurais conferindo uma rede de elaboração e emissão de sinais anorexigênicos (diminuem o apetite) e orexigênicos (aumentam o apetite) que ajustam os sinais relacionados ao apetite e saciedade (Blundell, 1991; Rowland et al, 1996). O núcleo arqueado (ARC), o núcleo paraventricular (NPV), a área hipotalâmica lateral (AHL) e o hipotálamo dorsomedial (HDM) são as principais estruturas hipotalâmicas envolvidas na regulação da ingestão de alimentos e do metabolismo energético (para revisão Horvath et al, 1999; Berthoud, 2002). Estudos demonstram o envolvimento de núcleos hipotalâmicos no comportamento alimentar. Lesões eletrolíticas no NPV e ARC resultam em hiperfagia e obesidade (Leibowitz et al., 1981; Choi e Dallman, 1999), fato que também ocorre quando o hipotálamo ventro medial (HVM) é lesionado da mesma forma (Hetherington e Ranson, 1940 apud Adan et al., 2008; Hoebel e Teitelbaum, 1966). A estimulação elétrica da AHL causa o aumento do consumo de alimento mesmo que o animal esteja saciado (Herberg e Blundell, 1967). O ARC recebe fortes aferências intra-hipotalâmicas de núcleos como o NPV, HDM, HVM e algumas aferências que partem da AHL (Guan e cols,



2001). Estruturas extra-hipotalâmica de estruturas como a amígdala, núcleo intersticial da estria terminal e vários locais do tronco encefálico, incluindo o núcleo do trato solitário (NTS) (Li ET al., 1999; De Falco et al., 2001) e o núcleo mediano da rafe (NMR) também enviam projeções para o ARC (Neary et al., 2004).

O controle hedônico está associado à representatividade ou significância do alimento em uma determinada situação (Woods e Seeley, 2000; Fulton, 2010). Este tipo de controle não está relacionado aos sinais do processo digestório, o controle hedônico e associado ao fato da comida ser saborosa e ser gratificante. A motivação para comer como recompensa e antecipação das refeições envolve o núcleo accumbens (NAcc), que é importante no processamento de recompensa e no controle da ingestão de alimentos (Hernandez e Hoebel, 1988; Mendoza et al., 2005; Salamone et al, 2002). O NAcc tem conexões com duas regiões do córtex cerebral e do sistema límbico, como a amígdala e o córtex orbitofrontal (COF) o AHL e área tegmental ventral (VTA) (Powell e Leman 1976), ambas envolvidas na motivação para comer (Kelley et al., 2005).

A idéia de que os neurônios do hipotálamo desempenham um papel crítico no controle neural de alimentação e no controle do tamanho da refeição especificamente, tem estado conosco por algum tempo (Grill, 2010). Essa opinião é contestada por experimentos com ratos descerebrados que eliminam a comunicação entre o tronco encefálico e hipotálamo. Esses experimentos mostram as respostas aos mesmos estímulos ingestivos em ratos descerebrados e ratos intactos são comparáveis, demonstrando que o processamento hipotalâmico não é um requisito neural e os circuitos do tronco encefálico são suficientes para controlar o tamanho da refeição (Grill e Norgren, 1978).

## **1.2 Os núcleos da rafe, serotonina e participação no controle da ingestão de alimentos.**

Estruturas do tronco encefálico como o núcleo parabraquial, o NTS, os núcleos da rafe e o locus coeruleus (LC) também participam da regulação do comportamento alimentar (Wirtshafter, 2001; Adell et al., 2002; Berthoud, 2002). O NTS recebe sinais de saciedade provenientes da estimulação química ou mecânica do estômago e intestino delgado, durante a ingestão alimentar, assim como sinais neurais relacionados ao metabolismo energético (Friedman et al., 1999) e sinais humorais das células neuroendócrinas do revestimento do lúmen intestinal (Moran e Schwartz, 1994). As informações que chegam ao NTS são enviadas ao

córtex através de estruturas do tronco encefálico como o LC e os núcleos da rafe (Berthoud, 2002), e diretamente para núcleos hipotalâmicos como o ARC e NPV. Essas conexões recíprocas entre o NTS e núcleos da rafe de um lado e aferências diretas para núcleos hipotalâmicos de outro nos demonstra ampla visão dos mecanismos na regulação da fome/ saciedade e da homeostase energética (Schwartz et al., 2000).

Comparações anatômicas levam a conclusão que o NPV é extensivamente inervado pelo NMR (Vertes e Martin, 1988; Fletcher e Coscina, 1993; Lowry, 2002; Perrin e cols., 2003) sendo o NPV um dos principais locais onde a 5-HT atua modulando a ingestão de alimento em mamíferos (Blundell e Halford, 1996; Rowland et al., 1996; Halford e cols., 1998; Leibowitz e Alexander, 1998; Wurtman e Wurtman, 1998; De Vry e Schreiber, 2000; Collin et al., 2002; Currie e cols., 2002).

A 5-HT compõe o grupo das aminas biogênicas (neurotransmissores) que incluem também as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina) (Rossi e Tirapegui, 2003), e estão envolvidas na regulação de funções viscerais e comportamentais. Destaca-se o papel da 5-HT na capacidade de aprendizagem e cognição (Meneses, 1999), comportamentos emocionais como a ansiedade (Jones e Blackburn, 2002) e adaptação ao estresse (Graeff et al., 1996) comportamento sexual (Kondo and Yamanouchi, 1997; Matsumoto and Yamanouchi, 1997; Yurino et al., 2001) e nos diversos aspectos patológicos relacionados a ingestão de alimentos (Barbarich, 2002; Patrick, 2002),

O efeito da 5-HT na regulação da ingestão de alimentos é associado a saciedade e supressão da alimentação. Manipulações elevando os níveis de 5-HT, especialmente nos centros de controle do apetite no hipotálamo, tem como resultado efeitos anoréxicos, enquanto o bloqueio 5-HT aumenta significativamente a ingestão de alimentos (Blundell, 1992; Halford et al., 2007).

Está bem estabelecido na literatura que há no sistema nervoso central (SNC) um grupamento neuronal localizado na linha média do tronco encefálico, e este inclui neurônios serotoninérgicos na sua composição (Wirtshafter, 2001; Lechin et al., 2002b, Takase e Nogueira, 2008). Por estarem localizados na linha de junção do tronco encefálico (mediana) foram chamados de “núcleos da rafe” que significa costura em francês (Kandel et al., 2003). Dahlstrom e Fuxe (1964 apud Vertes e Linley, 2007) identificaram nove grupos de células contendo 5-HT em suas estruturas e atribuíram nomes de B1 a B9.

As designações alfa-numéricas para esses núcleos foram substituídos pelos nomes que refletem a sua localização anatômica no tronco encefálico. São chamados de núcleos da rafe caudais os que estão dispersos ao longo do bulbo sendo: o núcleo pálido (B1), obscuro (B2) e Magno (B3) tendo suas projeções para o tronco encefálico inferior. Os núcleos da rafe rostrais estão localizados na ponte e mesencéfalo e são: o núcleo pontino (B5), dorsal (B6 e B7) e mediano da rafe (B5, B7 e B8) ascendendo o tronco encefálico superior e prosencéfalo basal pelo feixe prosencefálico medial (Hensler, 2006; Vertes e Linley, 2007). Estes núcleos também fazem conexões com outros núcleos do tronco encefálico (Stratford e Wirtshafter, 1988), cerebelo (Torigoe, Blanks e Precht, 1986) e medula espinhal (Bower et al., 1991, Harding et al., 2004). O único núcleo que permanece com a nomenclatura original é o B9 e tem recebido menos atenção que os demais (Hensler, 2006; Vertes e Linley, 2007). As os núcleos da rafe, bem como as projeções serotonérgicas em cérebros de ratos é demonstrado na figura 1 (Kandel et al., 2003).

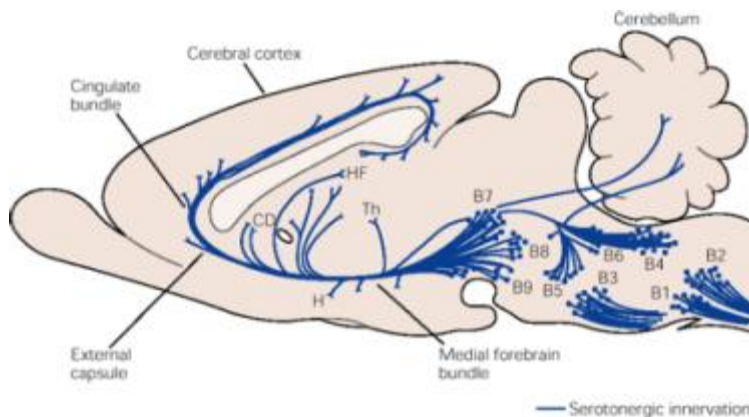


Figura 1: Conexões serotonérgicas no SNC de rato. Núcleo pálido (B1), obscuro (B2), Magno (B3) tendo suas projeções para o tronco encefálico inferior. Núcleo pontino (B5), dorsal (B6 e B7) e mediano da rafe (B5, B7 e B8) - núcleos da rafe rostrais. B9 nomenclatura original. CD = núcleo caudado, HF = formação hipocampal, H = hipotálamo e Th = tálamo. (Adaptado de Kandel et al., 2003)

A maior parte das fibras serotonérgicas que inervam as estruturas prosencefálicas do SNC origina-se primariamente do núcleo dorsal da rafe (NDR) e do NMR (Adell et al., 2002; Kandel et al., 2003, Lowry,

2002; Perri et al., 2003). Além destes grupos da rafe, trabalhos histoquímicos têm demonstrado a presença de um número relativamente significativo de neurônios serotonérgicos na região mais periférica (lateralmente) na ponte e mesencéfalo (Arita et al., 1993; Vertes e Crane, 1997).

Há algumas particularidades anatômicas que merecem atenção no NDR e NMR. Enquanto as fibras do NDR são finas com pequenas varicosidades, as fibras do NMR são espessas e apresentam botões ovais que estabelecem sinapses com a soma e dendritos das células alvo (para revisão: Hensler, 2006). Outra característica anatômica desses núcleos é que há projeções recíprocas entre eles (Vertes Fortin e Crane, 1999).

O NDR estabelece conexões com amígdala, hipocampo e septo lateral, núcleo accumbens e principalmente para o córtex cerebral (Vertes e Linley, 2007). Já o NMR tem eferências para região perifornical, área pré-óptica, órgão subfornical e núcleos hipotalâmicos especialmente o NPV onde possivelmente a 5-HT provinda da rafe mesencefálica participa no controle da ingestão de alimentos (Vertes e Martin, 1988; Fletcher e Coscina, 1993; Lowry, 2002; Perrin et al., 2003).

A atividade dos neurônios serotonérgicos pode ser controlada por dois mecanismos principais: a autorregulação e a heterorregulação. O mecanismo de autorregulação está relacionado à influência da 5-HT sobre os receptores presentes nos próprios neurônios serotonérgicos, já a heterorregulação se dá pela ação de neurônios não serotonérgicos ou aferências que atuam sobre os neurônios desse núcleo (Leger e Wiklund, 1982; Vertes e Crane, 1997)

A autorregulação dos neurônios serotonérgicos no NMR se dá através de receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados na região pré-sináptica sendo que este núcleo é a estrutura encefálica com a maior densidade desse tipo de receptor (Adell e Artigas, 1999; Adell et al, 2002). Esses receptores funcionam como sensores que respondem com a redução da liberação serotonérgica quando a concentração do transmissor endógeno no espaço celular torna-se excessiva (Adell et al., 2002) sendo então denominados como auto-receptores somatodendríticos (Adell et al., 2002; Hensler, 2006) (figura 2). De acordo, o tratamento no NMR com agonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> de 8-Hidroxi-2-(Di-N-Propilamino) Tetralina (8-OH-DPAT) estimula a ingestão de alimento devido da inibição da atividade neuronal serotonérgica e como consequência menor liberação de 5-HT em regiões prosencefálicas terminais (Bendotti e Samanin, 1986; Currie e Coscina, 1993; Fletcher e Coscina, 1993).

Outros neurotransmissores além da 5-HT podem influenciar a ação dos neurônios serotonérgicos do NMR pelo mecanismo de heterorregulação conforme Adell et al., 2002 (figura 2). O nível extracelular de neurotransmissores como GABA (Judge et al., 2006), noradrenalina (NA), glutamato, histamina, dopamina, óxido nítrico (NO) e glicina podem alterar a frequência de disparos dos neurônios 5-HT (Wirtshafter, 2001, Adell et al., 2002; Lechin et al., 2006) e afetar potencialmente as diferentes etapas do comportamento ingestivo.

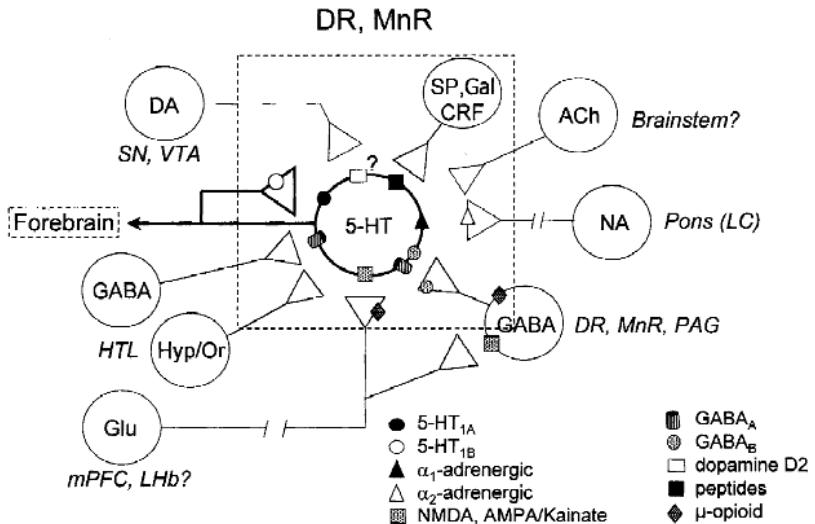


Figura 2: Representação esquemática das estruturas e neurotransmissores envolvidos na regulação dos neurônios serotonérgicos. (adaptado de Artigas et al., 2002). As principais áreas são: núcleo pontino = pons; lócus coeruleus = LC; córtex pré-frontal = mPFC; habenua lateral = LHb; substância nigra = SN; substância cinzenta periaquedutal = PAG, áreas hipotalâmicas diversas = HTL, DR = núcleo dorsal da rafe; MnR = núcleo mediano da rafe; área tegmental ventral = VTA. Neurotransmissores envolvidos: noradrenalina = NA; glutamate = Glu, ácido gama-aminobutírico = GABA; fator liberador de corticotrofina = CRF (Adaptado Adell et al., 2002).

A heterorregulação de neurônios serotonérgicos do NMR merece atenção devido a particularidades anatômicas desse núcleo relativa a conexões e receptores adrenérgicos. O NMR recebe densa inervação noradrenérgica oriunda do LC, da área tegmental lateral (ATL) e dos núcleos catecolaminérgicos do tronco encefálico (Lechin, 2006), além

de o próprio NMR possuir receptores adrenérgicos (Adell et al.,1999), (figura 2). O mecanismo de heteroregulação e sua relação com o sistema serotoninérgico e noradrenérgico é de suma importância em nosso estudo.

### **1.3 Relação entre o comportamento de ingestão alimentar e o sistema noradrenérgico.**

Sistemas catecolaminérgicos são circuitos neurais e endócrinos que usam adrenalina (AD) e/ou NA como neurotransmissores e têm função em sistemas que regulam a ingestão de alimentos, cognição, emoção, reprodução entre outros (Marino-Neto et al., 2004). O LC é o principal local da síntese de NA cerebral (Kandel et al., 2003) e envia projeções tanto para o NDR como para o NMR. Considerando as particularidades que tangem as projeções noradrenérgicas LC para o NDR e para o NMR observa-se que existem dois circuitos noradrenérgicos interligados, mas diferentes entre si. O primeiro circuito é composto por conexões entre o LC, NDR e córtex cerebral enquanto que o segundo circuito é formado pelo NMR recebendo aferências da área tegmental lateral, LC/subcoeruleus, do grupamento de corpos celulares A1 e A2 e projeções de neurônios contendo adrenalina encontrada no grupamento celular C1+C2 em núcleos do bulbo (Costall et al, 1976; Ennis e Aston-Jones, 1987; Freitas et al., 2005; Morgane et al, 1995;. Vertes et al, 1999; Lechin et al., 2006). Adicionalmente, no NMR e NDR há presença de noradrenalina e suas enzimas de síntese como tirosina hidroxilase e dopamina- $\beta$  hidroxilase e, especificamente no NMR há altos níveis de RNAm para receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos (Day et al., 1997) e níveis moderados de receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos (Rosin et al., 1993)

Os receptores adrenérgicos são pertencentes a família dos receptores acoplados a proteína G e critérios farmacológicos tem dividido em nove subtipos de receptores:  $\alpha$ 1 (A,B,D),  $\alpha$ -2 (A,B,C) e  $\beta$  (1,2,3) (Philip e Hein, 2004). Cada umas dessas classes de receptores está associada a um sistema específico de segundos mensageiros. Assim, os receptores  $\alpha$ 1 são acoplados a proteína Gq, estimula a fosfolipase C, gerando trifosfato inositol e diacilglicerol como segundos mensageiros, liberando cálcio. Os receptores  $\alpha$ 2 estão negativamente acoplados as proteínas Gi, que atua inibindo a adenilciclase e reduzem a formação de AMPc, além de inibir os canais de cálcio. Os receptores  $\beta$  são acoplados a proteína Gs, a qual ativa a adenilato ciclase, aumenta o AMPc intracelular. Como receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos são acoplados a diferentes proteínas G podem, conforme a quantidade e o tipo de

receptores expressos em determinado local, ativar mecanismos intracelulares sinérgicos ou oponentes, variando a resposta evocada pelo ligante (Rang e Dale, 2007)

Estudos relacionados a presença e função de receptores adrenérgicos no NMR tem sido realizados nas últimas décadas. A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) consiste em uma neurotoxina que é seletivamente captada pelas terminações nervosas noradrenérgicas, e destrói essa terminação noradrenérgica. A lesão em vias noradrenérgicas centrais com 6-OHDA revelou que os receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos são localizados nos corpos celulares de neurônios serotoninérgicos (Gallager e Aghajanian, 1976 apud Hopwood and Stamford, 2001), enquanto que  $\alpha$ 2-adrenérgicos parecem estar situados em terminais pré-sinápticos de terminações nervosas noradrenérgicas (Yoshioka et al, 1992; Haddjeri et al, 1996) (figura 2).

Estudos *in vitro* demonstram que o tratamento no NMR com agonista de receptor  $\alpha$ -1 adrenérgico (cirazoline) causou significativo aumento (embora transitório) da liberação de 5-HT enquanto a administração do antagonista de receptor  $\alpha$ -1 adrenérgico (prazosin) suprimiu a liberação basal de 5-HT tanto no NMR como no NDR sendo que essa influência foi maior no NMR (Adell et al., 2002; Judge e Gartside, 2006). Outro estudo utilizando agonista de receptor  $\alpha$ -1 adrenérgico menos potente, a fenilefrina (FEN), verificou que os neurônios do NMR dispararam de forma lenta e regular na presença dessa droga (Judge e Gartside, 2006). Pelo fato do NMR receber aferências catecolaminérgicas, e os neurônios serotoninérgicos desse núcleo possuírem em seus corpos celulares receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos, sugere-se que a NA endógena possa exercer um controle tônico estimulatório direto sobre a liberação de 5-HT através dos receptores adrenérgicos do subtipo  $\alpha$ -1 localizados nos corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos do NMR (Gallagher e Aghajanian, 1976 apud Hopwood and Stamford, 2001). Assim como no NMR o os neurônios serotoninérgicos do NDR exercem controle excitatório tônico pelos receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1 (O'Leary et al., 2007).

Os receptores  $\alpha$ -2 adrenérgico também afetam a liberação de serotonina pelo NMR (Adell et al., 2002). O antagonismo dos receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos aumenta os níveis extracelulares de 5-HT no NMR e NDR. Em contrapartida, drogas agonistas de receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos podem indiretamente reduzir os níveis de 5-HT devido a menor liberação de NA e redução do tônus noradrenérgico facilitatório pós-sináptico de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos (O'Leary et al., 2007). Experimentos utilizando microdiálise tiveram como resultado a redução

de 30% na liberação de 5-HT após a administração de clonidina (CLON) um agonista de receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos (Adell e Artigas, 1999).



## 2. JUSTIFICATIVA

Estudos realizados no nosso laboratório revelam que a injeção de adrenalina (AD), mas não de noradrenalina, no NMR diminuiu a ingestão de alimentos e antecipou o término da ingestão em ratos submetidos a restrição alimentar (15g/dia durante 7 dias), fato atribuído a ativação de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos presentes em neurônios serotoninérgicos do NMR e consequente ação inibitória da 5HT sobre a ingestão de alimentos (Maidel et al., 2007).

Em outro trabalho do nosso grupo, o tratamento com AD no MNR de ratos com livre acesso ao alimento causou hiperfagia, possivelmente devido a ação adrenérgica de  $\alpha$ -2 adrenoceptores desse núcleo, e consequente redução na disponibilidade de NA na sinapse suprimindo assim a liberação de 5-HT e sua ação inibitória no comportamento alimentar (dos Santos et al. 2009). Reforça essa sugestão o fato de a injeção de clonidina no NMR de ratos saciados provocar resposta hiperfágica de intensidade, duração e frequência, similar àquela induzida pela AD (Mansur et al, 2010).

A injeção de FEN no NMR de ratos saciados não modificou os comportamentos ingestivos, pois sugere-se que em animais saciados a atividade adrenérgica mediada por  $\alpha$ -1 adrenoceptores seja elevada e consequente tônus inibitório da 5-HT sobre a ingestão de alimento (Mansur et al, 2011).

Diante desses fatos, para mostrar a participação dos  $\alpha$ -1 adrenoceptores do NMR no controle da ingestão de alimento, torna-se relevante estudar os seus efeitos sobre o comportamento ingestivo em animais privados de alimento.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Analisar os efeitos da injeção de agonistas adrenérgicos no núcleo mediano da rafe sobre os comportamentos relacionados a ingestão de alimentos em ratos Wistar em privação de alimento.

#### 3.2. Específicos

- Analisar os efeitos da injeção do agonista de receptor  $\alpha$ -1 adrenérgico fenilefrina (FEN) no núcleo mediano da rafe, sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos em ratos em restrição de 15g ração/dia durante 7 dias e em ratos submetidos ao jejum noturno.
- Analisar os efeitos da injeção do agonista de receptor  $\alpha$ -2 adrenérgico clonidina (CLON) no núcleo mediano da rafe, sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos em ratos em restrição de 15g ração/dia durante 7 dias e em ratos submetidos ao jejum noturno.

## 4. MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 165 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso corporal entre 270 e 310 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram recebidos e alojados em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm), forradas com maravalha, dispoendo de água e alimento granulado (CR-1, Nuvilab) *ad libitum*, exceto quando os modelos de restrição de alimento foram iniciados. Ficaram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, com temperatura controlada em  $21 \pm 2$  °C e ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo o início do período de luz com início as 07:00 h e término às 19:00 h. Todos os procedimentos experimentais desse estudo foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo o protocolo de experimentação aprovado pelo Comitê de Ética ao Uso de Animais (CEUA) n° PP00367 da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### 4.2 Procedimentos Cirúrgicos

Para que fosse possível administração de drogas diretamente no local de estudo, neste caso o NMR, todos os ratos foram submetidos ao processo de cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas-guias e posterior microinjeção da droga na região desejada. Para implantação da cânula guia os animais foram anestesiados com mistura de xilazina e cloridrato de cetamina (13 mg/Kg de xilazina; 87 mg/Kg de cloridrato de cetamina) injetada por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram adaptados ao aparelho estereotáxico (Marca Insight, Ribeirão Preto, Brasil, demonstrado na figura 3) tendo a cabeça fixada por intermédio de barras posicionadas nos condutos auditivos e incisivos superiores. Foi realizada tricotomia, assepsia e incisão longitudinal para exposição da calota craniana. Após esse procedimento foi feita raspagem do perióstio para melhor visualização das estruturas de referência. A seguir, uma cânula guia feita a partir de um segmento de agulha hipodérmica (23G BD ®), com 0,7 mm de diâmetro externo e 18 mm de comprimento, foi posicionada 2 mm acima do núcleo mediano da rafe para não lesionar o núcleo, sendo as coordenadas: antero-posterior: -7,8 mm; deslocamento lateral: 3,00 mm; dorso-ventral 7,00

mm. Para evitar possíveis lesões as quais poderiam levar o animal a morte durante o processo cirúrgico, em especial o seio sagital superior, a haste foi inclinada em 20°. Estas coordenadas foram determinadas a partir atlas estereotáxico de cérebro de ratos de Paxinos e Watson (2007). A cânula foi fixada à calota craniana por meio de 2 parafusos de aço inoxidável e envolvida por acrílico auto-polimerizável. Um mandril de aço inoxidável foi introduzido no interior da cânula para evitar seu entupimento. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, os ratos foram conduzidos ao biotério e mantidos individualmente em caixas de polipropileno, com água e ração *ad libitum*, sendo manipulados para verificação da cânula guia e para limpeza das caixas de hospedagem a cada dois dias. Após período de uma semana para recuperação da cirurgia, os procedimentos experimentais foram iniciados.



Figura 3 – Aparelho Estereotáxico

### 4.3 Soluções e Doses Administradas

As seguintes drogas e doses foram utilizadas:

- Veículo (VEH): solução de NaCl 0,9% estéril, livre de pirogênicos, pH 7,4, volume de 0,2µl.

- Agonistas adrenérgicos:  $\alpha_1$  (Hidroclorato de Fenilefrina) e  $\alpha_2$  (Hidroclorato de Clonidina) nas doses de 6 e 20 nM.

#### 4.4 Grupos Experimentais

Durante uma semana após o procedimento cirúrgico os ratos permaneceram no biotério setorial com livre acesso a alimento e água. Após esse período os ratos foram mantidos em caixas individuais e separados em dois grupos experimentais:

1. Restrição de 15g ração/dia durante 7 dias: Nesse grupo os animais foram mantidos com 15 gramas de ração (CR-1, Nuvilab) por dia, oferecida aos ratos às 17:00 h durante 7 dias. No sexto e sétimo dia os animais foram ambientados na caixa de registro experimental em condições similares ao do experimento com exceção da injeção intracerebral sendo que no oitavo dia foi realizado o experimento. A quantidade de ração consumida durante a sessão experimental era pesada e a diferença para atingir as 15 gramas diárias era acrescida e colocada na caixa de hospedagem as 17:00 h. Para registrar a perda de peso corporal ponderal do animal ao longo da restrição, o peso individual foi registrado no primeiro dia de restrição, antes de cada ambientação e no dia do experimento. Em todos os momentos os ratos tiveram livre acesso à água (Maidel et al., 2007).

2. Jejum Noturno: Nesse grupo, o dia que antecedia o experimento, 1 hora antes do desligamento das luzes do biotério o alimento de cada animal o alimento era totalmente retirado de sua caixa hospedagem. Os ratos desse grupo permaneceram aproximadamente 18 h sem acesso ao alimento, mas permaneceram com livre acesso a água em todos os momentos.

#### 4.5 Microinjeções Intracerebrais

Os ratos dos grupos controle receberam injeção de solução salina 0,9%. Os grupos experimentais foram tratados no NMR com FEN ou CLON. Cada rato recebeu apenas uma microinjeção. A microinjeção intracerebral das drogas ou do veículo foi realizada por meio de agulha injetora (0,3 mm de diâmetro, 20 mm de comprimento), que foi introduzida na cânula-guia e conectada por tubo de polietileno (PE10) a uma micro-seringa SGE® (capacidade de 1 $\mu$ l). A agulha injetora excedeu o tamanho da cânula-guia em 2 mm. Após inserção de agulha foi aguardado 1 minuto antes da administração da droga. Em seguida foi

iniciada a administração da droga de forma contínua, ou seja, 0,2  $\mu\text{l}$  da solução durante 1 minuto seguida do aguardo do mesmo tempo com a agulha no sitio da injeção para evitar refluxos sendo o volume injetado sempre de 0,2  $\mu\text{l}$  para qualquer uma das condições de tratamento.

#### 4.6 Caixa de Registro Comportamental

A caixa de registro comportamental apresentada na figura 4, é confeccionada em vidro transparente de 4 mm de espessura, possuindo as medidas de comprimento e de largura similares aos da caixa de hospedagem (49 X 34 cm), porém, tendo a medida de altura maior (40 cm) para evitar fugas. A superfície inferior da caixa e as três paredes laterais são cobertas com plástico adesivo preto, conforme figura 5. Uma parede lateral da caixa é mantida com vidro transparente onde está colocado um espelho em angulação que não permite ao animal visualizar sua imagem refletida durante o experimento, mas que possibilita ao experimentador a visualização lateral dos seus comportamentos e o registro digitalizado dos mesmos, esta, demonstrada na figura 5. O registro do comportamento animal durante o experimento foi realizado através de uma webcam posicionada sobre a caixa experimental.

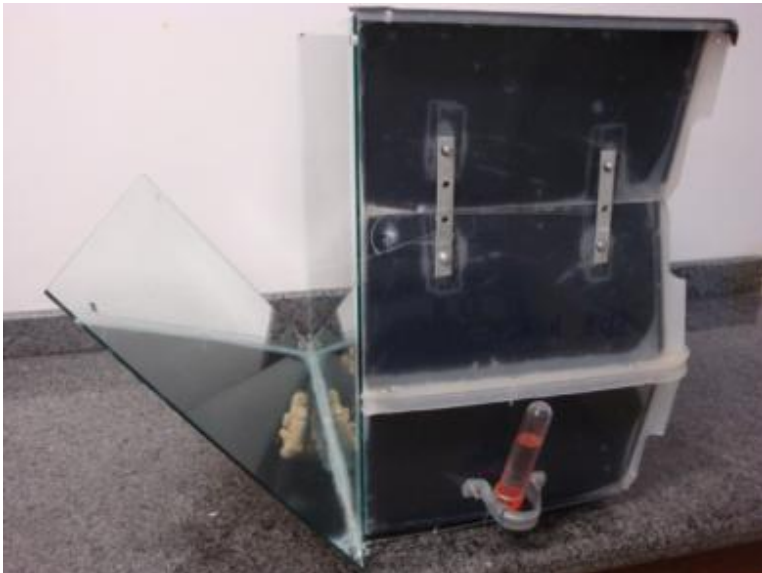


Figura 4 – Caixa Experimental

#### 4.7 Procedimentos Experimentais

No dia do experimento o rato foi retirado da sua caixa de hospedagem e tratado com uma das 3 injeções: veículo (solução salina 0,9%), FEN ou CLON. Imediatamente após a microinjeção no NMR o animal foi colocado na caixa de registro experimental onde já estava depositada ração granulada e água previamente pesados. Imediatamente após a injeção o rato foi colocado na caixa de registro experimental e o registro digital da sessão (30 minutos) foi iniciado. Ao término da sessão, a ração restante na caixa experimental foi recolhida e pesada, sendo o consumo de alimento avaliado pela diferença entre a quantidade de ração inicial e final. Todos os experimentos ocorreram entre 13:30h e 16:30h. O comportamento animal, durante o experimento, foi categorizado de acordo com Halford (1998).



Figura 5 – Registro digital da sessão experimental.

#### 4.8 Categorias Comportamentais Registradas

Os registros digitalizados foram analisados com o auxílio do programa Etholog 2.25 (Otoni, 2000). As variáveis avaliadas foram a

latência (tempo em segundos para realizar pela primeira vez uma resposta comportamental), frequência (número de vezes, durante os 30 minutos da sessão em que o rato exibiu determinado comportamento) e a duração (tempo, em segundos, de execução de determinado comportamento) dos seguintes comportamentos:

- Ingestão do Alimento (comer): quando o animal estiver efetivamente se aproxima do comedouro, e efetivamente ingere alimento sólido, com comportamentos característicos de deglutição.

- Ingestão de Água (beber): quando o animal se aproxima do bebedouro e lambe sua ponta;

- Exploração do alimento: quando o animal manipula a ração, sem ingeri-la;

- Exploração não locomotora: quando o animal estiver ativamente explorando o ambiente com a cabeça, seja cheirando o ar ou o chão, sem tirar as quatro patas do local onde se encontra;

- Exploração vertical: quando o animal estiver explorando o ambiente apoiado somente nas patas traseiras, estando as patas dianteiras livres e não apoiadas no fundo da caixa (ereto).

- Manutenção (auto limpeza): quando o animal apresentar comportamentos típicos de auto limpeza, como: limpar a cabeça com as patas, limpar as unhas ou coçar o corpo com a boca;

- Locomoção: quando o animal estiver deambulando pela caixa, sem apresentar qualquer outro dos comportamentos já citados;

- Imobilidade: quando o animal permanecer imóvel, sem apresentar qualquer outro comportamento já citado.

## 4.9 Histologia

Ao final do experimento o rato foi anestesiado com excesso de CO<sub>2</sub>, então se realizou a perfusão transcardíaca com solução salina 0,9%, seguida por solução de formalina 10%. O posicionamento das cânulas foi verificado por meio da injeção de 0,2µl de Azul de Evans a 10%, administrados através da cânula-guia, com o auxílio da cânula injetora para marcar os locais de injeção no NMR. Depois de dissecados, os cérebros fixados por 24 horas na solução de formalina a 10% em seguida foram incubados em álcool etílico hidratado 70° INPM até serem cortados em fatias de 100 µm de espessura em um vibrátomo. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e permaneceram secando por 24 horas. Em seguida foram coradas pelo método de Nissl e permaneceram secando por igual período de tempo antes de serem



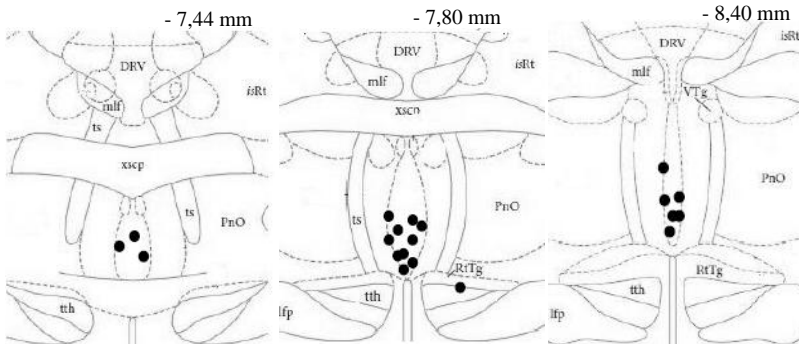
analisadas ao Microscópio Óptico (MO). A reprodução gráfica dos cortes e dos pontos de injeção analisados ao MO foi realizada a partir do Atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (2007).

#### **4.10 Análise Estatística**

Os dados obtidos após o tratamento do NMR com FEN ou CLO nos animais submetidos à restrição de alimento ao longo de 07 dias foram analisados por intermédio de análise de variância (ANOVA) de uma via. O mesmo procedimento estatístico foi adotado para analisar os dados dos animais submetidos ao jejum noturno e tratados com FEN ou CLO. A comparação entre as médias foi realizada utilizando-se o teste de *post-hoc* Duncan. Apenas os valores de probabilidade de acaso menores que 5% foram considerados significantes ( $p < 0,05$ .)

## 5. RESULTADOS

Desenho esquemático de cortes coronais do NMR retirados do Atlas Paxinos e Watson (2007) demonstrando os locais das microinjeções de VEH, FEN e CLON em ratos restritos de alimentos e em jejum noturno. O número de pontos na figura é menor que o de animais utilizados devido à sobreposição de pontos.



BREGMA - 8,16



Figura 6 – Desenhos esquemáticos de cortes coronais e corte histológico demonstrando microinjeção no NMR. NRM = núcleo mediano da rafe; mlf = fascículo longitudinal medial; Pn = núcleo pontino; PnO = núcleo pontino, porção oral Barra de escala 100  $\mu$ m.

## **5.1 EFEITOS DA FEN NO NMR SOBRE OS COMPORTAMENTOS INGESTIVOS E NÃO INGESTIVOS DE RATOS EM RESTRIÇÃO DE 15g RAÇÃO/DIA DURANTE 7 DIAS.**

### **5.1.1 Efeito sobre a Quantidade, Latência, Duração e Frequência da Ingestão de Alimento.**

A análise dos dados através da ANOVA de uma via mostrou que a quantidade de alimento ingerido [ $F(2,24) = 12,25$ ;  $p < 0,0002$ ] e a frequência dos episódios de ingestão de alimento [ $F(2,24) = 4,07$ ;  $p < 0,0298$ ] dos ratos submetidos à restrição de 15g ração/ dia durante 7 dias foram alterados pelo tratamento com FEN no NMR. A quantidade de alimento ingerido após a administração de ambas as doses de FEN (6 e 20 nM) no MR foi menor que do que a do grupo controle. O efeito hipofágico provocado pela menor dose da droga foi acompanhado pela redução na frequência dos episódios de ingestão de alimento. A latência para iniciar o consumo de alimento bem como a duração da ingestão de alimento não foi afetada por nenhuma das doses de FEN injetada no NMR (Figura 7). O comportamento de ingestão de água não ocorreu em nenhum animal tratado com FEN no NMR.

### **5.1.2 Efeito sobre os comportamentos de Locomoção, Imobilidade, Exploração Vertical, Exploração não Locomotora e Auto Limpeza.**

A ANOVA de uma via indica que a administração de FEN no NMR promoveu modificações na duração e na frequência do comportamento de imobilidade. Apenas a maior dose de FEN (20 nM) provocou aumento na duração do comportamento de imobilidade [ $F(2,24) = 7,85$ ;  $p < 0,0023$ ] acompanhada pelo aumento na frequência dos episódios do mesmo comportamento [ $F(2,24) = 4,77$ ;  $p < 0,0179$ ]. ANOVA de uma via indica que a duração da exploração não-locomotora foi afetada pelo tratamento de FEN no MR [ $F(2,24) = 5,76$ ;  $p < 0,0090$ ]. O teste de post-hoc revelou que ambas as doses (6 e 20 nM) de FEN aumentaram a duração desse comportamento (tabela 1). Não houve modificações estatisticamente significantes nos demais comportamentos não ingestivos.

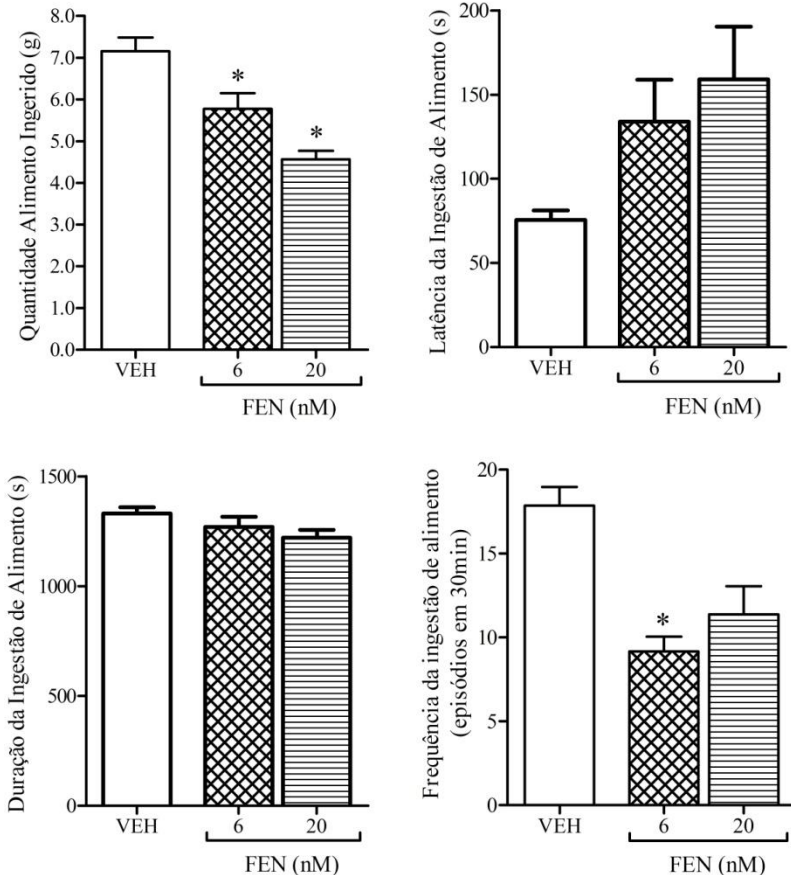


Figura 7 – Administração de veículo (0, n = 13) e de FEN nas doses de 6nM (n = 6) e 20nM (n = 8) no NMR de ratos em restrição 15g ração/ dia durante 7 dias. Os dados representam a média ± EPM \*p < 0.05 comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan.

## 5.2 EFEITOS CLON NO NMR SOBRE OS COMPORTAMENTOS INGESTIVOS E NÃO INGESTIVOS DE RATOS EM RESTRIÇÃO DE 15g RAÇÃO/DIA DURANTE 7 DIAS.

### 5.2.1 Efeito sobre a Quantidade, Latência, Duração e Frequência da Ingestão de Alimento.

Comportamentos	Dose (nM)	Duração (s) (total)	Frequência (Episódios)
Locomoção	0	174 ± 28	46 ± 6
	6	158 ± 30	42 ± 9
	20	125 ± 30	30 ± 8
Imobilidade	0	9 ± 3	3 ± 1
	6	10 ± 6	2 ± 1
	20	116 ± 41*	8 ± 2*
Exploração Vertical	0	71 ± 10	27 ± 4
	6	102 ± 30	27 ± 8
	20	39 ± 12	15 ± 5
Exploração Locomotora Não	0	84 ± 10	26 ± 3
	6	151 ± 30*	30 ± 4
	20	160 ± 23*	25 ± 5
Auto Limpeza	0	25 ± 6	3 ± 1
	6	32 ± 4	4 ± 1
	20	50 ± 16	5 ± 2

Tabela 1 – Efeitos do tratamento de FEN no NMR sobre a duração e frequência dos comportamentos não ingestivos de ratos em restrição de 15g ração/dia durante 7 dias observados durante 30 minutos após administração de veículo (0, n = 13) e de fenilefrina nas doses de 6nM (n = 6) e 20 nM (n = 8). Os dados representam a média ± EPM \*p < 0.05 comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan.

Em contraste com os efeitos da FEN sob os comportamentos ingestivos, nenhuma dose de CLON injetada no NMR de ratos em restrição 15g ração/ dia durante 7 dias afetou a quantidade, frequência, duração e latência do comportamento ingestivo (figura 8).

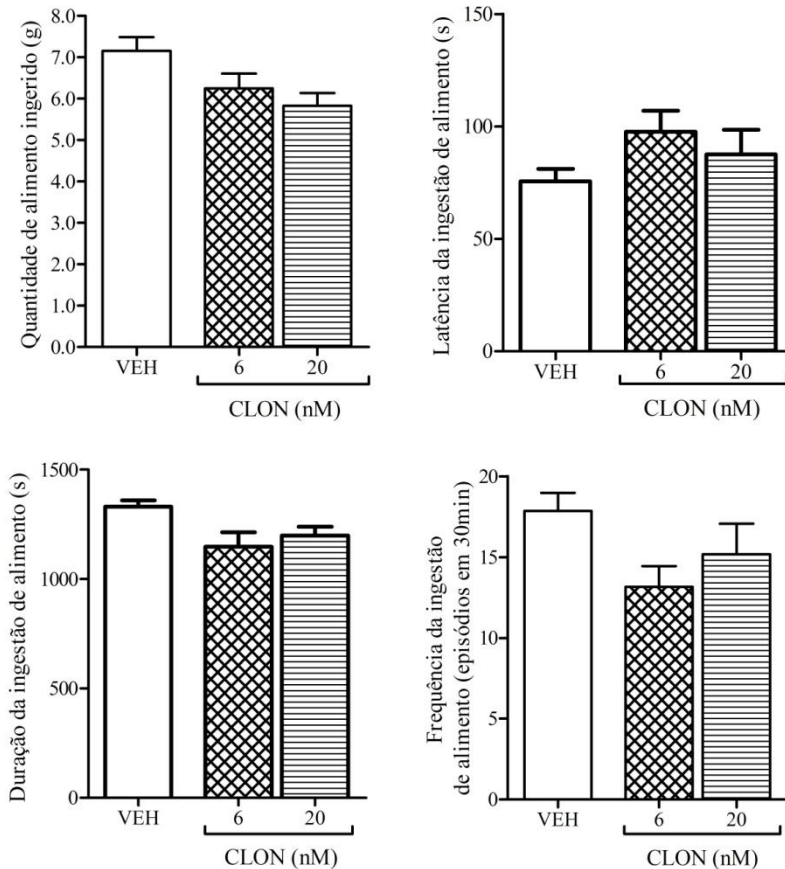


Figura 8 – Administração de veículo (0, n = 13) e de CLON nas doses de 6nM (n = 6) e 20nM (n = 6) no NMR de ratos em restrição de 15g ração/dia durante 7 dias. Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0.05$  comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan.

### 5.2.2 Efeito sobre os comportamentos de Locomoção, Imobilidade, Exploração Vertical, Exploração não Locomotora e Auto Limpeza.

A ANOVA de uma via indica que o tratamento com CLON no NMR provocou modificações na duração do comportamento de auto limpeza [ $F(2,22) = 4,49$ ;  $p < 0,0230$ ]. Houve aumento no tempo de

duração de auto limpeza provocado apenas pela maior dose (20 nM) de CLON. Os demais comportamentos não ingestivos não demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Comportamentos	Dose (nM)	Duração (s) (total)	Frequência (Episódios)
Locomoção	0	174 ± 28	46 ± 6
	6	181 ± 42	48 ± 12
	20	171 ± 19	43 ± 5
Imobilidade	0	9 ± 3	3 ± 1
	6	23 ± 15	3 ± 2
	20	50 ± 38	3 ± 3
Exploração Vertical	0	71 ± 10	27 ± 4
	6	106 ± 25	30 ± 6
	20	84 ± 16	25 ± 4
Exploração Locomotora	0	84 ± 10	26 ± 3
	6	156 ± 44	35 ± 9
	20	132 ± 25	29 ± 4
Auto Limpeza	0	25 ± 6	3 ± 1
	6	61 ± 14	4 ± 1
	20	74 ± 24*	5 ± 2

Tabela 2 – Efeitos do tratamento de CLON no NMR sobre a duração e frequência dos comportamentos não ingestivos de ratos em restrição de 15g ração/dia durante 7 dias observados durante 30 minutos após administração de veículo (0, n = 13) e de fenilefrina nas doses de 6nM (n = 6) e 20nM (n = 6). Os dados representam a média ± EPM \*p < 0.05 comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan.

### **5.3 EFEITOS DA FEN NO NMR SOBRE OS COMPORTAMENTOS INGESTIVOS E NÃO INGESTIVOS DE RATOS EM JEJUM NOTURNO**

#### **5.3.1 Efeito sobre a Quantidade, Latência, Duração e Frequência da Ingestão de Alimento.**

ANOVA de uma via demonstrou que a quantidade de alimento ingerido [F (2,23) = 16,031; p <0,00005], duração da ingestão de alimento [F (2,23) = 5,17; p <0,0139] e a latência para iniciar a ingestão [F (2,23) = 3,74; p <0,0390] foram significativamente afetados pelo tratamento de ambas doses do agonista  $\alpha$ -1 adrenérgico efetuado em ratos submetidos ao jejum noturno. Enquanto a quantidade de alimento ingerido, bem como a duração da ingestão de alimento diminuíram após a injeção de ambas as doses de FEN no NMR, o tratamento com FEN nesse núcleo aumentou na latência para iniciar a ingestão de alimento. A análise estatística revelou que não houve modificações no comportamento de frequência de ingestão de alimento (figura 9).

#### **5.3.2 Efeito sobre os comportamentos de Locomoção, Imobilidade, Exploração Vertical, Exploração não Locomotora e Auto Limpeza.**

A análise de variância de uma via indica que a injeção de FEN no NMR modificou a frequência da exploração não locomotora [F (2,23) = 6,18; p <0,0070] e a duração do comportamento de auto limpeza [F (2,23) = 3,64; p <0,0420]. A frequência da exploração não locomotora aumentou após a injeção de FEN, acompanhada pelo aumento da duração de auto limpeza. Esses efeitos foram obtidos apenas pela maior dose de FEN (tabela 3). Os outros comportamentos não ingestivos permaneceram inalterados.



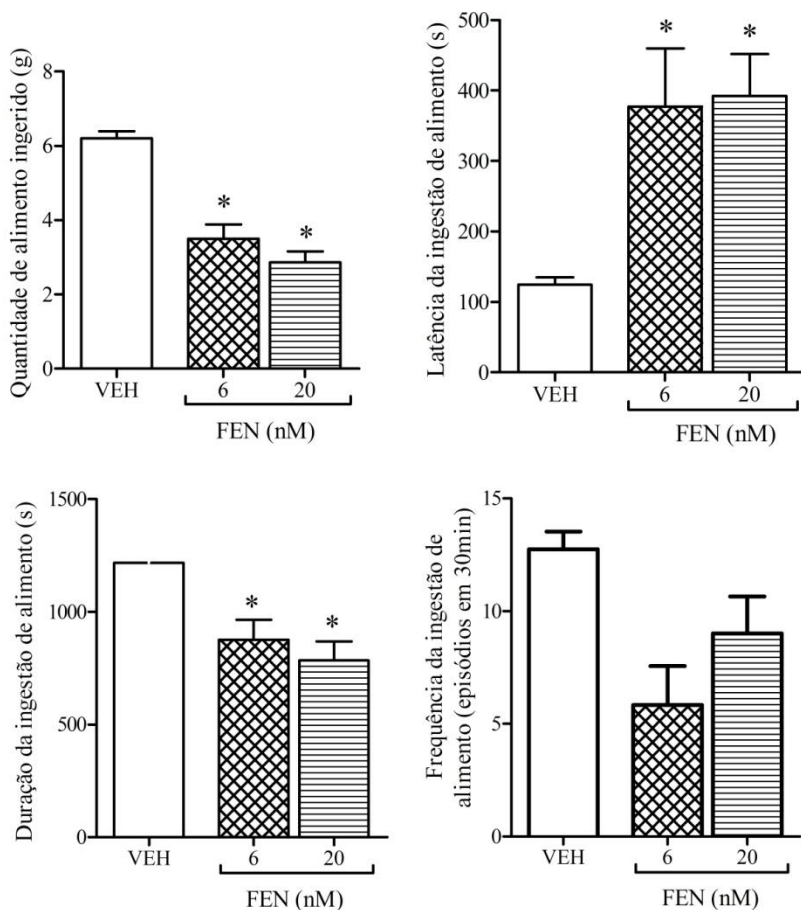


Figura 9 – Administração de veículo (0, n = 12) e de FEN nas doses de 6 nM (n = 6) e 20 nM (n = 7) no NMR de ratos em jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0.05$  comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan.

Comportamentos	Dose (nM)	Duração (s) (total)	Frequência (Episódios)
Locomoção	0	167 ± 12	48 ± 4
	6	222 ± 18	48 ± 6
	20	220 ± 37	58 ± 11
Imobilidade	0	16 ± 6	5 ± 2
	6	200 ± 124	11 ± 4
	20	226 ± 173	10 ± 2
Exploração Vertical	0	106 ± 14	33 ± 2
	6	111 ± 40	25 ± 7
	20	80 ± 15	30 ± 5
Exploração Locomotora	Não	0	159 ± 31
		6	228 ± 64
		20	297 ± 32*
Auto Limpeza		0	53 ± 11
		6	106 ± 37
		20	132 ± 28*

Tabela 3 – Efeitos do tratamento de FEN no NMR sobre a duração e frequência dos comportamentos não ingestivos de ratos em jejum noturno observados durante 30 minutos após administração de veículo (0, n = 13) e de fenilefrina nas doses de 6 nM (n = 6) e 20 nM (n = 8). Os dados representam a média ± EPM \*p < 0.05 comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan.

#### 5.4 EFEITOS DA CLON NO NMR SOBRE OS COMPORTAMENTOS INGESTIVOS E NÃO INGESTIVOS DE RATOS EM JEJUM NOTURNO

5.4.1 Efeito sobre a Quantidade, Latência, Duração e Frequência da Ingestão de Alimento.

Nenhuma dose de CLON injetada no NMR em ratos em jejum noturno afetou a quantidade, frequência, duração e latência dos comportamentos ingestivos (figura 10).

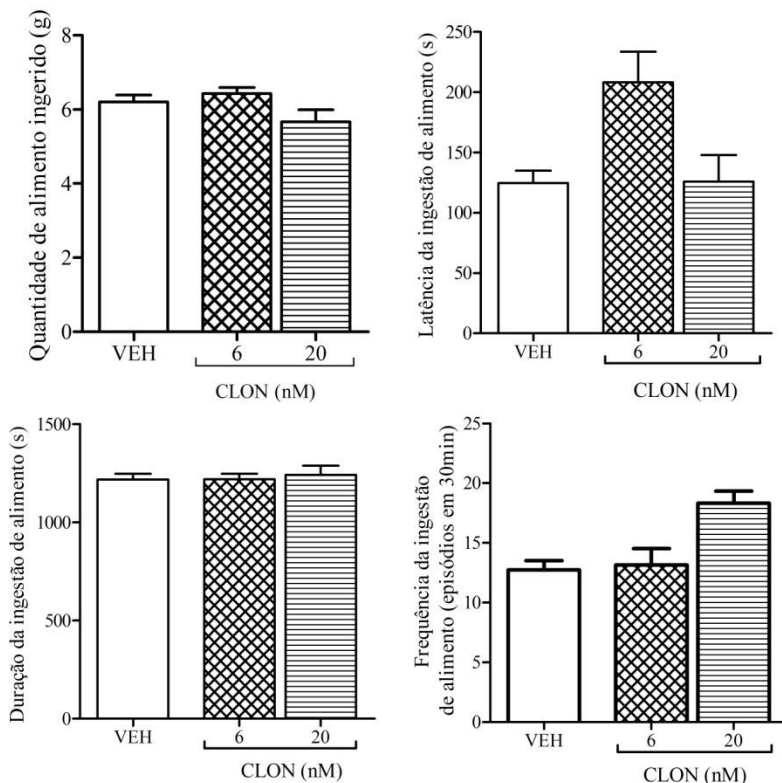


Figura 10 – Administração de veículo (0, n = 12) e de CLON nas doses de 6 nM (n = 7) e 20 nM (n = 6) no MR de ratos em jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0.05$  comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan.

#### 5.4.2 Efeito sobre os comportamentos de Locomoção, Imobilidade, Exploração Vertical, Exploração não Locomotora e Auto Limpeza.

A análise estatística revelou que os comportamentos não ingestivos de locomoção, imobilidade, exploração vertical, exploração não

locomotora e autolimpeza permaneceram inalterados após o tratamento com CLON no MR (tabela 4).

Comportamentos	Dose (nM)	Duração (s) (total)	Frequência (Episódios)
Locomoção	0	167 ± 12	48 ± 4
	6	181 ± 15	51 ± 3
	20	183 ± 27	46 ± 7
Imobilidade	0	16 ± 6	5 ± 2
	6	13 ± 4	5 ± 1
	20	13 ± 4	4 ± 1
Exploração Vertical	0	106 ± 14	33 ± 2
	6	96 ± 14	33 ± 4
	20	92 ± 14	28 ± 4
Exploração Locomotora	0	159 ± 31	34 ± 3
	6	132 ± 15	35 ± 4
	20	142 ± 38	33 ± 7
Auto Limpeza	0	53 ± 11	5 ± 1
	6	87 ± 18	5 ± 1
	20	54 ± 12	3 ± 1

Tabela 4 – Efeitos do tratamento de CLON no NMR sobre a duração e frequência dos comportamentos não ingestivos de ratos em jejum noturno observados durante 30 minutos após administração de veículo (0, n = 12) e de fenilefrina nas doses de 6 nM (n = 7) e 20 nM (n = 6). Os dados representam a média ± EPM \*p < 0.05 comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan.

## **5.5 EFEITOS DA FEN E CLON NO NMR SOBRE OS COMPORTAMENTOS DE INGESTÃO HÍDRICA DE RATOS EM RESTRIÇÃO DE 15g RAÇÃO/DIA DURANTE 7 DIAS.**

5.5.1 Efeitos da FEN sobre a Quantidade, Latência, Duração e Frequência da Ingestão Hídrica.

A ANOVA de uma via indica que a administração de ambas as doses de FEN no NMR não promoveu modificações na quantidade [ $F(2, 23) = 0,0804$ ;  $p < 0,922$ ] duração : [ $F(2, 24) = 0,933$ ;  $p = 0,406$ ], latência [ $F(2, 24) = 0,113$ ;  $p < 0,893$ ], frequência : [ $F(2, 24) = 0,642$ ;  $p = 0,534$ ] do comportamento de ingestão hídrica.

5.5.2 Efeitos da CLON sobre a Quantidade, Latência, Duração e Frequência da Ingestão Hídrica.

A análise de variância de uma via indica que a administração de ambas as doses de CLON no NMR não promoveu modificações na quantidade [ $F(2, 21) = 2,152$ ;  $p < 0,141$ ], duração: : [ $F(2,22) = 1,222$ ;  $p < 0,313$ ], latência: [ $F(2,22) = 0,294$ ;  $p = 0,748$ ], frequência: [ $F(2,22) = 0,898$ ;  $p = 0,421$ ].

## **5.6 EFEITOS DA FEN E CLON NO NMR SOBRE OS COMPORTAMENTOS DE INGESTÃO HÍDRICA DE RATOS EM JEJUM NOTURNO.**

5.6.1 Efeitos da FEN sobre a Quantidade, Latência, Duração e Frequência da Ingestão Hídrica.

A ANOVA de uma via indica que a administração de ambas as doses de FEN no NMR não promoveu modificações na quantidade: [ $F(2, 21) = 1,75$ ;  $p < 0,198$ ], duração: [ $F(2, 22) = 2,15$ ;  $p < 0,140$ ], [ $F(2, 24) = 0,933$ ;  $p = 0,406$ ], latência: [ $F(2, 22) = 1,508$ ;  $p < 0,243$ ], frequência: [ $F(2, 22) = 1,7448$ ;  $p < 0,197$ ] do comportamento de ingestão hídrica.

5.6.2 Efeitos da CLON sobre a Quantidade, Latência, Duração e Frequência da Ingestão Hídrica.

A análise de variância de uma via indica que a administração de ambas as doses de CLON no NMR não promoveu modificações na

quantidade:  $[F(2, 22) = 0,627; p < 0,543]$ ; duração:  $[F(2, 22) = 0,412; p < 0,66728]$ , latência:  $[F(2, 22) = 1,337; p < 0,283]$ ; frequência:  $[F(2, 22) = 0,627; p < 0,543]$ .

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelaram que a administração de FEN no NMR causou redução na quantidade de alimento ingerido em ratos submetidos a ambas situações de privação de alimento. Em contraste com esses dados, a administração de CLON não afetou qualquer variável do comportamento alimentar dos ratos em ambas as condições experimentais investigadas nesse trabalho. Esses dados são opostos àqueles encontrados nos animais saciados. Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa (Mansur et al., 2010) demonstraram que a ativação de receptores  $\alpha 2$ -adrenérgicos pela administração de CLON no NMR resulta em hiperfagia em ratos saciados. Esse efeito foi atribuído a um controle inibitório da liberação de 5-HT (Artigas, 1999) através dos  $\alpha$ -2 adrenoceptores presentes nos terminais nervosos noradrenérgicos (Haddjeri et al., 1996); quando ativados esses receptores reduzem a disponibilidade de catecolamina na sinapse e seu efeito excitatório sobre neurônios serotoninérgicos, mediado por receptor  $\alpha$ -1. Por outro lado, o tratamento no NMR com FEN nas mesmas condições experimentais de alimentação não causou qualquer alteração no comportamento ingestivo (Mansur et al., 2011). Essa ausência de efeito da FEN em ratos saciados foi atribuída ao elevado tônus adrenérgico sobre os neurônios serotoninérgicos do MRN e, conseqüentemente, elevada influência inibitória sobre a ingestão de alimentos, uma vez que a ativação de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos facilita a liberação de 5-HT por neurônios serotoninérgicos do NMR (Artigas, 1999; Gallanger e Aghajanian, 1982). Além disso, reforça essa sugestão, o fato de o tônus serotoninérgico ser menor em ratos restritos do que em animais com livre acesso ao alimento (Happe et al., 2004; Kelley et al., 2005; Kaye, 2008). No presente trabalho, a hipofagia induzida pela administração de FEN nas duas condições experimentais de privação de alimento confirma a sugestão prévia e reforça a possibilidade de a 5-HT ser o mediador dos efeitos ingestivos provocados pela ativação de receptores adrenérgicos.

Adicionalmente, dados recentes de nosso laboratório mostraram que a injeção de prazosin (antagonista de receptor  $\alpha$ -1 adrenérgico) no NMR de animais saciados causou hiperfagia (Mansur, 2011). Esse dado somado ao fato de a ativação de receptores  $\alpha$ -2, que tem como efeito a redução da disponibilidade de catecolamina na sinapse, também resultou em hiperfagia indicam que, nos animais saciados existe uma ativação adrenérgica tônica, mediada por receptor adrenérgico  $\alpha$ -1, sobre neurônios da rafe que inibem a ingestão de alimento, possivelmente neurônios serotoninérgicos.

Coletivamente, esses dados confirmam a sugestão anterior de que a hipofagia induzida pela administração de AD no NMR de ratos em restrição de alimento (15g ração/dia por 7dias) (Maidel et al., 2007) pode ser mediada pela ativação de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos e seus efeitos facilitatórios sobre neurônios serotonérgicos do NMR (Gallanger e Aghajanian, 1982; Artigas, 1999 ). A hiperfagia induzida pelo mesmo tratamento aplicado no NMR de ratos saciados pode ser atribuída a um controle inibitório da liberação de 5-HT (Artigas, 1999) através dos  $\alpha$ -2 adrenoceptores presentes nos terminais nervosos noradrenérgicos (Haddjeri et al., 1996). Quando ativados, estes receptores reduzem a disponibilidade de catecolamina na sinapse e seu efeito excitatório sobre neurônios serotonérgicos, mediado por receptor adrenérgico do subtipo  $\alpha$ -1.

É importante observar que em nosso trabalho o comportamento alimentar exibido pelos animais tratados com FEN no NMR diferiu nas duas condições experimentais de restrição de alimento. A resposta hipofágica provocada por injeções de FEN no NMR de ratos submetidos ao jejum noturno foi acompanhada pelo aumento na latência para iniciar a alimentação e diminuição da duração da ingestão. A hipofagia induzida pelo mesmo tratamento, nos ratos em restrição de alimento 15g ração/dia durante 7 dias, resultou apenas em diminuição da frequência da ingestão provocado apenas pela menor dose de FEN sendo que não houve mudanças na latência ou duração do comportamento alimentar. Estes resultados indicam que a duração da restrição alimentar e/ou intensidade afeta de forma diferente diversos aspectos da alimentação, tais como a latência, o tamanho e a frequência das refeições.

Existem duas categorias de sinais que contribuem para o controle do tamanho da refeição, denominados controles diretos e controles indiretos (Smith,1996; Smith,2000; Grill, 2010). Os controles diretos fazem referência aos sinais de saciedade que incluem sinais sensoriais decorrentes do alimentos ingeridos que passam pelo trato gastrointestinal como a distensão estomacal e os hormônios intestinais liberados em resposta as características do bolo alimentar (CCK, PYY, GLP-1 etc.). Estes sinais de saciedade ativam os receptores em fibras vagais aferentes e suas projeções terminam em neurônios no NTS e, desse núcleo terminações neurais podem seguir diretamente para núcleos hipotalâmicos como o ARC e NPV, de forma indireta até o córtex através de estruturas do tronco encefálico como o LC e os núcleos da rafe (Berthoud, 2002). Destaca-se a associação entre os controles diretos e o tronco encefálico pois a secção do nervo vago resulta em aumento no tamanho e frequência da ingestão de alimento (Yang et al 1992;



Adan et al., 2008). Por outro lado a descerebração não aumenta o tamanho da refeição em ratos restritos de alimento (Seeley et al 1994) demonstrando que o tronco encefálico está ligado a mecanismos que limitam o tamanho da refeição, ou seja, mecanismos de saciedade.

O controle do tamanho da refeição também é influenciado por sinais não diretamente ligados ao trato gastrointestinal, estes são chamados de controles indiretos. Esses controles estão associados a sinais de origens distintas e são classificados em 6 categorias: 1º sinais metabólicos (mudanças crônicas no níveis de glicose, ácidos graxos livres), 2º os sinais rítmicos (ciclo circadiano, alterações hormonais), 3º sinais térmicos ou temporais, 4º sinais condicionados (preferência ou aversão a um alimento), 5º sinais cognitivos (relacionas a cultura, em humanos), 6º sinais ambientais (presença ou ausência de alimento em um período/época específica ou mesmo presença de um predador no meio animal) (Smith, 1996; Berthoud et al., 2006). Os mecanismos de controle direto e controle indireto talvez possam explicar as diferentes respostas no comportamento alimentar dos nossos modelos após a administração de FEN no NMR.

A resposta hipofágica nos animais em jejum noturno foi bem caracterizada pois houve diminuição da quantidade de alimento ingerido, aumento na latência para iniciar a ingestão e diminuição na duração da ingestão de alimento. Dessa forma, sugerimos que os adrenoceptores presentes no NMR podem estar associados a circuitos neurais ligados ao controle direto da ingestão de alimento (Smith, 1996; Grill, 2010), podendo mediar a saciedade induzida por sinais sensoriais ativados durante a passagem dos alimentos ingeridos pelo trato gastrintestinal, caracterizada no presente estudo por uma redução do tamanho e antecipação do termino da refeição.

De acordo com Smith (2010) os controles diretos atuam durante o período da refeição enquanto que os controles indiretos (disponibilidade energética, alteração na circulação de nutrientes) costumam agir por mais tempo do que a duração de uma única refeição. Portanto, nos ratos em restrição de alimento 15g ração/dia durante 7 dias os sinais de saciedade desencadeados por sinais oriundos do trato digestório poderiam receber influência dos controles indiretos da refeição, em especial os sinais metabólicos que são alterados pela redução no peso corporal (aproximadamente 10%) e/ou fome persistente, como aumento na concentração de glicocorticóides e grelina no plasma bem como diminuição nos níveis plasmáticos de leptina, insulina e glicose ou também redução na temperatura corporal; alterações geralmente

observadas durante a restrição de alimento ( Masoro, 2000 et al.; Kinzin et al., 2009; Pesic et al., 2010).

Reforça essa sugestão os dados apontando que os níveis basais de leptina e grelina são normalizados com a restauração total ou parcial do peso corporal perdido durante a privação de alimento por 4 semana. Entretanto a concentração de insulina não é normalizada até que o peso seja restaurado totalmente e mantido por 4 semanas (Kinzin et al., 2009). Além disso, enquanto os animais com livre acesso ao alimento apresentam um pico pré-prandial na concentração de grelina pouco antes do ciclo escuro, quando normalmente realizam sua maior refeição do dia, nos animais submetidos à restrição de alimento os níveis pré prandiais de grelina mensurados no início do escuro, mantiveram-se baixos (Kinzin et al., 2009; (Tschop et al., 2001; Horvath et al., 2003; Tolle el al., 2003; Strubbe et al., 20004). Adicionalmente, a expressão hipotalâmica de RNAm para POMC em neurônios do núcleo arqueado foi menor na restrição crônica e nos animais em que o peso foi parcialmente restabelecido, mas restaurada com a normalização do peso corporal. A expressão do RNAm para o peptídeo relacionado ao agouti (AgRP) e para o NPY não foi afetada pela restrição crônica de alimento (Bi et al, 2003; Kinzin et al., 2009). No hipotálamo dorso medial houve aumento significativo da expressão de NPY para os animais em restrição crônica, com o peso corporal parcial ou totalmente restaurado (Sucajty-Szulc et al., 2008; Kinzin et al., 2009). A expressão do RNAm para o NPY nesse núcleo foi normalizada 4 semanas após a restauração do peso corporal. Dessa forma, essas alterações neuroendócrinas nos ratos em restrição de alimento 15g ração/dia durante 7 dias podem ter alterado o perfil da resposta hipofágica induzido pela administração de FEN no NMR.

É importante ressaltar que comportamentos não ingestivos foram alterados após o tratamento com FEN no NMR de animais em restrição de alimento 15g ração/dia durante 7 dias. A duração da exploração não locomotora, frequência e duração da imobilidade aumentaram após tratamento com FEN. Dessa forma, a redução na quantidade de alimento ingerido induzida pela FEN nesses animais poderia ser atribuída a uma redução na atividade motora. No entanto, os animais submetidos ao jejum noturno também apresentaram elevação na exploração não locomotora, fato que enfraquece essa possibilidade.

Os resultados obtidos no presente estudo, independente do tratamento utilizado (FEN ou CLON nas doses equimolares de 6 e 20 nM) não demonstraram alterações na latência, duração e frequência do comportamento de ingestão hídrica.

Estudos demonstram a que o NMR tem influência direta no consumo de água (Wirtshafter, 2001) mediada pela neurotransmissão gabaérgica, pois a injeção de muscimol (agonista GABA<sub>A</sub>) e baclofen (agonista GABA<sub>B</sub>) aumenta a ingestão de líquido independente da presença de alimento. (Klitenick e Wirtshafter, 1988, Wirtshafter, 1993). A 5-HT além de estar envolvida no controle da ingestão de alimentos participa do controle da ingestão hídrica sendo que substrato neural com projeções serotoninérgicas centrais para o controle da ingestão hidromineral provavelmente envolve os núcleos da rafe (Antunes-Rodrigues et al., 2005).

Enquanto a administração periférica de 5-HT produz aumento na ingestão de água por acionar mecanismos dependentes de angiotensina II, no SNC a 5-HT participa de mecanismos inibidores da ingestão de água, pelo menos em ratos ( Menani et al., 1996; 1998 a, b). De acordo, estudos demonstram que a destruição eletrolítica do NDR, bem como de neurônios serotoninérgicos centrais produz aumento da ingestão de água (Shisheva et al., 1987). Essas informações são consistentes com a idéia que em condições de normonatremia, os neurônios serotoninérgicos da rafe inibiriam tonicamente a ingestão de água. O NPV é dotado de um sistema ocitocinérgico e participa no controle da ingestão hídrica (Stricker e Woods, 2004). É possível que a inibição dos núcleos da rafe seria feita por intermédio da 5-HT liberada no NPV uma vez que os neurônios do NDR e NMR projetam-se para esses núcleos (Antunes-Rodrigues et al., 2005).

Esta amplamente descrito na literatura a participação da 5-HT no controle da ingestão hídrica e haver uma relação com os núcleos da rafe, em nosso estudo não houveram alterações no comportamento relacionados a ingestão hídrica, independente da droga ou modelo de restrição utilizado. Atribuímos esse fato a possível falha metodológica nos instrumentos utilizados, não nos permitindo qualquer discussão sobre o fato.

No presente estudo houve limitações referentes à infraestrutura, equipamentos e verba para realização do trabalho. Possivelmente, a expressão da proteína Fos em neurônios serotoninérgicos do NMR e a dosagem hormonal dos ratos nas diferentes condições de restrição de alimento contribuiriam com nosso estudo. Admite-se que no desenho experimental a necessidade de técnicas específicas não foram cogitadas. A importância das mesmas foram percebidas na fase final do estudo, mas não realizadas devido a ausência de verba, infraestrutura e prazo de conclusão do trabalho.

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados do presente trabalho mostram que a ativação do receptor  $\alpha$ -1 adrenérgico do NMR provoca hipofagia em ratos submetidos à privação de alimento. Esses dados confirmam que a ativação de receptores adrenérgicos do NMR estimula uma influência inibitória sobre a ingestão de alimento que é menos presente durante a privação de alimento.

Atualmente, o envolvimento e os mecanismos de regulação do NMR na ingestão de alimentos são poucos descritos na literatura. Estudos que detalhem melhor esse contexto contribuirão com a comunidade científica. Acredita-se que este seja um ponto inicial para outros trabalhos que objetivem compreender melhor as relações entre o NMR e controle da ingestão de alimentos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAN R.A.H; VANDERSCHUREN L.J.M.J; LA FLEUR SUSANNE. Anti-obesity drugs and neural circuits of feeding. **Trends in Pharmacology Science.**, 29(4) 28-217, 2008.

ADELL, A. E ARTIGAS, F. Regulation of the release of 5-hydroxytryptamine in the median raphe nucleus of the rat by catecholaminergic afferents. **European Journal of Neuroscience**, 11: 2305 - 2311, 1999.

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

ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A.C.; ELIAS, L.L.K.; DE CASTRO, M. Neuroendocrinologia básica e aplicada. **Guanabara Koogan S.A.** 11: 135-162, 2005.

ARORA, S.; ANUBHUTI. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity – a review. **Neuropeptides.** 40 (6): 375-401, 2006.

BARBARICH, O. N. Is there a common mechanism of serotonin dysregulation in anorexia nervosa and obsessive compulsive disorder? **Eat Weight Disord.**, 7: 221- 31, 2002.

BENDOTTI, C.; SAMANIN, R. 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OHDPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons. **Eur. J. Pharmacol.**, 121: 147-150, 1986.

BI, S.; ROBINSON, B.M.; MORAN, T.H. Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 285: R1030–R1036, 2003.

BERTHOUD, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 26: 393-428, 2002.

BLEVINS, J.E.; STANLEY, B.G.; REIDELBERGER, R.D. Brain regions where cholecystokinin suppresses feeding in rats. **Brain Res.**, 860: 1-10, 2000.

BLUNDELL, J. E. Serotonin and appetite. **Neuropharmacology**, 23: 1537-1551, 1984.

BLUNDELL, J.E. Serotonin and the biology of feeding, **Am. J. Clin. Nutr.** 55: 155–159, 1992.

BLUNDELL, J. E.; HALFORD, J. C. G. Metergoline antagonizes fluoxetine-induced suppression of food intake but not changes in the behavioural satiety sequence. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 54: 745-751, 1996.

BLUNDELL, J. E. Pharmacological approaches to appetite suppression. **Trends Pharmacol. Sci.**, 12: 147-157, 1991.

BOWER K.G.; HALLIDAY G.M.; HORNUNG J.P.; GEFFEN L.B.; COTTON R.G.H.M.; TORK, I. Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. **Neuroscience**, 42: 757-775, 1991.

BURNS, G. A.; RITTER, R. C. The non-competitive NMDA antagonist MK-801 increases food intake in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 56: 145-149, 1997.

CHOI, S.; DALLMAN, M.F. Hypothalamic obesity: multiple routes mediated by loss of function in medial cell groups. **Endocrinology**, 140: 4081–4088, 1999.

CLIFFORD, B.; SAPER, C.B.; CHOU, T.C.; ELMQUIST, J.K. The Need to Feed: Review Homeostatic and Hedonic Control of Eating. **Neuron.**, 36: 199–211, 2002.

COLLIN, O. M.; BÄCKBERG, O. M.; ONNESTAM, O. K.; MEISTER, O. B. 5-HT<sub>1A</sub> receptor immunoreactivity in hypothalamic neurons involved in body weight control. **Neuroreport**, 13: 945-51, 2002.

COSTALL, B.; NAYLOR, R.J.; MARSDEN, C.D.; PYCOCK, C.J. Serotonergic modulation of the dopamine response from the nucleus accumbens. **J Pharm Pharmacol.**, 28: 523–6, 1976.

CURRIE, P. J.; COSCINA, D. V. Diurnal variations in the feeding response to 8- OHDPAT injected into the dorsal or median raphe. **Neuroreport**, 4: 1105-1107, 1993.

CURRIE, O. P. J.; COIRO, O. C. D.; NIYOMCHAI, O. T.; LIRA, O. A.; FARAHMAND, O. F. Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine: receptor-specific inhibition of NPY-stimulated eating and energy metabolism. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 71: 709-16, 2002.

DAY, H. E.; GREENWOOD, B. N.; HAMMACK, S. E.; WALTKINS, L. R.; FLESHNER, M.; MAIER, S. F.; CAMPEAU, S. Differential expression of 5-HT- 1A, alpha 1b adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic, gamma-aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus. **J. Comp. Neurol.**, 474, 364-378, 2004.

DE FALCO, J.; TOMISHIMA, M.; LIU, H.; ZHAO, C.; CAI, X.; MARTH, J. D.; ENQUIST, L.; FRIEDMAN, J. M. Virus-assisted mapping of neural inputs to a feeding center in the hypothalamus. **Science**, 291: 2608-2613, 2001.

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

DOS SANTOS R.L.D.; MANSUR S.S.; STEFFENS S.M.; FARIA M.S.; MARINO-NETO, J.; PASCHOALINI, M.A.; Food intake increased after injection of adrenaline into the median raphe nucleus of free-feeding rats. **Behavioural Brain Research.**, 197: 411– 416, 2009.

ELMQUIST, J.K.; COPPARI, R.; BALTHASAR, N.; ICHINOSE, M.; LOWELL, B.B. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. **J. Comp. Neurol.** 493: 63–71, 2005.

ENNIS M, ASTON-JONES G. Two physiologically distinct populations of neurons in the ventrolateral medulla innervate the locus coeruleus. **Brain Res.**, 425: 275– 282, 1987.

FLETCHER, P. J.; PATERSON, I. A. A comparison of the effects of tryptamine and 5-hydroxytryptamine of feeding following injection into the Paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 32: 907-911, 1989.

FLETCHER, P. J.; COSCINA, D. V. Injecting 5-HT into PVN does not prevent feeding induced by injecting 8-OH-DPAT into the raphe. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 46: 487-491, 1993.

FLIER, J.S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell** 116: 337-350, 2004.

FREITAS, R.L.; FERREIRA, C.M.; RIBEIRO, S.J.; CARVALHO, A.D.; ELIAS-FILHO, D.H.; GARCIA- CAIRASCO, N. Intrinsic neural circuits between dorsal midbrain neurons that control fear-induced responses and seizure activity and nuclei of the pain inhibitory system elaborating postictal antinociceptive process: a functional neuroanatomical and neuropharmacological study. **Exp Neurol**, 191: 225-242, 2005.

FRIEDMAN, M.; HARRIS, R.; JI, H.; RAMIREZ, L.; TORDOFF, M. Fatty acid oxidation affects food intake by altering hepatic energy status. **Am. J. Physiol.**, 276: 1046-1053, 1999.

FULTON, S. Appetite and reward- review. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 31: 85-103, 2010.

FUNAHASHI, H.; TAKENOYA, F.; GUAN, J. KAGEYAMA, H.; YADA, T.; SHIODA, S. Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. **Anat.Sci.Intern.**, 78 (3): 123-132, 2003.

GALLAGHER, D.W.; AGHAJANIAN, G.K. Effect of antipsychotic drugs on the firing of dorsal raphe cells. I. Role of adrenergic system. **European Journal of Pharmacology**, 39: 341-355, 1976.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; DE ANDRADE, T. G. C. S.; DEAKIN, J. F. W. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 54: 129-141, 1996.



GRILL, H.J.; NORGREN, R. The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. **Brain Res.** 143: 281–297, 1978.

GRILL, H. J. Leptin and the systems neuroscience of meal size control - Review Article. **Frontiers in Neuroendocrinology.** 31: (1) 61-78, 2010.

GUAN, J.L.; SAOTOME, T.; WANG, Q.P. FUNAHASHI, H.; HORI, T.; TANAKA, S.; SHIODA, S. Orexigenic innervations of POMC-containing neurons in the rat arcuate nucleus. **Neuroreport**, 12: 547-551, 2001.

HADDJERI, N.; BLIER, P.; DE MONTIGNY, C. Effect of the alpha-2 adrenoceptor antagonist mirtazapine on the 5-hydroxytryptamine system in the rat brain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 277: 861–871, 1996.

HALFORD, J. C. G.; WANNINAYAKE, S. C. D.; BLUNDELL, J. E. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 61: 159-168, 1998.

HALFORD, J.C.G.; HARROLD, J.A.; BOYLAND, E.J.; LAWTON, C.L; BLUNDELL, J.E. Serotonergic drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. **Drugs**, 67: 27–55, 2007.

HARDING, A., PAXINOS, G., HALLIDAY, G. The serotonin and tachykinin systems, in: G. Paxinos (Ed.), **The Rat Nervous System**, 3rd ed., Elsevier Academic Press, New York, 2004, pp. 1205–1256.

HENSLER, J. G. Serotonergic modulation of the limbic system. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 30: 203-214, 2006.

HERBERG, L.J.; BLUNDELL, J.E. Lateral hypothalamus: hoarding behavior elicited by electrical stimulation. **Science**, 155: 349–350, 1967.

HERNANDEZ, L. AND HOEBEL, B.G. Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis. **Life Sci.**, 42: 1705–1712, 1988.

HETHERINGTON, A.W.; RANSON, S.W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **Anat. Rec.**, 78: 149–172, 1940 apud ADAN R.A.H; VANDERSCHUREN L.J.M.J; LA FLEUR SUSANNE. Anti-obesity drugs and neural circuits of feeding. **Trends in Pharmacology Science.**, 29(4) 28-217, 2008.

HOEBEL, B.G.; TEITELBAUM, P. Weight regulation in normal and hypothalamic hyperphagic rats. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, 61: 189–193, 1966.

HOPWOOD, S.E.; STAMFORD, J.A. Noradrenergic modulation of serotonin release in rat dorsal and median raphe nuclei via  $\alpha$ -1 and  $\alpha$ -2 adrenoceptors **Neuropharmacology** , 41: 433–442, 2001.

HORVATH, T. L.; DIANO, S.; VAN DEN POL, A. N. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. **J. Neurosci.**, 19: 1072-1087, 1999.

HORVATH, T.L.; DIANO, S.; TSCHOP, M., Ghrelin in hypothalamic regulation of energy balance. **Curr Top Med Chem** 3: 921–927, 2003.

JONES, B. J.; BLACKBURN, T. P. The medical benefit of 5-HT research. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 71: 555-568, 2002.

JUDGE, S. J.; GARTSIDE, S. E. Firing of 5-HT neurons in the dorsal and median raphe nucleus in vitro shows differential  $\alpha$ 1-adrenoceptor and 5-HT1A receptor modulation. **Neurochemistry International**, 48: 100-107, 2006.

KANDEL E.R.; SCHWARTZ J.H.; JESSELL T.M. **Princípios da Neurociência**, Manole: São Paulo, 4 ed. 2003. ISBN 85-204-1281-5.

KINZIG, K.P.; HARGRAVE, S.L.; TAO, E.E. Central and peripheral effects of chronic food and weight restoration in the rat restriction. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 296:E282-E290, 2009

KLITENICK, M.A.; WIRTSHAFTER, D. Comparative studies of the ingestive behaviors produced by microinjections of muscimol into the

midbrain raphe nuclei of the ventral tegmental area of the rat. **Life Sci.**, 42:775-782, 1988.

KONDO, Y.; YAMANOUCHI, K. Potentiation of ejaculatory activity by median raphe nucleus lesions in male rats: effect of p-chlorophenylalanine. **Endocr. J.** 44 (6): 873–879, 1997.

LECHIN, F.; VAN DER DIJS B.; LECHIN, M.E. Neuroautonomic, neuroendocrine and neuroimmune interactions. In: Lechin F, van der Dijs B, Lechin ME, editors. Neurocircuitry and neuroautonomic disorders. **Reviews and therapeutic strategies**. Basel' Karger; 2002b. p. 57–59.

LECHIN, F.; DIJS, B. V. D.; ADRIÁN, G. H. Dorsal raphe vs. Median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: Relevance for neuropharmacological therapy. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 30: 565-585, 2006.

LÉGER L.; WIKLUND, L. Distribution and numbers of indoleamine cell bodies in the cat brainstem determined with Falck-Hillarp fluorescence histochemistry. **Brain Res. Bull.**, 9: 245-251, 1982.

LEIBOWITZ, S.F. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. **Physiol. Behav.** 27: 1031–1040, 1981.

LEIBOWITZ, S. F.; ALEXANDER, J. T. Serotonin in control of eating behavior, meal size and body weight. **Biol. Psychiatry**, 44: 851-864, 1998.

LI, C.; CHEIN, P.; SMITH, M. S. Identification of neuronal inputs to the arcuate nucleus (ARH) activated during lactation: implications in the activation of neuropeptide Y neurons. **Brain Res.**, 824: 267-276, 1999.

LOWRY, C. A. Functional subsets of serotonergic neurons: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **J. Neuroendocrinol.**, 14: 911-923, 2002.

MAIDEL, S.; LUCINDA, A.M.; AQUINO, V.W.; FARIA, M.S.; PASCHOALINI, M.A. The adrenaline microinjection into the median raphe nucleus induced hypophagic effect in rats submitted to food restriction regimen. **Neurosci Lett.** 422: 123–127, 2007.

MANSUR, S.S.; TERENCE, M.G.; MARINO-NETO, J.; FARIA, M.S.; PASCHOALINI, M.A. Changes in food intake and anxiety-like behaviors after clonidine injected into the median raphe nucleus. **Behavioural Brain Research.** 212: 71–77, 2010.

MANSUR, S.S.; TERENCE, M.G.; MARINO-NETO, J.; FARIA, M.S.; PASCHOALINI, M.A. Phenylephrine into the median raphe nucleus evokes an anxiolytic-like effect in free-feeding rats but does not alter food intake in free feeding rats. **Behavioural Brain Research.** 217: 209–214, 2011.

MARINO-NETO, J.; SABI, M.; PASCHOALINI, M.A. Adrenergic Mechanisms. In: **Encyclopedia of Endocrine Diseases**, v.1, p. 106-111. 2004.

MASORO E.J. Caloric restriction and aging: an update. **Exp Gerontol.** 35: 299–305, 2000.

MATSUMOTO, T.; YAMANOUCHI, K.. Effects of p-chlorophenylalanine on male sexual behavior in female rats with mesencephalic raphe nuclei lesions. **Endocr. J.** 44 (3): 383–388, 1997.

MENANI, J.V.; COLOMBARI, E.; TALMAN, W.T.; JOHNSON, A.K. Commissural nucleus of the solitary tract lesions reduce food intake and body weight gain in rats. **Brain Res.**, 740: (1-2) 102-108, 1996.

MENANI, J.V.; COLOMBARI, D.S.A.E.; BELTZ, T.G.; THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Commissural nucleus of the solitary tract lesions reduce food intake and body weight gain in rats. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. **Brain Res.**, 801: (1-2) 29-35, 1998.

MENESES, A. 5-HT system and cognition. **Neurosci. Biobehav.**, 23: 1111-1125, 1999.

MENDOZA, J. Entrainment by a palatable meal induces food-anticipatory activity and c-Fos expression in reward-related areas of the brain. **Neuroscience**, 133: 293–303, 2005.

MONTGOMERY, A. M. J.; FLETCHER, P. J.; BURTON, M. J. Behavioral and pharmacological investigations of 5-HT hypophagia and hyperdipsia. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 25: 23-28, 1986.

MORAN, T. SCHWARTZ, G. Neurobiology of cholecystokinin. **Crit. Rev.Neurobiol.** 9: 1-28, 1994.

MORGANE, P.J.; GALLER, J.R.; MOKLER, D.J. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. **Prog Neurobiol**, 75:143–60, 1995.

NEARY, N. M.; GOLDSTONE, A. P.; BLOOM, S. R. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. **Clinical Endocrinol.**, 60(2): 153-160, 2004.

O'LEARY, O. F.; BECHTHOLT, A. J.; CROWLEY, J. J.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. The role of noradrenergic tone in the dorsal raphe nucleus of the mouse in the acute behavioral effects of antidepressant drugs. **Eur. Neuropsychopharmacol.**; 17, 215-226, 2007.

OTTONI, E. B. Etholog2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. **Behav. Res. Methods, instruments & Computers.**, 32: 446- 449, 2000.

PATRICK, O. L. Eating disorders: a review of the literature with emphasis on medical complications and clinical nutrition. **Altern. Med. Rev.**, 07: 184-202, 2002.

PAXINOS. G.; WATSON, C.; **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 6th ed. New York: Academic Press & Elsevier Inc., 2007.

PERRIN, D.; MAMET, J.; GELOEN, A.; MOREL, G.; DALMAZ, Y.; PEQUIGNOT, J. M.; Sympathetic and brain monoaminergic regulation of energy balance in obesity-resistant rats. **Auton. Neurosci.**, 109 (1-2): 1-9, 2003.

PESIC, V.; MARINKOVIC, P.; JANAC, B.; IGNJATOVIC, S.; POPIC, J.; KANAZIR, S.; RUZDIJIC, S. Changes of behavioral parameters during long-term food restriction in middle-aged Wistar rats. **Physiology & Behavior**, 101: 672–678, 2010.

PHILIP, M.; HEIN, L. Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptors subtypes. **Pharmacol. and Therapeutics**. 101 (1): 65-74, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. Guanabra Koogan: Rio de Janeiro, 6 ed. 2007.

REIDY, S.P.; WEBER, J.M. Leptin: an essential regulator of lipid metabolism, **Comp. Biochem. Physiol. Part A**. 125: 285-297, 2000.

ROSIN D.L.; ZENG D.; STORNETTA R.L.; NORTON F.R.; RILLEY T.; OKUSA M.D.; GUYENET P.G.; LYNCH K.R. Immunohistochemical localization of  $\alpha_{2A}$  adrenergic receptors in catecholaminergic and other brainstem neurons in the rat. **Neuroscience**, 56: 139-155, 1993.

ROWLAND, N. E.; MORIEN, A.; LI, B. The physiology and brain mechanisms of feeding. **Nutrition**, 12: 626-639, 1996.

SALAMONE, J. D.; CORREA M., MINGOTE, S.; WEBER, S.M. Nucleus Accumbens Dopamine and the Regulation of Effort in Food-Seeking Behavior: Implications for Studies of Natural Motivation, Psychiatry, and Drug Abuse **Perspectives in Pharmacology**. 301: 1-8 2002.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE-JR, D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, 404: 661-671, 2000.

SEELEY, R.J. Neurological dissociation of gastrointestinal and metabolic contributions to meal size control. **Behav. Neurosci.**, 108: 347–352, 1994.

SHISHEVA, A.C.; IKOMONOV, O.C. STOYNEV, A.G.; POPOVA J. Renin release and water-salt balance after central serotonin depletion by

p-chlorophenylalanine in Brattleboro and Wistar rats: Possible role of ADH. **Endocrinol Exp.** 21: 219-28, 1987.

SMITH, G.P. The Direct and Indirect Controls of Meal Size. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Vol. 20, No. 1, pp. 41--46, 1996

SMITH, G.P. The Controls of Eating: A Shift from Nutritional Homeostasis to Behavioral Neuroscience. **Nutrition**, 16:814–820, 2000

STANLEY, B. G.; HA, L. H.; SPEARS, L. C.; DEE, M. G. Lateral hypothalamic injections of glutamate, kainic acid, D, L- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-isxazole propionic acid or N-methyl-D-aspartic acid rapidly elicit intense transient eating in rats. **Brain Res.**, 613: 88-95, 1993a.

STANLEY, B. G.; HA, L. H.; SPEARS, L. C.; DEE, M. G. The lateral hypothalamus: a primary site mediating amino acid-elicited eating. **Brain Res.**, 630: 41-49, 1993b.

STRATFORD, T.R.; WIRTSHAFTER, D. Evidence for a projection from B9 serotonergic cell group to the median raphe nucleus. **Brain Research Bulletin.** 21: 325-328, 1988.

STRICKER, E.M.; WOODS, S.C. Neurobiology of Food and Fluid Intake. **Handbook of behavioral neurobiology.** Kluwer Academic Plenum Publishers, 2004.

STRUBBE, J.H.; KEYSER, J., DIJKSTRA, T.; PRINS, A.J. Interaction between circadian and caloric control of feeding behavior in the rat. **Physiol Behav.** 36: 489–493, 1986.

STRUBBE, J.H, WOODS, S.C. The timing of meals. **Psychol Rev** ,111: 128– 141, 2004.

SUCAJTYS-SZULC, E.; GOYKE, E.; KORCZYNSKA J.; STELMANSKA E.; RUTKOWSKI B.; SWIERCZYNSKI J. Chronic food restriction differentially affects NPY mRNA level in neurons of the hypothalamus and in neurons that innervate liver. **Neurosci Lett** 433: 174–177, 2008.

SUSUKI, K.; SIMPOSON, K.A.; MINNION, J.S.; SHILLITO, J.C.; BLOOM, S.R. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. **Endocrine Journal**, 57 (5): 359-372, 2010.

TAKASE, L.F.; NOGUEIRA, M.I. Patterns of Fos activation in tar raphe nuclei during feeding behavior. **Brain Res.**, 1200: 10-18, 2008.

TOLLE, V.; KADEM, M.; BLUET-PAJOT, M.T.; FRERE, D.; FOULON, C.; BOSSU, C.; DARDENNES, R.; MOUNIER, C.; ZIZZARI, P.; LANG, F.; EPELBAUM, J.; ESTOUR, B. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. **J Clin Endocrinol Metab**, 88: 109–116, 2003.

TSCHOP, M.; WAWARTA, R.; RIEPL, R.L.; FRIEDRICH, S., BIDLINGMAIER, M.; LANDGRAF, R.; FOLWACZNY, C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. **J Endocrinol Invest**, 24: RC19–RC21, 2001.

VAN DER GUGTENA, J.; KLOETA, E. R.; VERSTEEGA, D. H. G.; SLANGENB, J. L. Regional hypothalamic catecholamine metabolism and food intake regulation in the rat. **Brain Res.**, 135: 325-336, 1977.

VERTES, R. P.; MARTIN, G. F. Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe in the rat. **J. Comp. Neurol.**, 275: 511-541, 1988

VERTES, R.P.; CRANE, A.M. Distribution, quantification, and morphological characteristics of serotoninimmunoreactive cells of the suprallemniscal nucleus (B9) and pontomesencephalic reticular formation in the rat, **J. Comp. Neurol.**, 378: 411–424, 1997.

VERTES R.P.; FORTIN, W.J.; CRANE, A.M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **J Comp Neurol.**, 407: 555– 582, 1999.

VERTES, R.P.; LINLEY, S.B. Comparison of projections of the dorsal and median raphe nuclei, with some functional considerations. **International Congress Series**, 1304: 98–120, 2007.



WILLIAMS, G.; BING, C. CAI, X.J; HARROLD, J.A; KING, P.J; LIU, X.H. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. **Physiol. Behav.**, 74: 683-701, 2001.

WIRTSHAFTER, D.; STRATFORD, T. R.; PITZER, M. R. Studies on the behavioral activation produced by stimulation of GABAB receptors in the median raphe nucleus. **Behav. Brain Res.**, 59, 83-93, 1993.

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

WOOD, S.; SEELEY, R.J. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. **Nutrition**, 16: 894-902, 2000.

WURTMAN, R. J.; WURTMAN, J. J. Serotonergic mechanisms and obesity. **J. Nutr. Biochem.**, 9: 511-515, 1998.

YANG, Z.J. et al. Influence of anterior subdiaphragmatic vagotomy and TPN on rat feeding behavior. **Physiol. Behav.**, 51: 919–926. 1992

YOSHIOKA, M.; MATSUMOTO, M.; TOGASHI, H.; SMITH, C.B.; SAITO, H. Alpha 2-adrenoceptor modulation of 5-HT biosynthesis in the rat brain. **Neuroscience Letters**, 139: 53–56, 1992.

YURINO, H.; TSUKAHARA, S.; KORANY, L.; YAMANOUCHI, K. Inhibitory effect of postpartum lesions or cuts in median raphe nucleus on maternal behavior in female rats. **Zool. Sci.**, 18 (9): 1225–1230, 2001.

WYNNE, K.; STANLEY, S.; MCGOWAN, B.; BLOOM, S.R. Appetite control. **Journal of Endocrinology**, 184: 291–318, 2005.