

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

**EFEITOS DO BLOQUEIO DE RECEPTORES α_1 DO NÚCLEO
MEDIANO DA RAFE SOBRE O COMPORTAMENTO
ALIMENTAR E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FOS.**

**Florianópolis
Junho, 2014**

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

**EFEITOS DO BLOQUEIO DE RECEPTORES α_1 DO NÚCLEO MEDIANO DA RAFE
SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FOS.**

**ORIENTADORA: Profª Dra: Marta Aparecida Paschoalini
CONTROLE DO METABOLISMO ENERGÉTICO E DA INGESTAO ALIMENTAR
ALUNO: EDUARDO SIMÃO DA SILVA**

Tese submetida ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de doutor.

**Florianópolis
Junho, 2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Eduardo Simão da

Efeitos do bloqueio de receptores alfa 1 do núcleo mediano da rafe sobre o comportamento alimentar e expressão de proteína Fos. / Eduardo Simão da Silva ; orientadora, Marta Aparecida Paschoalini - Florianópolis, SC, 2014.

61 p.

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

Inclui referências

1. Fisiologia. 2. Ingestão de alimentos. 3. Adrenalina.
4. Núcleo Mediano da Rafe. I. Paschoalini, Marta Aparecida. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. III. Título.

Eduardo Simão da Silva

**EFEITOS DO BLOQUEIO DE RECEPTORES ALFA 1 DO NÚCLEO MEDIANO DA
RAFE SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA
FOS**


Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de "Doutor", e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Florianópolis, 02 de julho de 2014

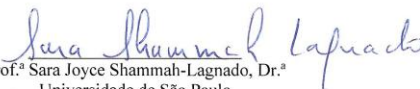


Prof. Alex Ráfacho, Dr.
Coordenador do Curso

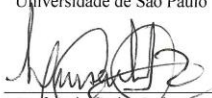
Banca Examinadora:



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



Prof.ª Sara Joyce Shammah-Lagnado, Dr.ª
Universidade de São Paulo



Prof. Luis Carlos Reis, Dr.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof.ª Mariajha Graciela Terenzi, Dr.ª
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.ª Domitila Augusta Huber, Dr.ª
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.ª Fernanda Barbosa Lima Christian, Dr.ª
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida.

À Kathryn, minha esposa, pela força e paciência durante todo o processo.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram e serviram de exemplo.

À professora Marta Aparecida Paschoalini, pela oportunidade que me ofereceu e pela liberdade que me deu para a execução de todas as atividades relacionadas ao doutorado. Foi muito importante para meu amadurecimento.

Aos colegas que contribuíram mais diretamente na execução deste trabalho, Rafael Appel Flores, Elisa Caroline Cella, que foram sempre muito dedicados.

Aos colegas do laboratório, Brunno Rocha Levone, Larissa Kochenborger, Ana Paula Taschetto, Anderson Savaris Ribas, sempre presentes e dispostos a ajudar. Por permitirem que nossa colaboração fosse além do cafezinho e se estendesse à produção científica.

Ao professor José Donato Junior que abriu seu laboratório e tornou possível importante parte deste trabalho.

Ao professor Alex, cuja notável dedicação para com o Programa Multicêntrico foi inspiradora.

Aos muitos professores e colegas das unidades nucleadoras da UFMG, USP-RP, UFRGS e USP-SP, com quem aprendi muito e que sempre me receberam muito bem.

Aos funcionários do departamento de ciências fisiológicas: Carlos Espíndola e Dona Vilma.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À todos meu muito obrigado!

Resumo

A serotonina (5HT) é um neurotransmissor envolvido no controle da ingestão de alimentos. O tronco encefálico é uma região importante para a produção da 5HT, sendo que, uma região de concentração desses neurônios são os núcleos da rafe. Dados da literatura apontam o núcleo mediano da rafe (MnR) como uma região de neurônios serotoninérgicos. Estes neurônios projetam-se para o hipotálamo, região de controle importante para o controle ingestivo. Dados de nosso laboratório revelam que a ativação de receptores adrenérgicos no MnR produz diferentes resultados dependendo do *status* energético. Injeções de adrenalina no MnR em animais com livre acesso ao alimento provocou o aumento da ingestão de alimentos. Enquanto que a injeção de adrenalina no MnR de animais com alimentação restrita provocou diminuição da ingestão. Essas ações são mediadas por receptores alfa 1 e alfa 2 presentes no MnR. Este trabalho se propõe ao estudo da participação dos subtipos de receptores alfa (α_{1A} , α_{1B} e α_{1D}) na ingestão de alimentos e comportamento em 1 hora ou sobre a ingestão de alimentos em 4 horas após a injeção de antagonista específico no MnR, avaliar a expressão de proteína Fos por imunohistoquímica após injeção de antagonista α_1 no MnR em regiões do hipotálamo e amígdala e identificar o tipo de célula da área hipotalâmica lateral está expressando a proteína Fos. Animais saciados receberam injeção intra-MnR de diferentes doses de RS100329, um antagonista específico do receptor α_{1A} , de Rec 15/2615, um antagonista específico de receptores α_{1B} ou de BMY 7378 um antagonista α_{1D} . A dose de 20 nmol de RS100329 aumentou a ingestão de alimentos e a duração e frequência, bem como diminuiu a latência, do comportamento de comer. A injeção de Rec 15/2615 aumentou, na dose de 4 nmol, a duração do comportamento de comer e a ingestão de alimentos na segunda hora de avaliação. A injeção de BMY 7378 aumentou a ingestão de alimentos na primeira hora e também diminuiu latência e aumentou frequência e duração do comportamento de comer, bem como diminuiu a ingestão de água na segunda hora de experimento. A injeção de prazosina aumentou a ingestão de alimentos e a expressão de proteína Fos na área hipotalâmica lateral e amígdala basolateral. O aumento de expressão de proteína Fos se deu em neurônios orexina reativos. Em conjunto esses dados corroboram os encontrados em trabalhos anteriores da nossa linha de pesquisa, mostrando que a ação da prazosina se dá através de receptores α_{1A} e α_{1D} , uma resposta hiperfágica mais lenta envolvendo o receptor α_{1B} , e ainda que o bloqueio dos receptores α_{1D} diminuiu a ingestão de água 2h após a injeção. Os dados de imunohistoquímica sugerem que a hiperfagia gerada pelo bloqueio adrenérgico α_1 é gerada a partir de regiões relacionadas ao controle motivacional da ingestão de alimentos.

Abstract

The serotonin (5HT) is a neurotransmitter enrolled in the control of food intake. The brainstem is an important site for the production of 5HT, particularly the raphe nuclei. According to literature the median raphe nucleus (MnR) is an important source of prosencephalic 5HT. Data from our laboratory revealed that activation of adrenergic receptors in the MnR evoke different results depending on nutritional status. Adrenaline injections into the MnR in free feeding animals results in hyperphagia. While in food restricted animals adrenaline injections into the MnR evoked hypophagia. This actions seem to be mediated by alfa receptors in the MnR. The purpose of this work is to study the participation of alfa1 subtypes (α_{1A} , α_{1B} e α_{1D}) in food intake and behavior (for 1h after injection) and food intake for up 4h after injection. Also, we proposed to evaluate Fos protein expression after α_1 antagonist injection into the MnR on regions of hypothalamus and amygdala, and identify the type of cell in the hypothalamic area to express the Fos protein. Free feeding animals received intra-MnR injection of different doses of RS100329, an α_{1A} antagonist, Rec 15/2615 an α_{1B} antagonist or BMY 7378 an α_{1D} antagonist. The 20 nmol dose of RS 100329 increased food intake, duration and frequency of eating and decreased latency to start eating. The 4 nmol dose of Rec 15/2615 increased the duration of eating behavior and food intake 2h after injection. BMY 7378 increased food intake during the first hour and decreased latency, and increased duration and frequency, of eating behavior. BMY 7378 also decreased water intake 2h after the injection. Prazosin injection into MnR increased food intake and Fos protein expression in lateral hypothalamic area and basolateral amygdala. The increase of Fos protein was specifically higher in orexin reactive neurons. Collectively, our results corroborates data from previous work, showing that prazosin actions occur through α_{1A} and α_{1D} receptors, that α_{1B} blockade is responsible for a slowly hyperphagic response and that blockade of α_{1D} receptor is involved in the decreased water intake. Immunohistochemistry data suggest that hyperphagia observed by α_1 blockade is related to motivational control of food intake.

Lista de Figuras

Figura 1. Desenho esquemático da ação da adrenalina sobre receptores alfa1 em neurônios do MnR.	26
Figura 2: Fotografia de uma das caixas experimentais utilizadas.	35
Figura 3. Foto de um indivíduo amostral representativo.	40
Figura 4. Efeitos da injeção de RS 100329 sobre a ingestão de alimentos .42	
Figura 5. Efeitos da injeção de RS 100329 sobre os comportamentos ingestivos	43
Figura 6. Efeitos da injeção de Rec 15/2615 sobre a ingestão de alimentos47	
Figura 7. Efeito da injeção de Rec 15/2615 sobre a duração do comportamento ingestivo.	48
Figura 8. Efeitos da injeção de BMY 7378 sobre a ingestão de alimentos 50	
Figura 9. Efeitos da injeção de BMY 7378 sobre os comportamentos ingestivos.	51
Figura 10. Efeitos da injeção intra-MnR de diferentes doses de prazosina sobre a ingestão de alimentos.....	52
Figura 11. Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos.53	
Figura 12. Efeitos da injeção de prazosina sobre a expressão de proteína Fos.....	54
Figura 13. Fotomicrografias representativas da expressão de Fos e hormônio concentrador de melanina (MCH).....	56
Figura 14. Esquema representativo da expressão de Fos e orexina.....	57

Lista de Quadros

Quadro 1. Catálogo com a descrição dos comportamentos utilizados na avaliação e quantificação comportamental.....	36
--	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Efeitos da injeção de diferentes doses de RS100329 sobre a duração da exploração do ambiente, exploração vertical, auto-limpeza, imobilidade e locomoção..	44
Tabela 2 Efeitos da injeção de diferentes doses de Rec 15/2615 sobre a duração da exploração do ambiente, exploração vertical, auto-limpeza, imobilidade e locomoção.	46
Tabela 3 Efeitos da injeção de diferentes doses de BMY7378 sobre a duração da exploração do ambiente, exploração vertical, auto-limpeza, imobilidade e locomoção..	49

Lista de abreviaturas

5HT: (5-hidroxi-triptamina) Serotonina
5HT_{1A}: Receptor serotoninérgico 1A
8OH-DPAT: 8hidroxi-2 (di-n-propilamino) tetralina
AD: Adrenalina
AGRP: Perpídeo relacionado ao gene agouti
ARC: Núcleo arqueado
BLA: Núcleo basolateral da amígdala
CeA: Núcleo central da amígdala
CLO: Clonidina
DAB: Diaminobenzidina
DMD: Núcleo hipotalâmico dorsomedial
DR: Núcleo dorsal da rafe
GABA: Ácido gama-aminobutírico
GABA_A: Receptor gabaérgico A
GABA_B: Receptor gabaérgico B
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
ICV: intracerebroventricular
KPBS: Solução de tampão de fosfato de potássio
LH: Área hipotalâmica lateral
MC3: receptor melanocortina tipo 3
MC4: receptor melanocortina tipo 4
MCH: Hormônio concentrador de melanina
MnR: Núcleo mediano da rafe
mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro
NAc: núcleo acumbens
NMDA: Receptor N-metil D-aspartato
NTS: Núcleo do trato solitário
PBS: Solução de tampão fosfato
PFA: Paraformaldeído
POMC: Proopiomelanocortina
PVN: Núcleo paraventricular do hipotálamo
SNC: Sistema nervoso central
VLPO: núcleo pré-óptico ventrolateral
VMN: Núcleo ventromedial do hipotálamo

Sumário

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 O papel da serotonina e do núcleo mediano da rafe na ingestão de alimentos:	23
1.2 Os receptores adrenérgicos do MnR e a ingestão de alimentos:	25
1.3 O papel do hipotálamo na ingestão de alimentos:	27
1.4 O controle motivacional da ingestão de alimentos:	29
1.5 O controle motivacional da ingestão de alimentos e 5HT:	30
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo geral	32
2.2. Objetivos Específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Animais:	33
3.3 Drogas	34
3.4. Registro comportamental	34
3.5 Perfusão para análise histológica	37
3.6 Imunohistoquímica	37
3.6.1 Reação imunohistoquímica para proteína FOS:	38
3.6.2 Reação imunohistoquímica para dupla marcação FOS/orexina ou FOS/MCH:	38
3.7 Análise e contagem das marcações	39
3.8 Análise estatística	39
4. RESULTADOS:	40
4.1 Injeção do antagonista alfa 1A RS100329	41
4.2 Injeção do antagonista alfa 1B Rec15/2615	45
4.3 Injeção do antagonista alfa 1D BMY 7378	48
4.4 Efeitos da injeção do antagonista alfa 1 prazosina	52
4.5 Análise da expressão de Fos em núcleos hipotalâmicos e amígdala após a injeção de prazosina ou veículo no MnR:	40
.....	52
4.6 Análise da dupla marcação Fos/orexina ou Fos/MCH na área hipotalâmica lateral de animais injetados com prazosina ou veículo no MnR:	55
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 O papel da serotonina e do núcleo mediano da rafe na ingestão de alimentos:

A serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT) é um neurotransmissor que participa de uma série de eventos no sistema nervoso central (SNC). Entre outros aspectos a 5-HT participa do controle do ciclo sono vigília (Pickard e Rea, 1997), da modulação central da nocicepção (Richardson, 1990), da regulação da ingestão hídrica (Oliveira Margatho *et al.*, 2002), da ingestão de alimentos e da termorregulação (Clark e Lipton, 1986).

Os núcleos da rafe são de particular importância para as funções do SNC. Esta coleção de neurônios distribuídos rostro-caudalmente pelo tronco encefálico com características neuroquímicas, morfológicas e de projeção distintas, projeta grande número de fibras serotoninérgicas ao SNC (Wirtshafter, 2001; Adell *et al.*, 2002; Hornung, 2003; Walther e Bader, 2003; Takase e Nogueira, 2008; Mokler *et al.*, 2009). Os neurônios cujos corpos celulares estão distribuídos pelos núcleos da rafe exibem prolongamentos para várias regiões do encéfalo, como córtex cerebral, núcleos, tálamo, hipotálamo e para o próprio tronco encefálico (Lechin *et al.*, 2006). Um importante sítio de origem da projeção de fibras serotoninérgicas para o encéfalo é o núcleo mediano da rafe (MnR) (Lucki, 1998; Hornung, 2003; Mokler *et al.*, 2009). O MnR inerva o hipocampo dorsal, septo medial, núcleo acumbens (centro), área tegmental ventral, amígdala central (CeA) e amígdala basolateral (BLA), além de diversos núcleos hipotalâmicos como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), a área hipotalâmica lateral (LH), o núcleo arqueado (ARC) e o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMN) (Azmitia e Segal, 1978; Vertes *et al.*, 1999).

O MnR é uma área rica em receptores 5-HT_{1A} (Sotelo *et al.*, 1990; Kia *et al.*, 1996; Adell *et al.*, 2002; Cryan *et al.*, 2002; Judge e Gartside, 2006). A maior parte destes receptores é encontrada em neurônios serotoninérgicos e tem função de autorreceptores que regulam a

síntese e liberação de 5-HT nas áreas de projeção (Hall *et al.*, 1997; Adell *et al.*, 2002). Injeções do agonista dos receptores 5-HT_{1A} 8-hidroxi-2-(di-*n*-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT) no MnR inibe o disparo de neurônios serotoninérgicos e a liberação de 5HT nas estruturas prosencefálicas terminais (Bonvento *et al.*, 1992; Andrews *et al.*, 1994; Avanzi e Brandao, 2001; Adell *et al.*, 2002; Funk *et al.*, 2005). Funcionalmente, a injeção de 8-OH-DPAT no MnR aumenta a ingestão de alimentos (Currie *et al.*, 1994). Dessa forma, a inibição dos neurônios serotoninérgicos do MnR diminui, a influência inibidora da 5HT sobre circuitos que levam à hiperfagia. A injeção de outros agentes no MnR também modificam a ingestão de alimentos. Muscimol, agonista GABA_A (Klitenick e Wirtshafter, 1989; Wirtshafter, 2001) e baclofen, um agonista GABA_B, aumentam a ingestão de alimentos quando injetados no MnR (Wirtshafter, 2001). De maneira similar, a injeção de antagonistas glutamatérgicos (ácido quinurenico e ácido 2-amino-5-fosfonoaléxico) (Wirtshafter e Trifunovic, 1988) bem como do antagonista NMDA (Wirtshafter e Krebs, 1990) também aumentam a ingestão de alimentos quando injetados no MnR. Dessa forma, acredita-se que o MnR exerça ação inibitória sobre o hipotálamo e a ingestão de alimentos.

Os neurônios do MnR recebem inervação do lócus cerúleo e subcerúleo, área tegmental lateral e grupo de corpos celulares A1 e A2 (Hopwood e Stamford, 2001; Adell *et al.*, 2002; Cryan *et al.*, 2002; Lechin *et al.*, 2006). O MnR expressa RNAm para os subtipos de receptores adrenérgicos α_1 como o α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} (Day *et al.*, 1997) e α_2 : α_{2A} (Scheinin *et al.*, 1994; Talley *et al.*, 1996) e α_{2C} (Rosin *et al.*, 1996). Experimentos demonstram que noradrenalina endógena facilita a liberação de 5HT por agir em receptores adrenérgicos α_1 e controle inibitório através de receptores adrenérgicos α_2 (Adell e Artigas, 1999). Injeção de clonidina (CLO), um agonista adrenérgico α_2 diminui a liberação de 5HT no próprio MnR em 30% dos valores basais enquanto que o antagonista α_2 aumenta a liberação (Adell e Artigas, 1999).

1.2 Os receptores adrenérgicos do MnR e a ingestão de alimentos:

Os receptores adrenérgicos são classificados como α ou β . Subdivisões dessas amplas classes de receptores foram determinadas baseadas em critérios como localização pré- e pós-sináptica, afinidade a ligantes e sistemas de segundos mensageiros. De maneira geral, os receptores β e os receptores α_2 estão, respectivamente, acoplados positiva e negativamente à adenilil ciclase, enquanto que a via fosfatidilinositol está envolvida nas respostas do receptor α_1 (Day *et al.*, 1997). A atual classificação para os receptores adrenérgicos é: α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} ; α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} ; β_1 , β_2 e β_3 (Day *et al.*, 1997).

Do ponto de vista funcional, estudos realizados no nosso laboratório revelam que a injeção de adrenalina (AD), mas não de noradrenalina, no MnR diminui a ingestão de alimentos e encurta a duração da ingestão em ratos submetidos a restrição alimentar (Maidel *et al.*, 2007). Todavia, injeção de AD no MnR de ratos com livre acesso ao alimento aumenta a ingestão de alimentos, frequência de alimentação e diminui a latência para iniciar ingestão (Dos Santos *et al.*, 2009). Tendo em vista a ação inibitória da 5HT sobre o comportamento alimentar tem sido descrita extensivamente (Dourish *et al.*, 1985b; Wirtshafter e Trifunovic, 1988; Currie e Coscina, 1993; Schreiber *et al.*, 2000) e que a inervação serotoninérgica de núcleos hipotalâmicos como núcleo paraventricular (PVN), núcleo arqueado (ARC), área hipotalâmica lateral (LH) especialmente região perifornical, regiões importantes onde a 5HT tem sido implicadas na regulação da ingestão de alimento, emerge de projeções serotoninérgicas do MnR (Azmitia e Segal, 1978; Moore *et al.*, 1978; Van De Kar e Lorens, 1979; Vertes *et al.*, 1999) nós sugerimos que a hipofagia induzida por AD nos animais com restrição alimentar seja possivelmente resultado da ativação de receptores adrenérgicos α_1 presentes em neurônios serotoninérgicos do MnR, resultando em ação inibitória da 5HT sobre a ingestão de alimentos (Maidel *et al.* 2007). O efeito hiperfágico da injeção de AD em ratos com livre acesso ao alimento pode ser atribuído a ativação de receptores adrenérgicos α_2 do MnR, que por reduzir a disponibilidade de AD endógena na sinapse, poderia suprimir a

liberação de 5HT e sua ação inibitória no comportamento alimentar (Dos Santos *et al.*, 2009)(Ver figura 1). Além disso, existem similaridades entre o efeito gerado pela AD e o 8-OH-DPAT. A ingestão de alimentos provocada pelo tratamento com 8-OH-DPAT varia dependendo do estado nutricional. O tratamento com 8-OH-DPAT provoca hipofagia em animais com alimentação restrita e hiperfagia em animais saciados (Ebenezer *et al.*, 2007). A hiperfagia provocada pelo 8-OH-DPAT foi atribuída à ativação de autorreceptores 5HT_{1A} no MnR levando à inibição da atividade neuronal serotoninérgica e reduzindo a síntese e liberação de 5HT nas áreas terminais presencefálicas (Dourish *et al.*, 1985a; Currie e Coscina, 1993). Estas evidências reforçam a sugestão de que neurônios serotoninérgicos do MnR seriam mediados os efeitos adrenérgicos sobre o comportamento alimentar.

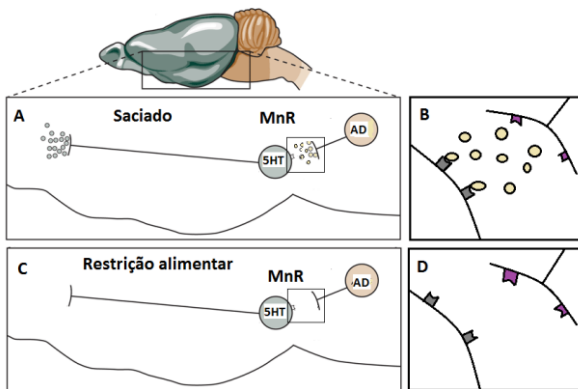


Figura 1. Desenho esquemático da ação da adrenalina sobre receptores alfa1 em neurônios do MnR. No animal saciado (A e B) a adrenalina (AD, círculos amarelos) endógena exerce ação facilitatória sobre neurônios do MnR, provavelmente serotoninérgicos, ao ativar receptores alfa1 (em cinza, na superfície de neurônios 5HT). Nessa situação, a injeção intra-MnR de fenilefrina (agonista α_1) não resulta em resposta, pois os receptores já estão ocupados, e a clonidina (agonista α_2) aumenta a ingestão de alimentos ao ativar receptores α_2 (em roxo no botão pré-sináptico), diminuindo a liberação de AD endógena e, conseqüentemente, sua ação facilitatória sobre os neurônios MnR. A ação da AD exógena nessa situação é sobre os receptores α_2 gerando efeito semelhante à clonidina (hiperfagia). No animal em restrição alimentar (C e D) há diminuída ação da AD endógena sobre os neurônios 5HT, portanto há pouca ação facilitatória sobre a liberação de 5HT. Nessa situação a fenilefrina age sobre os receptores α_1 , aumenta a atividade de neurônios 5HT e conseqüentemente diminui a ingestão de alimentos. Já a injeção intra-MnR de AD no animal em restrição alimentar gera diminuição da ingestão de alimentos pela ativação de receptores α_1 .

1.3 O papel do hipotálamo na ingestão de alimentos:

Os primeiros experimentos que trataram do papel do hipotálamo como estrutura controladora do comportamento alimentar foram experimentos de lesão. A lesão bilateral do hipotálamo mediobasal, incluindo o hipotálamo ventromedial (VMN) e o núcleo arqueado (ARC) demonstraram o envolvimento desta área no controle do peso corporal e da ingestão de alimentos (para revisão (Elmqvist *et al.*, 1999). Recentemente, as bases neuroquímicas do estudo dessas regiões do hipotálamo foram ampliadas pela descoberta de que essa região é alvo da ação da leptina que reduz a ingestão de alimentos e peso corporal através de neurônios do ARC e VMN (Baskin *et al.*, 1999). Fibras aferentes vagais do trato gastrointestinal convergem para o núcleo do trato solitário (NTS) e daí para a LH. Desde o trabalho pioneiro de Arees e Mayer (1967) demonstrando as conexões neurais entre a LH e o hipotálamo medial, muitos outros trabalhos anatômicos, eletrofisiológicos, neuroquímicos e patofisiológicos se somaram e consolidaram os papéis desses núcleos nas suas recíprocas funções na ingestão de alimentos (Fetissov *et al.*, 2000).

As monoaminas podem exercer controle sobre os núcleos hipotalâmicos. A liberação aumentada de noradrenalina e dopamina na LH estão associadas com inibição da ingestão de alimentos (Szczyпка *et al.*, 2000). O aumento da liberação de 5HT nos núcleos hipotalâmicos mediais está associada a diminuição da ingestão de alimentos (Smith *et al.*, 1999). Assim parece existir um efeito da liberação das monoaminas, o qual está especificamente coordenado entre as áreas hipotalâmicas lateral e medial em relação à ingestão do alimento.

Diversos trabalhos ampliam o horizonte de conhecimento sobre o papel da 5HT sobre núcleos hipotalâmicos. Animais transgênicos com ausência de receptores para a 5HT apresentam anormalidades relacionadas ao peso corporal e ingestão de alimento (Nonogaki *et al.*, 1998). A liberação de 5HT no hipotálamo está aumentada durante a ingestão promovendo a saciação (Schwartz *et al.*, 1989) e seus níveis refletem a ingestão de carboidratos (Hoebel *et al.*, 1989). Vários estudos tem caracterizado o papel da 5HT e do sistema serotoninérgico na

inibição da ingestão de alimentos. A sugestão de que a 5HT age inibindo a ingestão de alimentos está baseada em achados que demonstram que diversos agonistas e antagonistas serotoninérgicos agindo em sinapses do sistema nervoso central causam dramática redução da ingestão (Hoebel *et al.*, 1989).

É importante ressaltar que a LH, incluindo a região perifornical, desde os estudos iniciais de lesão de Anand e Brobeck (1951), veem sendo implicada na regulação do comportamento ingestivo. A LH possui neurônios que expressam dois peptídeos importantes para o desempenho de suas funções: o hormônio concentrador de melanina (MCH) e a orexina (Bittencourt *et al.*, 1992; De Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998). Os neurônios contendo esses peptídeos estão entremesclados na LH, embora não co-expresssem os peptídeos (Broberger *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 1998), e os grupos celulares que os expressam mantêm projeções abrangentes (Bittencourt *et al.*, 1992; Peyron *et al.*, 1998; Chemelli *et al.*, 1999). Injeções intracerebroventriculares (ICV) de MCH aumentam a ingestão de alimentos em ratos e os níveis de RNAm de MCH estão aumentados na privação alimentar. Camundongos deficientes de leptina (*ob/ob*) apresentam níveis elevados de RNAm de MCH (Qu *et al.*, 1996). Camundongos *knock-out* para o MCH são hipofágicos e tem baixo peso corporal e camundongos que superexpressam MCH são obesos e hiperleptinêmicos (Shimada *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 2001).

O papel das orexinas se mostra um pouco mais complexo. Injeções ICV de orexina aumentam a ingestão de alimentos e a restrição alimentar aumenta a expressão de RNAm de orexina (Sakurai *et al.*, 1998; Clegg *et al.*, 2002). Estudos vêm demonstrando o papel fundamental da orexina na coordenação de respostas endócrinas e autonômicas à queda dos níveis de glicose. Por exemplo, a hipoglicemia induz expressão de Fos em neurônios orexinérgicos e aumenta a expressão de RNAm de orexina (Cai *et al.*, 1999; Griffond *et al.*, 1999; Moriguchi *et al.*, 1999). Assim, os neurônios orexinérgicos representam uma população de neurônios da LH que são inibidos por glicose, pois respondem às quedas fisiológicas de glicose com aumento da atividade.

Os neurônios orexinérgicos como os que expressam MCH possuem padrões de projeção similares para estruturas que reconhecidamente participam do controle da ingestão de alimentos (Bittencourt *et al.*, 1992; Peyron *et al.*, 1998; Chemelli *et al.*, 1999) e seus receptores são expressos nessas regiões (Kilduff e De Lecea, 2001; Kokkotou *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2001). Os alvos para ação desses peptídeos incluem sistemas motores do tronco encefálico envolvidos em comportamentos como mastigação e deglutição, como neurônios motores dos nervos cranianos trigeminal, facial e hipoglosso, bem como áreas reticulares vizinhas que constituem geradores de padrão para esses comportamentos (Yamamoto *et al.*, 1989; Lund *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1999; Travers *et al.*, 2000). Os neurônios que sintetizam MCH e orexina também inervam núcleos pré-ganglionares parassimpáticos e simpáticos do tronco encefálico e medula espinal, respectivamente. Essas regiões são críticas para a promoção da salivação, motilidade esofágica e gástrica e regulação da secreção de hormônios pancreáticos, incluído insulina e glucagon (Ahren, 2000; Katschinski, 2000). Um terceiro alvo dos neurônios orexinérgicos e que expressam MCH são grupos celulares monoaminérgicos, incluindo o lócus cerúleo (noradrenérgico), os núcleos DR e MnR (serotoninérgico, somente neurônios que expressam MCH agem sobre o MnR) e núcleo tuberomamilar (histaminérgico) (Saper *et al.*, 2001). Em adição, os neurônios produtores de orexina e MCH mantêm projeções difusas para todo o córtex cerebral.

1.4 O controle motivacional da ingestão de alimentos:

A motivação para ingerir alimentos não é somente controlada por necessidades metabólicas, mas também por fatores extrínsecos que não estão relacionados com o balanço energético (Woods, 2005; Berthoud, 2007). Sinais ambientais, incluindo o aprendizado de pistas pareadas com alimento, podem sobrepujar os sinais homeostáticos e estimular a ingestão de alimentos mesmo num estado saciado ou inibir a ingestão em estados de fome (Stroebele e De Castro, 2004; Popkin *et al.*, 2005; Petrovich e Gallagher, 2007). Acredita-se que a modulação não metabólica de sistemas neurais que controlam a ingestão de alimentos pode

contribuir para a desregulação do apetite e para desordens da ingestão (Petrovich *et al.*, 2009). De fato, estresse, medo e ansiedade já foram ligados na literatura à cessação da alimentação, anorexia nervosa (Klein e Walsh, 2004; Kaye, 2008) e ao aumento da ingestão (Tamashiro *et al.*, 2007).

O comportamento de ingestão alimentar pode ser condicionado a um estímulo após pareamento. A observação do aumento da ingestão de alimentos na presença de estímulo condicionado Pavloviano para entrega de alimento está de acordo com a visão comum de condicionamento Pavloviano pelo qual o estímulo condicionado assume o controle sobre outras funções motivacionais (Holland *et al.*, 2002). Assim, um estímulo condicionado associado com a entrega de alimento enquanto o rato está privado de alimento pode provocar um estado semelhante à fome e busca de alimento quando acionado enquanto o animal está saciado. Diversas evidências implicam a Núcleo Basolateral da Amígdala (BLA) na aquisição de valor motivacional por estímulos condicionados pareados com entrega de alimentos em experimentos de condicionamento apetitivo Pavloviano. Apesar de ratos com lesão do BLA frequentemente serem capazes de simples respostas condicionadas geradas por estímulos condicionados (Holland *et al.*, 2001) eles demonstram ter profundos déficits na sua sensibilidade à aquisição de valor motivacional dos estímulos condicionados. Por exemplo, um estímulo condicionado de primeira ordem pareado com alimento deixa de servir como reforço para um estímulo condicionado de segunda ordem (Hatfield *et al.*, 1996).

1.5 O controle motivacional da ingestão de alimentos e 5HT:

Injeções sistêmicas de 8OH-DPAT produzem episódios rápidos de hiperfagia em ratos saciados (Dourish *et al.*, 1985a; Bendotti e Samanin, 1987). Esse efeito parece ser mediado por receptores 5HT_{1A} presentes nos corpos celulares de neurônios serotoninérgicos do MnR (Hutson *et al.*, 1986; 1988; Fletcher e Coscina, 1993). A administração local de 8OH-DPAT no MnR diminui a disponibilidade de 5HT no prosencéfalo (Bosker *et al.*, 1994). Esses dados sugerem que a hiperfagia induzida por essa droga ocorra por diminuição da transmissão

serotoninérgica para sítios anatômicos que controlam a ingestão de alimentos. Como já citado anteriormente vários núcleos hipotalâmicos foram ligados ao controle serotoninérgico da ingestão de alimentos. Entretanto, a infusão de 5HT diretamente no hipotálamo não foi capaz de bloquear a hiperfagia gerada pelo 8OH-DPAT. Isso sugere que a região anatômica responsável pela geração da hiperfagia possa estar em regiões extra-hipotalâmicas.

Uma região extra-hipotalâmica que pode contribuir para a hiperfagia induzida por 8OH-DPAT sistêmico é a amígdala. Lesões bilaterais da amígdala em cachorros (Fonberg, 1971) ou ratos (Korczynski e Fonberg, 1979) podem produzir aumentos da ingestão de alimentos e ganhos de peso corporal. Ganaral e Jeganathan (1998) demonstraram que lesões da BLA de ratos produzem pequenos, porém consistentes, aumentos da ingestão de alimentos por 3 semanas, gerando ganho de peso. Finalmente Parker e Coscina (2001b) demonstraram que lesões da BLA bloquearam a hiperfagia induzida por injeções sistêmicas de 8OH-DPAT.

Dado o papel dos neurônios serotoninérgicos do MnR e a atividade desempenhada pelos receptores adrenérgicos sobre a ingestão de alimentos este trabalho estudou os efeitos de injeções de drogas adrenérgicas específicas para subtipos α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} no MnR de ratos, o efeito do bloqueio dos receptores α_1 sobre a expressão de proteína Fos no hipotálamo e amígdala e a co-expressão de orexina ou MCH com proteína Fos na LH de ratos saciados. O estudo dos efeitos de drogas com maior afinidade para os subtipos de receptores α_1 e o padrão de expressão da proteína Fos no caso do bloqueio desses receptores pode elucidar o papel das catecolaminas em circuitos do tronco encefálico sobre a ingestão de alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o papel dos subtipos de receptores adrenérgicos do MnR sobre o comportamento e avaliar a expressão de proteína Fos no hipotálamo e amígdala, bem como o fenótipo de neurônio da LH que expressa proteína Fos, em ratos saciados.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Analisar os efeitos de injeções intra-MnR do antagonista adrenérgico dos receptores α_{1A} , RS100329, sobre o comportamento alimentar e ingestão de alimento de ratos saciados.
- b) Analisar os efeitos de injeções intra-MnR do antagonista adrenérgico dos receptores α_{1B} , Rec 15/2615, sobre o comportamento alimentar e ingestão de alimento de ratos saciados.
- c) Analisar os efeitos de injeções intra-MnR do antagonista adrenérgico dos receptores α_{1D} , BMY 7378, sobre o comportamento alimentar e ingestão de alimento de ratos saciados.
- d) Analisar o efeito de injeções intra-MnR do antagonista α_1 , prazosina, sobre a expressão de proteína Fos no hipotálamo e amígdala de ratos saciados.
- e) Verificar se neurônios da área hipotalâmica lateral que expressam proteína Fos expressam também orexina ou MCH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais:

Foram utilizados para cada grupo experimental 10 ratos Wistar (pesando entre 250 e 300 g), criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em temperatura e umidade controladas (22 ± 1 °C), em ciclo 12 h claro/12 h escuro, com água e ração fornecidos *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório durante um período de adaptação de pelo menos uma semana.

O presente estudo seguiu as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América (*NIH Publication No. 85-23, revisado em 1996*). Todos os procedimentos empregados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/UFSC sob o protocolo PP0597.

3.2 Cirurgia estereotáxica e injeção das drogas

Após o período de adaptação de uma semana, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg, i.p.). Uma cânula guia de aço inoxidável de 18 mm foi posicionada a 2 mm do núcleo mediano da rafe com o auxílio de aparelho estereotáxico. As coordenadas de posicionamento da cânula guia foram: Antero-posterior = -7,8mm a partir do bregma, 3,0 mm lateralmente à sutura sagital e dorso-ventral 7,0 mm. É importante ressaltar que o aparelho esterotáxico foi preparado de modo a cânula guia ser inserida no encéfalo num ângulo de 20° para evitar a lesão do DR. As coordenadas foram extraídas do atlas estereotáxico de ratos de Paxinos e Watson (2007). A cânula guia foi ancorada à calota craniana, juntamente com um parafuso inoxidável de joalheiro contra-lateralmente, com acrílico polimerizável líquido (monômero de metil metacrilato, Laboratório Dencril; Brasil) e pó acrílico (co-polímero metil metacrilato,

Laboratório Dencril; Brasil). Essa mistura de materiais forma uma estrutura sólida capaz de resistir aos eventuais choques mecânicos que poderia comprometer o posicionamento da cânula guia. Em cada cânula guia foi ajustado um mandril de aço inoxidável para evitar sua obstrução.

A administração do veículo ou das drogas foi realizada através de agulha injetora confeccionada a partir de uma agulha gengival, 30G (Injecta, Produtos Odontológicos; Brasil). A agulha injetora de 20 mm de comprimento foi conectada por um tubo de polietileno (PE 10) a uma microseringa Hamilton (Hamilton Inc; EUA) de 1 μ L. O comprimento da agulha injetora excede o comprimento da cânula guia em 2 mm. Para minimizar possíveis variações de pressão no parênquima as soluções foram administradas ao longo de 1 minuto, seguido de mais 1 minuto de espera para melhor difusão da solução pelo parênquima neural. O volume injetado foi sempre o mesmo (0,2 μ L) nos animais despertos.

3.3 Drogas

As drogas utilizadas neste estudo foram: RS100329 hidrocloreto (Tocris) antagonista α_{1A} dissolvido em solução salina 0,9% e pH 7,0. O antagonista α_{1B} Rec 15/2615 dihidrocloreto (Tocris) dissolvido em solução salina 0,9% acrescido de DMSO 5% e BMY7378 dihidrocloreto (Tocris) dissolvido em solução salina 0,9%. Foram incluídos grupos controle para cada droga e estes foram compostos por seus veículos exclusivamente. As doses para as diferentes drogas foram entre si equimolares: 2, 4 e 20 nmol.

3.4. Registro comportamental

O registro comportamental foi realizado utilizando-se uma caixa experimental (49x34x40cm, Figura 2) confeccionada com lateral transparente e espelho para melhor captura de imagens durante o registro comportamental. O animal passou por um período de habituação à caixa antes do experimento.

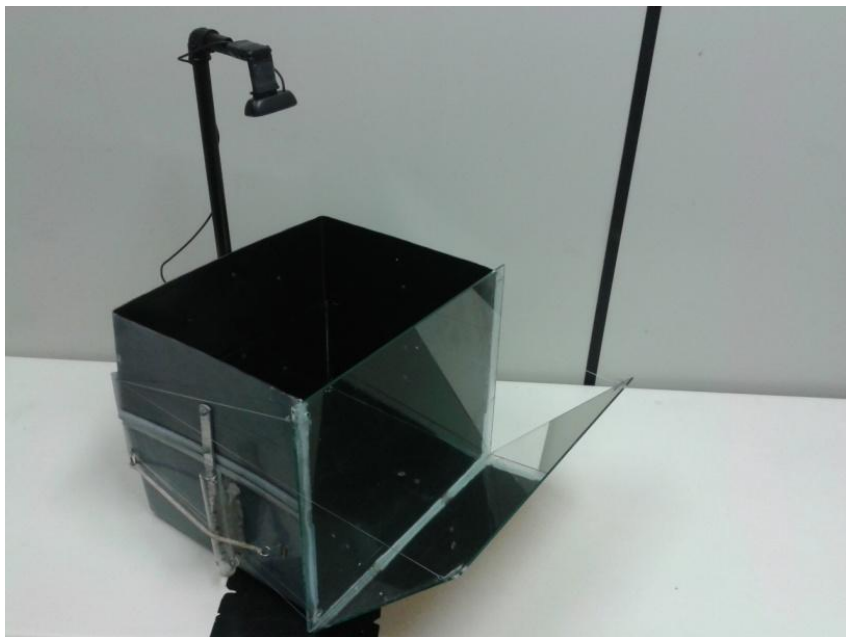


Figura 2: Fotografia de uma das caixas experimentais utilizadas.

As categorias comportamentais examinadas foram as previamente descritas por Halford *et al.* (1998). Latência, freqüência e duração de cada comportamento foram analisadas:

Ingestão de alimento (comer)	O animal ingere diretamente o alimento ou manuseia com as patas dianteiras; a quantidade ingerida refere-se à diferença entre a quantidade (g) apresentada no início e no final da sessão experimental
Ingestão de água (beber)	Quando o animal se aproxima do bico do bebedouro e lambe sua ponta.
Exploração vertical	Exploração do ambiente apoiado somente nas patas traseiras, estando as dianteiras livres (ereto).
Manutenção (auto-limpeza)	Apresentação de comportamentos típicos de auto-limpeza como: limpar a cabeça com as patas, limpar as unhas, coçar o corpo ou genitais, morder a cauda.
Locomoção	Qualquer deslocamento pela caixa, exceto quando associado a outro comportamento citado.
Imobilidade	Quando o animal permanecer imóvel sem expressar outros comportamentos citados.
Exploração do Ambiente	Neste estado o animal movimenta as vibrissas e/ou a cabeça e direciona a algum ponto da caixa. Não há deslocamento do animal.

Quadro 1. Descrição dos comportamentos utilizados na avaliação e quantificação comportamental

O registro dos comportamentos durante o experimento, digitalizado e arquivado em computador, foi realizado com uma webcam posicionada a 60 cm do assoalho da caixa de modo a permitir a visualização dorsal do animal e ao mesmo tempo lateral (auxiliado pelo espelho lateral angulado em 45°). Posteriormente os vídeos com o registro foram analisados no próprio computador e as categorias comportamentais registradas através do programa Etholog 2.2 (Otoni, 2000).

3.5 Perfusão para análise histológica

Após os experimentos os animais foram anestesiados com cloridrato de uretana e submetidos a perfusão transcardíaca com solução salina 0,9% seguida de formalina 10%. A seguir seus cérebros foram dissecados, pós-fixados por 48h em solução de formalina 10% e preservados em álcool 70%. Sequencialmente os cérebros foram saturados em solução de sacarose crioprotetora (sacarose 10% por 2h; sacarose 20% por 2h e sacarose 30% overnight), a seguir cortados em criostato (-20°C; Leica CM-1850UV) e posicionados em lâmina para coloração com Giemsa. Após a colocação da lamínula as lâminas foram analisadas em microscópio óptico e tiveram o local de injeção registrado.

3.6 Imunohistoquímica

Após injeção com prazosina (20 nmol), conforme descrito no item 3.2, os animais foram posicionados na caixa experimental por 1h, tempo após o qual a quantidade de água e ração ingeridos foram registrados. Uma hora e 30 min após a injeção os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.p.) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg i.p.) e posicionados para perfusão transcardíaca com solução salina 0,9% seguida de paraformaldeído (PFA) 4%. Os encéfalos foram dissecados, divididos em tronco encefálico (seguindo o procedimento padrão para verificação do posicionamento da injeção, item 3.5) e prosencéfalo que a seguir foi pós-fixado por 2h em PFA 4% e resfriado (4 °C) em solução tampão fosfato (PBS) com sacarose a 20%. Usando um micrótomo de congelamento os cérebros foram cortados em fatias de 40 µm e separados em 4 tubos seriados contendo solução anti-congelante de modo a haver cortes separados por 160 µm em cada tubo.

3.6.1 Reação imunohistoquímica para proteína FOS:

As reações foram realizadas pelo método de livre flutuação (“free-floating”) em placas com poços de ~10 mL nos quais foram inseridos cestas contendo as fatias de cérebros. Os cortes foram lavados em solução tampão potássio-fostato (KPBS) ou KPBS+Triton X-100 para remover a solução anti-congelante bem como entre cada passo das reações. A inibição da peroxidase endógena foi realizada por exposição ao H_2O_2 . Seguindo o protocolo os cortes passaram por inibição das ligações inespecíficas (Soro de Burro, Jackson Immunoresearch) e incubação com anticorpo primário (anti-c-Fos, 1/15000; Jackson Immunoresearch) overnight. No dia seguinte os cortes foram expostos ao anticorpo secundário por 1 h (anticorpo biotilado, Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA) e ao complexo avidina-biotina (Kit Elite Vectastain ABC, Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA) para amplificação do sinal. A reação colorimétrica com Diaminobenzidina (DAB, 2%) em presença de H_2O_2 (0,003%) e sulfato de níquel (0,5%) resultou na marcação de núcleos de células que expressaram a proteína FOS em azul-escuro. Os cortes foram dispostos em lâminas, desidratados e cobertos com lamínulas para quantificação da marcação.

3.6.2 Reação imunohistoquímica para dupla marcação FOS/orexina ou FOS/MCH:

Outro conjunto de cortes foi selecionado e os procedimentos para a dupla marcação foram realizadas após as reações descritas no item 3.6.1 seguido de inibição da peroxidase endógena com H_2O_2 e diminuição das ligações inespecíficas com soro de burro (soro de burro; Jackson Immunoresearch). O anticorpo primário para orexina (anti-orexin, Cell Signaling Technology, Boston, MA, 1/1000) ou para o hormônio concentrador de melanina (MCH; anti-MCH, Cell Signaling Technology, Boston, MA, 1/1000) foram apresentados. No outro dia os cortes foram lavados e incubados com anticorpo secundário (anticorpo biotilado, Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA) e ao complexo avidina-biotina (Kit Elite Vectastain

ABC, Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA) para amplificação do sinal. A reação colorimétrica com Dimetilamino Benzaldeído (DAB, 2%) em presença de H₂O₂ (0,003%) resultou na marcação dos citoplasmas das células que expressaram a proteína alvo em marrom claro.

3.7 Análise e contagem das marcações

As secções foram analisadas em microscópio óptico para a identificação dos diferentes tipos de marcação. A determinação das áreas a serem analisadas foi realizada com o auxílio do atlas do encéfalo de ratos de Paxino e Watson (2007). Os núcleos de neurônios imunorreativos à proteína Fos (Fos+) e os citoplasmas imunorreativos a Orexina (orexina+) ou imunorreativos ao hormônio concentrador de melanina (MCH+) foram contados por um observador treinado com o auxílio de um contador manual analógico de células. Os dados foram tabulados e analisados em softwares de estatística apropriados.

3.8 Análise estatística

Os dados foram analisados através dos softwares Statistica 8.0 (Statsoft) e GraphPad Prism (GraphPad). Os efeitos sobre a ingestão de alimentos dos tratamentos com RS100329, Rec 15/2615 ou BMY7378 1, 2 e 4 horas após injeção nas doses de 0, 2, 4 e 20 nmol foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. A análise dos comportamentos foi realizada por ANOVA de uma via. Quando apropriado, as análises de variâncias foram seguidas pelo teste de Duncan. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Somente valores de probabilidade (*p*) menores do que 5% foram considerados significantes. As análises dos dados imunohistoquímicos foram inicialmente submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Willks e se constatado que os dados estavam dentro da distribuição normal foram então submetidos ao teste T de Student não-pareado. Os dados foram expressos como número de núcleos celulares marcados por área/núcleo estudado.

Os dados de dupla marcação foram analisados como porcentagem de dupla marcação, dividindo-se o número de células duplamente marcadas de um núcleo pelo número total de células marcadas (p.ex.: (Fos+)+(orexina+)/orexina+).

4. RESULTADOS:

A seguir são descritos os resultados dos experimentos de injeção dos antagonistas RS100329, Rec 15/2615, BMY 7378, Prazosina e resultados de expressão de proteína Fos e dupla marcação Fos/orexina e Fos/MCH. Somente foram aceitos para análise os dados referentes a animais cuja injeção atingiu o MnR (Fig. 3).

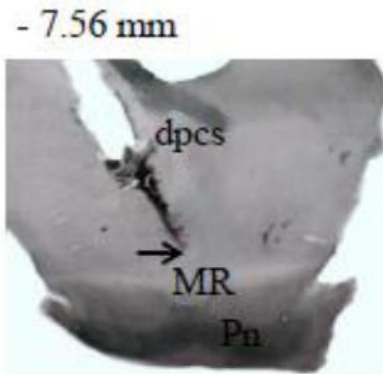


Figura 3. Foto de um indivíduo amostral representativo. Seção coronal do mesencéfalo destacando o trajeto da cânula injetora ao Núcleo Mediano da Rafe (descrito aqui como MR). Pn= núcleo pontino, dpcs= decussação do pedúnculo cerebelar superior, -7,56 indica o nível rostro caudal do corte baseado no atlas esterotáxico de Paxinos e Watson (2007).

4.1 Injeção do antagonista alfa 1A RS100329

A injeção do antagonista RS100329 na dose de 20 nmol causou alterações estatisticamente significantes sobre as variáveis estudadas. Houve aumento do consumo de alimento (Fig. 4; $F(6,68)= 5,43$, $p= 0,03$) na primeira hora após injeção. Os comportamentos ligados à ingestão também foram modificados. A duração (Fig. 5; $F(3,34)=6,54$, $p=0,001$) e frequência (Fig. 5; $F(3,34)=7,49$, $p=0,0005$) do comportamento de comer foram aumentados. A análise estatística apontou também diminuição da latência (Fig. 5; $F(3,34)=4,11$, $p=0,01$) do comportamento de comer. Não houve alteração significativa na ingestão de alimento ou na ingestão de água em qualquer outra dose.

Os comportamentos não ingestivos não foram significativamente alterados pela injeção do RS100329 (Tabela 1).

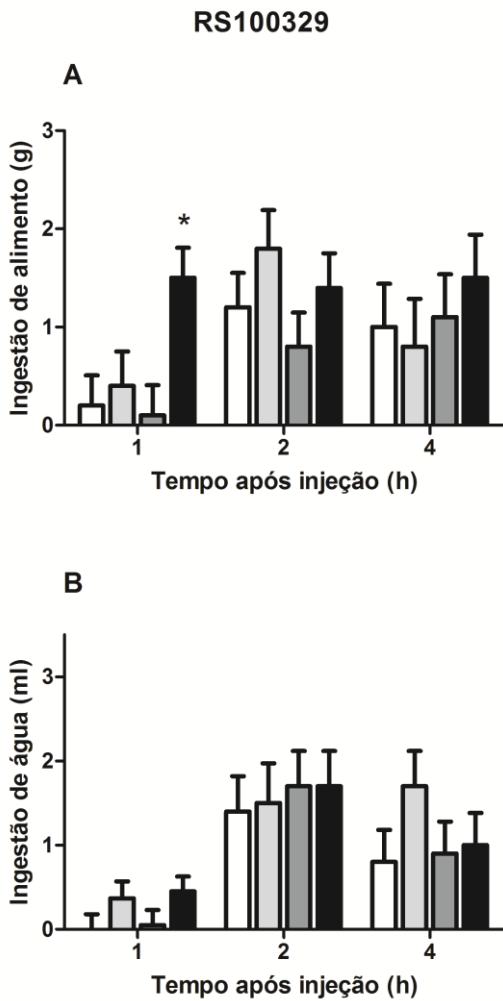


Figura 4. Efeitos da injeção de RS 100329 nas doses de 0 nmol (barra branca), 2 nmol (barra cinza claro), 4 nmol (cinza escuro) ou 20 nmol (barra preta) sobre a ingestão de alimentos (A) e ingestão de água (B) registrados 1, 2 e 4h. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$, $n = 9-10$.

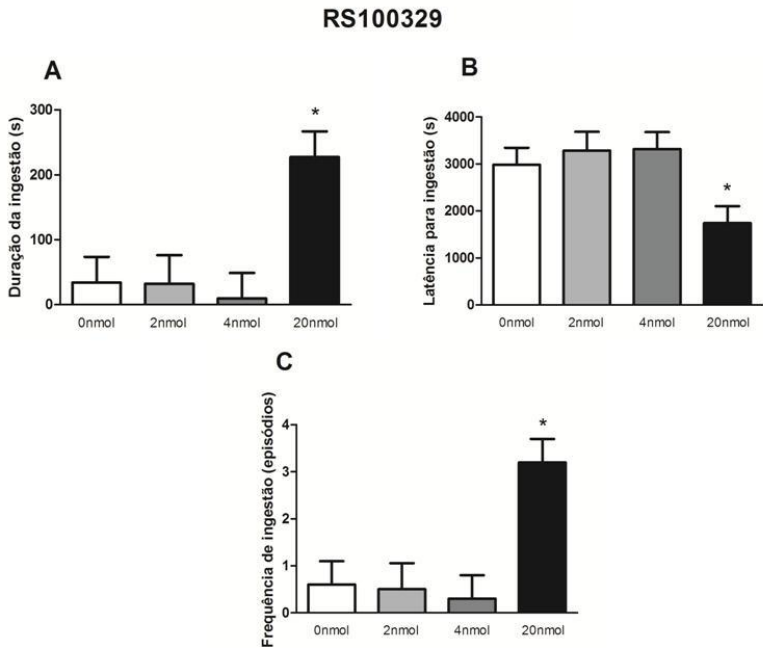


Figura 5. Efeitos da injeção de RS 100329 sobre os comportamentos ingestivos durante a primeira hora de experimento. Estão representados a duração, em segundos, da ingestão (A), latência, em segundos, para o comportamento ingestivo (B) e frequência, em número de episódios, do comportamento ingestivo (C) Média \pm EPM.* $p < 0,05$, $n = 9-10$.

Tabela 1. Efeitos da injeção de diferentes doses de RS100329 (0, 2, 4 ou 20 nmol) sobre a duração da exploração do ambiente, exploração vertical, auto-limpeza, imobilidade e locomoção. Dados representados como média \pm erro padrão da média (EPM).

Comportamentos (seg, média \pm EPM)	Veículo (N=10)	RS 100329 2 nmol (N=10)	RS 100329 4 nmol (N=10)	RS 100329 20 nmol (N=10)	ANOVA	
Exploração ambiente	269,7 \pm 35,4	485,3 \pm 92,1	464,1 \pm 72,8	506,7 \pm 87,4	$F_{(3,34)}$	= 2,27;p =0,09
Exploração vertical	45,2 \pm 6,3	81,3 \pm 27,8	80,3 \pm 14,7	72,6 \pm 48,8	$F_{(3,34)}$	= 1,01;p =0,39
Auto-limpeza	325,2 \pm 23,4	339,8 \pm 69,7	421,2 \pm 85,6	478,9 \pm 79,3	$F_{(3,34)}$	= 1,10;p =0,36
Imobilidade	2887,6 \pm 59,1	2537,7 \pm 182,4	2542,4 \pm 135,3	2031,8 \pm 277,8	$F_{(3,34)}$	= 3,91;p =0,06
Locomoção	54,6 \pm 4,6	91,0 \pm 14,8	74,6 \pm 10,9	100,3 \pm 30,0	$F_{(3,34)}$	= 1,26;p =0,30

4.2 Injeção do antagonista alfa 1B Rec15/2615

A ANOVA mostrou que a injeção do antagonista α_{1B} Rec 15/2615 resultou em aumento estatisticamente significativo no total de alimento ingerido na segunda hora após injeção da dose de 2 nmol (Fig. 6, $F(6,80)= 10,20$, $p=0,0001$). Quanto aos comportamentos ingestivos a dose de 4 nmol aumentou significativamente a duração do comportamento de comer (Fig 7, $F(3, 36)=5,056$, $p=0,005$), sem alterar, contudo, a frequência ou latência para esse comportamento. Não houve diferença estatisticamente significativa para o tratamento com o Rec 15/2615 para os comportamentos não-ingestivos (Tabela 2) ou para a ingestão de água (Fig 6).

Tabela 2 Efeitos da injeção de diferentes doses de Rec 15/2615 (0, 2, 4 ou 20 nmol) sobre a duração da exploração do ambiente, exploração vertical, auto-limpeza, imobilidade e locomoção. Dados representados como média \pm erro padrão da média (EPM).

Comportamentos (seg. média \pm EPM)	Veículo (N=10)	Rec-15/2615 2 nmol (N=10)	Rec-15/2615 4 nmol (N=10)	Rec-15/2615 20 nmol (N=10)	ANOVA
Exploração ambiente	345,6 \pm 82,66	715,8 \pm 83,8	508,4 \pm 138,1	552,1 \pm 89,4	$F_{(3,36)} = 2,26 p=0,09$
Exploração vertical	54,7 \pm 12,2	59,1 \pm 10,3	69,3 \pm 12,7	111,2 \pm 28,0	$F_{(3,36)} = 2,20 p=0,10$
Auto-limpeza	338,7 \pm 29,3	437,5 \pm 81,4	425,2 \pm 75,6	509,9 \pm 98,1	$F_{(3,36)} = 0,86 p=0,46$
Imobilidade	2736,4 \pm 139,1	2240,8 \pm 160,5	2095,4 \pm 278,4	2207,5 \pm 147,4	$F_{(3,36)} = 2,45 p=0,07$
Locomoção	69,0 \pm 14,0	126,6 \pm 29,6	109,8 \pm 20,6	109,8 \pm 20,4	$F_{(3,36)} = 1,25 p=0,30$

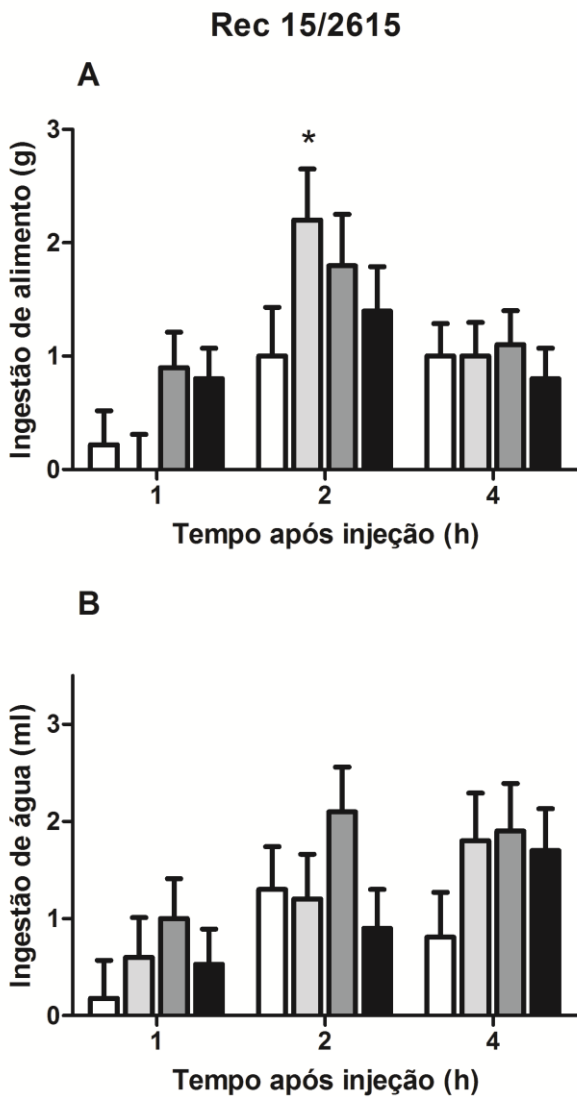


Figura 6. Efeitos da injeção de Rec 15/2615 nas doses de 0 nmol (barra branca), 2 nmol (barra cinza claro), 4 nmol (cinza escuro) ou 20 nmol (barra preta) sobre a ingestão de alimentos (A) e ingestão de água (B) registrados 1, 2 e 4h. Dados apresentados como média±EPM. * $p < 0,05$.

Rec 15/2615

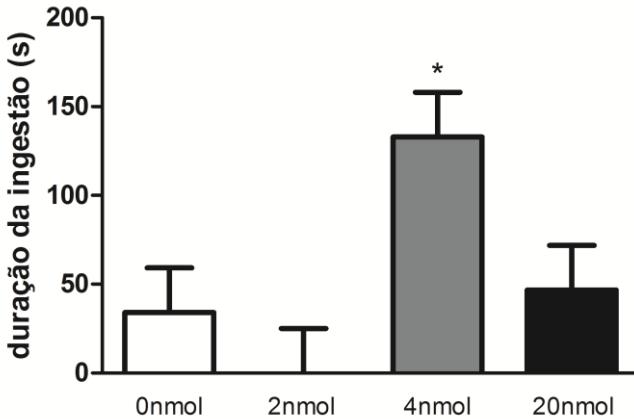


Figura 7. Efeito da injeção de Rec 15/2615 sobre a duração do comportamento ingestivo após a injeção de diferentes doses de Rec 15/2615. Média \pm epm. * $<$ 0,05, n=9-10.

4.3 Injeção do antagonista alfa 1D BMY 7378

O bloqueio dos receptores α_{1D} pelo antagonista BMY 7378 na dose de 20 nmol resultou em aumento da ingestão de alimentos na primeira hora (Fig.8; $F(6, 56)=6,17$; $p=0,003$) e evocou alterações estatisticamente significantes nesse comportamento aumentando a duração ($F(3, 29)=9,23$; $p=0,0001$) e frequência ($F(3,29)= 3,6$, $p=0,02$) e diminuindo a latência ($F(3, 29)= 6,9$, $p=0,001$) para iniciar a ingestão (Fig. 9). Os comportamentos não-ingestivos e a ingestão de água não foram alterados durante a primeira hora de experimento. Todas as doses do antagonista α_{1D} diminuíram significativamente a ingestão de água na segunda hora de experimento (Fig. 8 $F(6, 56)=9,17$; $p=0,0003$). Não foram observadas alterações na ingestão de

alimentos ou de água na quarta hora. As doses de 2 e 4 nmol não produziram efeitos estatisticamente significantes nos outros comportamentos registrados nesse estudo (Tabela 3).

Tabela 3 Efeitos da injeção de diferentes doses de BMY7378 (0, 2, 4 ou 20 nmol) sobre a duração da exploração do ambiente, exploração vertical, auto-limpeza, imobilidade e locomoção. Dados representados como média ± erro padrão da média (EPM).

Comportamentos (seg. média ± EPM)	Veículo (N=10)	BMV 7578 2 nmol (N=10)	BMV 75784 4 nmol (N=10)	BMV 7578 20 nmol (N=10)	ANOVA
Exploração ambiente	537,2± 94,3	513,1±100	628,3±98,4	736,3±113,6	$F_{(3,39)} = 1,04, p=0,38$
Exploração vertical	228,6±58,7	258,6±62,3	162±66,9	201,3±63,2	$F_{(3,39)} = 0,42, p=0,73$
Auto-limpeza	319,9±67,6	338,1±71,7	379±76,8	369,7±69,8	$F_{(3,39)} = 0,14, p=0,93$
Imobilidade	2381,7±196,4	2344,5±208,3	2071,1±238,6	1909±204,7	$F_{(3,39)} = 1,21, p=0,32$
Locomoção	128,7±56,5	112,7±28,1	119,5±33,1	175±25,6	$F_{(3,39)} = 0,99, p=0,40$

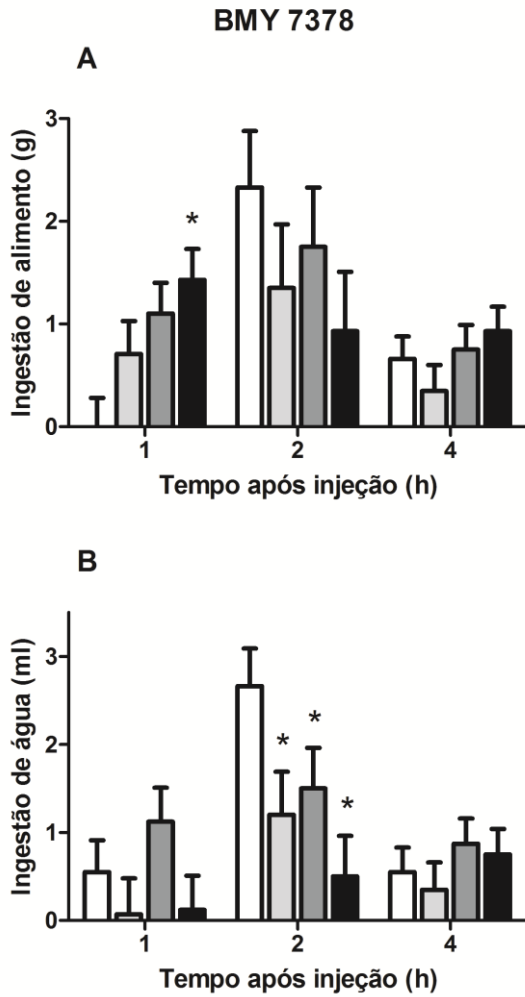


Figura 8. Efeitos da injeção de BMY 7378 nas doses de 0 nmol (barra branca), 2 nmol (barra cinza claro), 4 nmol (cinza escuro) ou 20 nmol (barra preta) sobre a ingestão de alimentos (A) e ingestão de água (B) registrados 1, 2 e 4h. Dados apresentados como média±EPM. * $p < 0,05$.

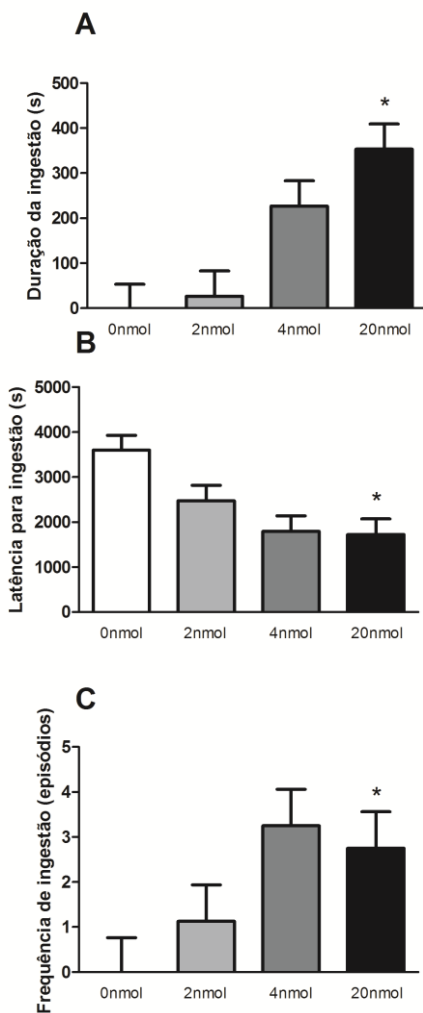
BMY 7378

Figura 9. Efeitos da injeção de BMY 7378 sobre os comportamentos ingestivos durante a primeira hora de experimento. Estão representados a duração, em segundos, da ingestão (A), latência, em segundos, para o comportamento ingestivo (B) e frequência, em número de episódios, do comportamento ingestivo (C) Média \pm EPM.* $p < 0,05$.

4.4 Efeitos da injeção do antagonista alfa 1 prazosina

A injeção intra MnR de prazosina, um antagonista inespecífico dos receptores α_1 , evocou aumento da ingestão de alimentos na dose de 20 nmol (Fig. 10, $F(1,15)=0,004$; $p=0,03$). Não houve alteração significativa da ingestão de alimentos nas doses de 2 ou 4 nmol. As variáveis duração, frequência e latência para iniciar a ingestão de alimentos e água e comportamentos não ingestivos não foram significativamente alterados pela injeção da droga em nenhuma dose testada.

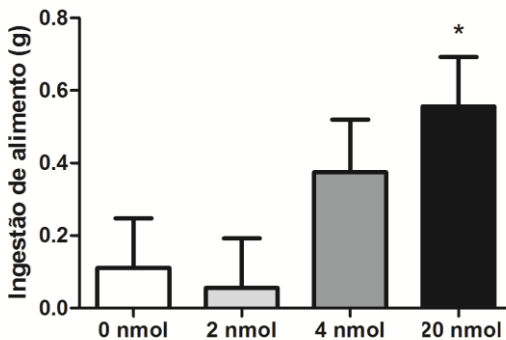


Figura 10. Efeitos da injeção intra-MnR de diferentes doses de prazosina sobre a ingestão de alimentos em ratos saciados. Média \pm EPM. * $p<0,05$.

4.5 Análise da expressão de Fos em núcleos hipotalâmicos e amígdala após a injeção de prazosina ou veículo no MnR:

O teste t não pareado revelou aumento do número de núcleos Fos+ na LH ($p=0,006$) e BLA ($p=0,0001$) dos animais injetados com prazosina (Fig 11 e 12). Não houve diferença estatisticamente significativa do número de núcleos Fos+ entre os grupos veículo e prazosina para outros núcleos hipotalâmicos ou áreas da amígdala (PVH, ARC, VMH, DMD e CeA).

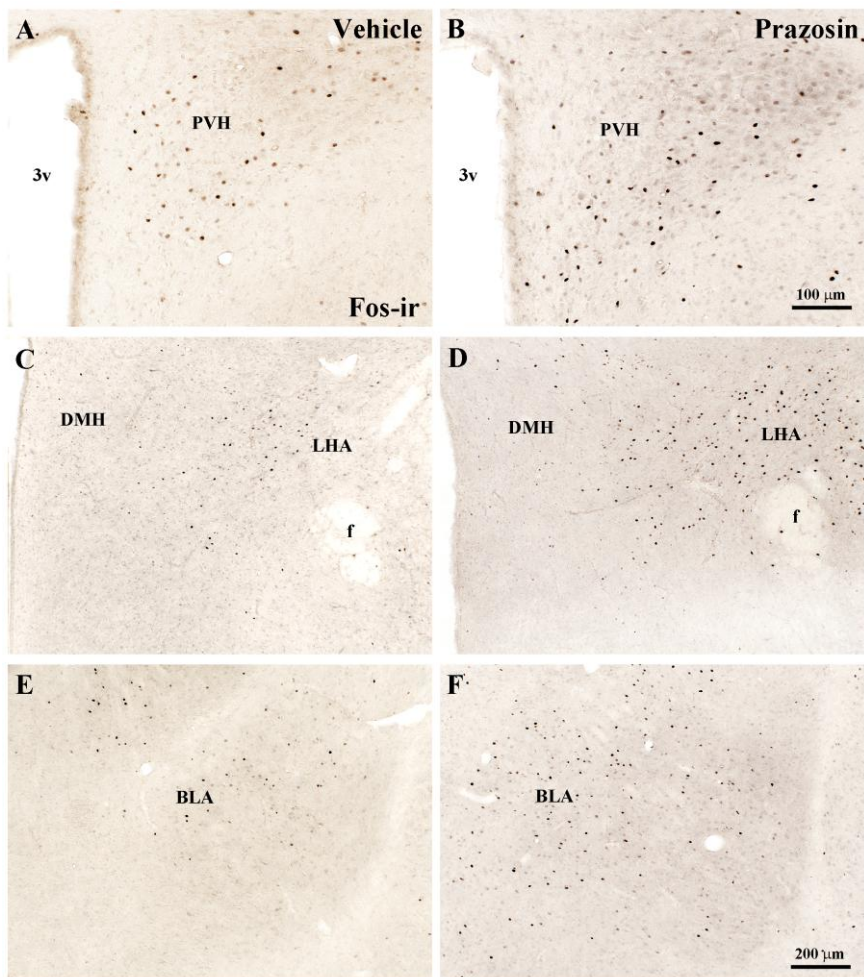


Figura 11. Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos no núcleo paraventricular (PVN), área hipotalâmica lateral (LH) e amígdala basolateral (BLA) após injeção de prazosina (B, D, F) ou veículo (A, C, E) no MnR. A, B, C, D objetiva de 10x e E e F objetiva de 20x.

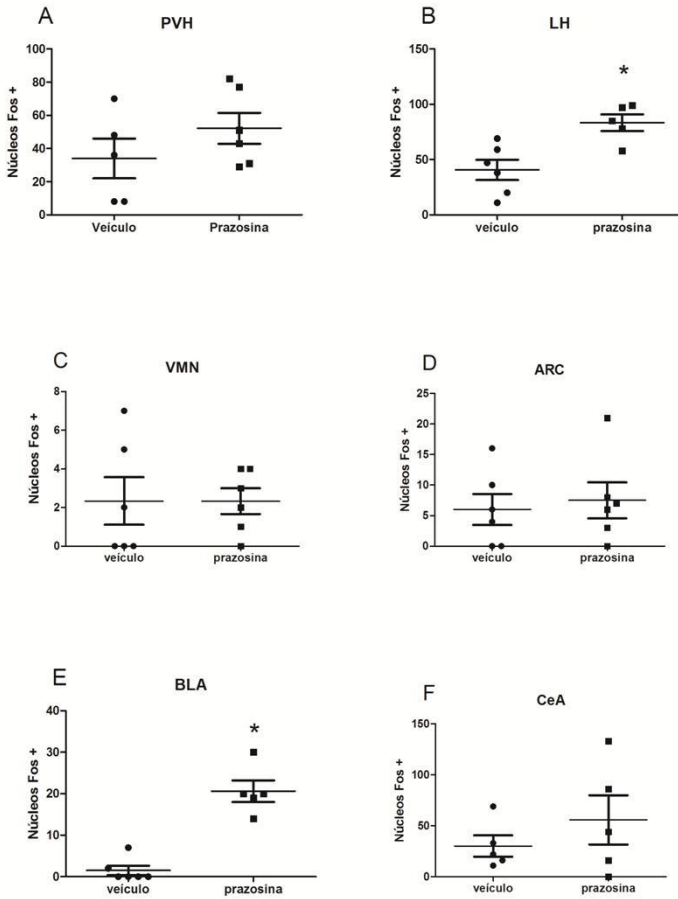


Figura 12. Efeitos da injeção de prazosina sobre a expressão de proteína Fos nos núcleos paventricular hipotalâmico (PVH), área hipotalâmica lateral (LH), núcleo ventromedial (VMN), núcleo arqueado (ARC), amígdala central (CeA) e amígdala basolateral (BLA). Os pontos em cada gráfico representam o número de núcleos Fos+ encontrados em cada caso. Linhas horizontais representam a média e o erro padrão da média. * $p < 0.05$.

4.6 Análise da dupla marcação Fos/orexina ou Fos/MCH na área hipotalâmica lateral de animais injetados com prazosina ou veículo no MnR:

As figuras 13 e 14 contém desenho esquemático da região estudada, fotomicrografias com exemplos de células Fos+, MCH+ ou orexina+ e Fos+/orexina+ (dupla marcação). O teste t não-pareado revelou que a porcentagem de dupla marcação Fos/orexina foi significativamente maior nos animais injetados com prazosina do que no seu controle (Fig 14, $p < 0,0001$). Não houve diferença estatisticamente significante de porcentagem de dupla marcação Fos/MCH entre os grupos testados (Fig 13).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que o bloqueio dos receptores α_{1A} e α_{1D} aumenta a ingestão de alimentos aproximadamente 25 minutos após a injeção da droga. Esta resposta não é devida ao aumento inespecífico da atividade motora, pois, a duração e a frequência dos comportamentos não-ingestivos não foram modificados. A resposta comportamental foi caracterizada pelo aumento da duração e da frequência e pela diminuição da latência para iniciar a ingestão. Aqui também mostramos que a injeção de prazosina, um antagonista α_1 , no MnR produziu resultados similares aos de Mansur *et al.* (2011) que observou aumento da ingestão de alimentos após injeção de prazosina no MnR em animais saciados. Nosso trabalho sugere que a hiperfagia causada pela prazosina seja produzida pelo bloqueio dos receptores α_{1A} e α_{1D} . A injeção de fenilefrina, um agonista α_1 , no MnR de ratos privados de alimentos resultou em diminuição da resposta alimentar após a reintrodução do alimento (Ribas *et al.*, 2012). Além disso, a ativação de receptores α_2 do MnR pela injeção de clonidina resultou em hiperfagia em animais saciados (Mansur *et al.*, 2010). Esse resultado pode ser atribuído à inibição de liberação de AD dos botões pré-sinápticos, assim removendo o tono de estimulação sobre α_1 sobre neurônios serotoninérgicos do MnR, uma vez que a AD exercem influência inibitória tônica sobre a liberação de 5HT no MnR (Adell e Artigas, 1999). Em conjunto esses dados sugerem que os receptores adrenérgicos presentes no MnR induzem uma influência inibitória tônica que restringe a ingestão de alimentos em condições de livre acesso ao alimento. A intensidade desse mecanismo inibitório parece diminuir à medida que a disponibilidade de alimento diminui.

No que diz respeito ao resultado da injeção de prazosina, o fato de não observarmos alterações da duração, frequência ou latência dos comportamentos ingestivos pode ser explicado pelo tempo de experimento, 30 min, não ser o suficiente para alterações estatisticamente significantes dos comportamentos aparecerem.

Um importante aspecto relacionado aos efeitos mediados pelo receptor α_{1D} é que seu antagonista, BMY 7378, é também um agonista parcial 5HT_{1A}. Assim, o aumento da ingestão de alimentos observada em nossos experimentos poderia ser devido à ação do BMY 7378 sobre receptores serotoninérgicos uma vez que a ativação dos receptores 5HT_{1A} presentes no MnR resulta em hiperfagia (Currie e Coscina, 1993). De fato Higgins e Elliott (1991) mostraram que a injeção intra-MnR de 8OH-DPAT, um agonista 5HT_{1A}, bem como a injeção de BMY 7378 aumentaram a locomoção. Entretanto, A dose de BMY 7378 usada para produzir efeitos similares àqueles causados pelo 8OH-DPAT foi maior do que a usada em nosso estudo. Dessa forma, a dose que utilizamos pode não ter sido suficientemente alta para ativar os receptores 5HT_{1A}, conseqüentemente sugerindo que os efeitos ingestivos observados são resultado do bloqueio dos receptores α_1 .

A extensão do período de observação da ingestão para 2 e 4 horas nos nossos experimentos revelaram que o receptor α_{1B} tem um papel no controle da ingestão de alimentos, com a diferença de ser mais lento na sua resposta. Em adição à hiperfagia observada com a administração de antagonistas α_{1A} e α_{1D} , nós também identificamos um aumento na ingestão de alimentos induzida pelo bloqueio dos receptores α_{1B} . Apesar de atrasado e observado na menor dose, a relevância desse mecanismo se explica pela magnitude da resposta ingestiva, similar àquela evocada pelo bloqueio dos subtipos α_{1A} e α_{1D} . Se este procedimento experimental tivesse sido utilizado em trabalhos anteriores, talvez a resposta ingestiva evocada pelo bloqueio α_{1B} tivesse sido observado no tratamento com prazosina. Uma possível explicação para a resposta ingestiva tardia seja que, diferentemente dos receptores α_{1A} e α_{1D} , a via de sinalização que esta sendo inibida pelo Rec 15/2615 é a de uma proteína G acoplada à fosfolipase C. Enquanto que a ativação dos receptores α_{1A} e α_{1D} abrem diretamente os canais de Ca^{2+} presentes na membrana, os receptores α_{1B} promovem a formação de diacilglicerol e fosfatidilinositol 3-fosfato que, por sua vez, abrem canais de Ca^{2+} . Assim sendo, o bloqueio dos receptores α_{1B} interrompe o desencadeamento de uma cascata em andamento e que leva tempo

para se dissipar. Entretanto, uma investigação mais aprofundada é necessária para verificar essa possibilidade.

A injeção intra-MnR de Rec 15/2615 aumentou a duração da ingestão de alimentos na primeira hora, porém sem alterar o consumo. A frequência e a latência para iniciar a ingestão não foram afetadas pelo bloqueio do receptor α_{1B} . O aumento na duração da ingestão pode estar relacionado a uma intensificação da exploração oral do alimento, ou, por outro lado, a atividade motora oral pode ter sido intensificada pelo tratamento. No caso de ocorrer aumento da atividade motora oral os animais poderiam ocupar mais tempo com a comida na boca antes de degluti-la, prolongando assim a duração de cada episódio ingestivo e aumentando significativamente a duração da ingestão no experimento. Trabalhos anteriores mostraram que ratos passam mais tempo mastigando blocos de madeira após a injeção de 8OH-DPAT (Dourish *et al.*, 1985a) e muscimol (Klitenick e Wirtshafter, 1989) no MnR. Klitenick e Wirtshafter (1989) atribuíram esses resultados a um efeito “energizante” sobre os comportamentos orais. Os autores afirmam que esse resultado parece ser consistente com a ideia de que o MnR é parte integral de um sistema de ativação comportamental não-específica. Nós sugerimos que os receptores adrenérgicos poderiam também fazer parte desse circuito, no entanto nós não observamos mudanças estatisticamente significantes na duração ou frequência dos comportamentos que indicam a intensidade da atividade motora (sendo esses: exploração vertical, locomoção e auto-limpeza). Concluímos, portanto, que o aumento na duração do comportamento ingestivo pode ser devido à intensificação específica das respostas orais.

A ingestão de água foi significativamente diminuída 2 horas após a injeção de BMY 7378. Em contraste, trabalhos anteriores do nosso laboratório mostraram que injeções de 20 nmol de AD diminuíram a latência para iniciar a ingestão de água (Dos Santos *et al.*, 2009). Juntos esses resultados sugerem que o circuito no qual os receptores de AD atuam podem participar do controle da ingestão hídrica. Entretanto, a injeção de fenilefrina ou clonidina não modificaram a ingestão hídrica em ratos privados de alimentos pelo menos nos 30 minutos investigado após a injeção intra-MnR (Ribas *et al.*, 2012). Vários estudos têm demonstrado que

sistemas serotoninérgico e não serotoninérgicos participam do controle da ingestão hídrica e de alimentos (Wirtshafter, 2001). A participação dos receptores GABA_A e GABA_B do MnR foi revelada pela injeção de agonistas GABA muscimol e baclofen (Klitenick e Wirtshafter, 1988; Wirtshafter *et al.*, 1993). Ainda, a injeção intra-MnR de antagonistas glutamatérgicos aumentou a ingestão de alimentos e água (Wirtshafter e Trifunovic, 1988; Wirtshafter e Krebs, 1990). Já a ativação de receptores 5HT_{1A} pelo 8OH-DPAT injetado no MnR parece causar mais alterações da ingestão alimentar do que hídrica (Fletcher, 1991; Currie e Coscina, 1993; Currie *et al.*, 1994). Sendo assim, o circuito adrenérgico no MnR pode estar interagindo com neurônios serotoninérgicos, gabaérgicos ou glutamatérgicos para controlar principalmente a ingestão de alimentos, enquanto a participação de neurônios serotoninérgicos como mediadores dos efeitos da AD sobre a ingestão de água parece ser menos relevante.

Os efeitos dos antagonistas α_1 sobre o comportamento ingestivo e expressão de Fos observados no estudo são confinados ao MnR, uma vez que trabalhos anteriores observaram que os efeitos de agonistas e antagonistas não específicos desses receptores eram induzidos somente se as injeções fossem posicionadas dentro do MnR mas não nas regiões vizinhas (Mansur *et al.*, 2011; Ribas *et al.*, 2012).

Intrigantemente, ao invés de uma resposta ingestiva menos intensa do que a evocada pela prazosina, um antagonista dos receptores α_1 , o bloqueio de subtipos de receptores α_1 individualmente resultou numa resposta ingestiva que foi similar em magnitude daquela produzida pela prazosina. Isso pode ser explicado pelo fato de que todos os três subtipos de receptores α_1 terem sinalização que converge à modificações das concentrações de Ca²⁺.

A injeção de prazosina, um antagonista α_1 , no MnR aumentou a ingestão de alimentos nos animais saciados. Mansur *et al.* (2011) obtiveram hiperfagia com a dose de 40 nmol, portanto nosso resultado está de acordo com dado anterior da literatura e, indo além, mostra que o bloqueio de receptores α_1 com uma dose de 20 nmol é capaz de provocar hiperfagia.

Ademais, a injeção de prazosina na dose de 20 nmol aumentou a expressão de proteína Fos na LH e BLA de ratos saciados. O aumento da expressão da proteína Fos nessas regiões sugere que a hiperfagia gerada pelo bloqueio dos receptores α_1 do MnR está associado ao controle motivacional da ingestão de alimentos.

A BLA está envolvida no controle da ingestão de alimentos. Como demonstrado por Ganaraj e Jeganathan (1998) e Loscher *et al.* (2003) lesões da BLA de ratos produzem aumentos da ingestão de alimentos e ganho de massa corporal. Além disso, Ambroggi *et al.* (2008) mostraram que neurônios da BLA e neurônios dopaminérgicos, que mantêm projeções para o núcleo Acumbens (NAc), interagem entre si para promover comportamento de recompensa e que a resposta da BLA às pistas oferecidas precedem e são necessárias para a ativação evocada por pistas dos neurônios do NAc. Portanto, a BLA é necessário para ação dopaminérgica de aumentar o disparo de neurônios do NAc evocado por pistas e que esse aumento promove o comportamento de busca de recompensa (Ambroggi *et al.*, 2008). Outro dado importante é que lesões da BLA bloquearam a hiperfagia induzida por injeções sistêmicas de 8OH-DPAT (Parker e Coscina, 2001a). Esses dados em conjunto com os resultados de expressão de Fos na BLA suportam a hipótese de que a hiperfagia gerada após o bloqueio do receptor alfa1 no MnR sejam mediada por esse núcleo.

O aumento de expressão da proteína Fos na LH, juntamente com o aumento de expressão de Fos em neurônios orexinérgicos e não MCHérgicos sugere uma ação dos neurônios do MnR na LH específica sobre o sistema orexinérgico. Os neurônios orexinérgicos estão associados ao controle de uma série de estados e comportamentos. O sistema orexinérgico participa da regulação do ciclo sono-vigília (Lee *et al.*, 2005; Saper *et al.*, 2005) atuando como um intermediário entre o núcleo préptico ventrolateral (VLPO – indutor de sono) e sistema monoaminérgico ascendente (incluindo 5HT no DR – indutor de vigília). Os neurônios orexinérgicos possuem projeções recíprocas com NAc e está funcionalmente ligado ao sistema de procura/recompensa (Harris *et al.*, 2005). Desde a sua descoberta a orexina está associada ao controle da ingestão alimentar daí derivando seu nome do grego *orexis* – apetite

(Sakurai *et al.*, 1998), os neurônios produtores de orexina recebem aferências do ARC, mais especificamente de neurônios que expressam NPY e Pró-opiomelanocortina (POMC) (Elias *et al.*, 1998). A injeção de peptídeo relacionado ao gene agouti (AGRP), que é antagonista para os receptores melanocortina-3 e -4 (MC3 e MC4, respectivamente) resultou na ativação de neurônios orexigênicos, mas não de neurônios que expressam MCH (Zheng *et al.*, 2002). Esses dados ilustram a interação do sistema orexinérgico com a rede neuronal hipotalâmica que regula a ingestão de alimentos e balanço energético. Coletivamente, os dados apresentados sobre a orexina a coloca como peça crucial na interação entre balanço energético, sistemas de recompensa e vigília (Tsuji e Sakurai, 2009). Portanto, nossos dados sobre aumento da expressão de proteína Fos nesses neurônios explicam como o MnR é capaz alterar a ingestão de alimentos.

A injeção de prazosina não modificou a expressão de proteína Fos no ARC e VMN, apesar de esses núcleos expressarem receptores serotoninérgicos (Leibowitz e Alexander, 1998) e serem alvo de neurônios do MnR (Vertes *et al.*, 1999). Esses dados corroboram a hipótese de que o MnR está envolvido com o controle motivacional e não homeostático da ingestão de alimentos.

Vários dados sugerem a hipótese de que são os neurônios serotoninérgicos do MnR que executam os efeitos observados no nosso estudo. A ativação de receptores adrenérgicos α_1 do MnR aumenta a liberação de 5HT nas áreas de projeção desse núcleo (Adell e Artigas, 1999; Adell *et al.*, 2002). O tônus serotoninérgico é baixo em animais submetidos à restrição alimentar quando comparados a ratos saciados (Haider e Haleem, 2000; Kang *et al.*, 2001; Kaye, 2008) e após estudos de microdiálise *in vivo* (Adell e Artigas, 1999) bem como testes de voltametria (Hopwood e Stamford, 2001) a frequência de disparo de células serotoninérgicas do MnR diminuiu após injeção de prazosina nesse núcleo. Os nossos resultados com o aumento de expressão da proteína Fos em neurônios orexinérgicos permitem reforçar a hipótese de mediação serotoninérgica, pois a 5HT hiperpolariza e inibe a atividade de neurônios orexinérgicos através de receptores 5HT_{1A} (Muraki *et al.*, 2004).

O presente trabalho mostrou o envolvimento dos receptores α_{1A} e α_{1D} no controle rápido da ingestão de alimentos bem como demonstrou um controle tardio da ingestão de alimentos pelo bloqueio de receptores α_{1B} , que resultou em hiperfagia. Ademais, ficou demonstrada a participação dos receptores α_{1D} na redução da ingestão de água. Nossos resultados apontam para um papel do MnR voltado ao controle motivacional da ingestão de alimentos ao demonstrar o aumento da expressão de proteína Fos em regiões do prosencéfalo relacionada a esse tipo de controle.

6. CONCLUSÕES

Nossos dados nos permitem concluir que o uso de antagonistas específicos para os subtipos de receptores α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} , reforçam os resultados obtidos com a injeções do antagonista α_1 prazosina causando aumento da ingestão de alimentos. Além, o uso dos antagonistas específicos nos permitiu dividir o espectro de ação facilitadora adrenérgica sobre o MnR. De forma que, no animal saciado o bloqueio α_{1A} causa uma resposta de aumento da ingestão de alimentos, o bloqueio α_{1B} aumento do comportamento ingestivo e de ingestão de alimento a mais longo prazo e o bloqueio α_{1D} aumenta a ingestão de alimentos e diminui a ingestão de água. Nosso dados ainda nos permitem sugerir que o bloqueio adrenérgico no MnR influencia o controle motivacional da ingestão de alimentos.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adell, A. e F. Artigas. Regulation of the release of 5-hydroxytryptamine in the median raphe nucleus of the rat by catecholaminergic afferents. Eur J Neurosci, v.11, n.7, Jul, p.2305-11. 1999.
- Adell, A., P. Celada, M. T. Abellan e F. Artigas. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. Brain Res Brain Res Rev, v.39, n.2-3, Sep, p.154-80. 2002.
- Ahren, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. Diabetologia, v.43, n.4, Apr, p.393-410. 2000.
- Ambroggi, F., A. Ishikawa, H. L. Fields e S. M. Nicola. Basolateral amygdala neurons facilitate reward-seeking behavior by exciting nucleus accumbens neurons. Neuron. 2008.
- Anand, B. K. e J. R. Brobeck. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. Proc Soc Exp Biol Med, v.77, n.2, Jun, p.323-4. 1951.
- Andrews, N., S. Hogg, L. E. Gonzalez e S. E. File. 5-HT1A receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviours respectively. Eur J Pharmacol, v.264, n.3, Nov 3, p.259-64. 1994.
- Arees, E. A. e J. Mayer. Anatomical connections between medial and lateral regions of the hypothalamus concerned with food intake. Science. 1967.
- Avanzi, V. e M. L. Brandao. Activation of somatodendritic 5-HT(1A) autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. Behav Brain Res, v.126, n.1-2, Nov 29, p.175-84. 2001.
- Azmitia, E. C. e M. Segal. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. Journal of Comparative Neurology, v.179, n.3, p.641-667. 1978.
- Baskin, D. G., D. Figlewicz e R. J. Seeley. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. Brain research. 1999.
- Bendotti, C. e R. Samanin. The role of putative 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the control of feeding in rats. Life Sci, v.41, n.5, Aug 3, p.635-42. 1987.
- Berthoud, H. R. Interactions between the cognitive and metabolic brain in the control of food intake. Physiology & behavior. 2007.
- Bittencourt, J. C., F. Presse, C. Arias, C. Peto, J. Vaughan, J. L. Nahon, W. Vale e P. E. Sawchenko. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. J Comp Neurol, v.319, n.2, May 8, p.218-45. 1992.

Bonvento, G., B. Scatton, Y. Claustre e L. Rouquier. Effect of local injection of 8-OH-DPAT into the dorsal or median raphe nuclei on extracellular levels of serotonin in serotonergic projection areas in the rat brain. Neurosci Lett, v.137, n.1, Mar 16, p.101-4. 1992.

Bosker, F., A. Klompmakers e H. Westenberg. Extracellular 5-hydroxytryptamine in median raphe nucleus of the conscious rat is decreased by nanomolar concentrations of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin and is sensitive to tetrodotoxin. J Neurochem, v.63, n.6, Dec, p.2165-71. 1994.

Broberger, C., L. De Lecea, J. G. Sutcliffe e T. Hokfelt. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. J Comp Neurol, v.402, n.4, Dec 28, p.460-74. 1998.

Cai, X. J., P. S. Widdowson, J. Harrold, S. Wilson, R. E. Buckingham, J. R. Arch, M. Tadayyon, J. C. Clapham, J. Wilding e G. Williams. Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. Diabetes, v.48, n.11, Nov, p.2132-7. 1999.

Chemelli, R. M., J. T. Willie, C. M. Sinton, J. K. Elmquist, T. Scammell, C. Lee, J. A. Richardson, S. C. Williams, Y. Xiong, Y. Kisanuki, T. E. Fitch, M. Nakazato, R. E. Hammer, C. B. Saper e M. Yanagisawa. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. Cell, v.98, n.4, Aug 20, p.437-51. 1999.

Clark, W. G. e J. M. Lipton. Changes in body temperature after administration of adrenergic and serotonergic agents and related drugs including antidepressants: II. Neurosci Biobehav Rev, v.10, n.2, Summer, p.153-220. 1986.

Clegg, D. J., E. L. Air, S. C. Woods e R. J. Seeley. Eating elicited by orexin-a, but not melanin-concentrating hormone, is opioid mediated. Endocrinology, v.143, n.8, Aug, p.2995-3000. 2002.

Cryan, J. F., M. E. Page e I. Lucki. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. Eur J Pharmacol, v.436, n.3, Feb 2, p.197-205. 2002.

Currie, P. J. e D. V. Coscina. Diurnal variations in the feeding response to 8-OH-DPAT injected into the dorsal or median raphe. Neuroreport, v.4, n.9, Sep, p.1105-7. 1993.

Currie, P. J., P. J. Fletcher e D. V. Coscina. Administration of 8-OH-DPAT into the midbrain raphe nuclei: effects on medial hypothalamic NE-induced feeding. Am J Physiol, v.266, n.5 Pt 2, May, p.R1645-51. 1994.

Day, H. E., S. Campeau, S. J. Watson, Jr. e H. Akil. Distribution of alpha 1a-, alpha 1b- and alpha 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. J Chem Neuroanat, v.13, n.2, Jul, p.115-39. 1997.

De Lecea, L., T. S. Kilduff, C. Peyron, X. Gao, P. E. Foye, P. E. Danielson, C. Fukuhara, E. L. Battenberg, V. T. Gautvik, F. S. Bartlett, 2nd, W. N. Frankel, A. N. Van Den Pol, F. E. Bloom, K. M. Gautvik e J. G. Sutcliffe. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.1, Jan 6, p.322-7. 1998.

Dos Santos, R. L., S. S. Mansur, S. M. Steffens, M. S. Faria, J. Marino-Neto e M. A. Paschoalini. Food intake increased after injection of adrenaline into the median raphe nucleus of free-feeding rats. Behav Brain Res, v.197, n.2, Feb 11, p.411-6. 2009.

Dourish, C. T., P. H. Hutson e G. Curzon. Characteristics of feeding induced by the serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT). Brain Res Bull, v.15, n.4, Oct, p.377-84. 1985a.

_____. Low doses of the putative serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicit feeding in the rat. Psychopharmacology (Berl), v.86, n.1-2, p.197-204. 1985b.

Ebenezer, I. S., M. J. Arkle e R. M. Tite. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin inhibits food intake in fasted rats by an action at 5-HT_{1A} receptors. Methods Find Exp Clin Pharmacol, v.29, n.4, May, p.269-72. 2007.

Elias, C. F., C. B. Saper, E. Maratos-Flier, N. A. Tritos, C. Lee, J. Kelly, J. B. Tatro, G. E. Hoffman, M. M. Ollmann, G. S. Barsh, T. Sakurai, M. Yanagisawa e J. K. Elmquist. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. J Comp Neurol, v.402, n.4, Dec 28, p.442-59. 1998.

Elmquist, J. K., C. F. Elias e C. B. Saper. Hypothalamic control of body weight. Neuron. 1999.

Fetissov, S. O., M. Varma, T. Sato, L. Zhang e A. Laviano. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. Nutrition. 2000.

Fletcher, P. J. Dopamine receptor blockade in nucleus accumbens or caudate nucleus differentially affects feeding induced by 8-OH-DPAT injected into dorsal or median raphe. Brain research, v.552, n.2, p.181-189. 1991.

Fletcher, P. J. e D. V. Coscina. Injecting 5-HT into the PVN does not prevent feeding induced by injecting 8-OH-DPAT into the raphe. Pharmacol Biochem Behav, v.46, n.2, Oct, p.487-91. 1993.

Fonberg, E. Hyperphagia produced by lateral amygdalar lesions in dogs. Acta Neurobiol Exp (Wars), v.31, n.1, p.19-32. 1971.

Funk, D., Z. Li, P. J. Fletcher e A. D. Le. Effects of injections of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin or muscimol in the median raphe nucleus on c-fos mRNA in the rat brain. Neuroscience, v.131, n.2, p.475-9. 2005.

Ganaraj, B. e P. S. Jeganathan. Involvement of basolateral nucleus & central nucleus of amygdala in the regulation of ingestive behaviour in rat. Indian J Med Res, v.108, Sep, p.98-103. 1998.

Griffond, B., P. Y. Risold, C. Jacquemard, C. Colard e D. Fellmann. Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. Neurosci Lett, v.262, n.2, Mar 5, p.77-80. 1999.

Haider, S. e D. J. Haleem. Decreases of brain serotonin following a food restriction schedule of 4 weeks in male and female rats. Med Sci Monit, v.6, n.6, Nov-Dec, p.1061-7. 2000.

Halford, J. C., S. C. Wanninayake e J. E. Blundell. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. Pharmacol Biochem Behav, v.61, n.2, Oct, p.159-68. 1998.

Hall, H., C. Lundkvist, C. Halldin, L. Farde, V. W. Pike, J. A. McCarron, A. Fletcher, I. A. Cliffe, T. Barf, H. Wikstrom e G. Sedvall. Autoradiographic localization of 5-HT1A receptors in the post-mortem human brain using [3H]WAY-100635 and [11C]way-100635. Brain Res, v.745, n.1-2, Jan 16, p.96-108. 1997.

Harris, G. C., M. Wimmer e G. Aston-Jones. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. Nature, v.437, n.7058, p.556-559. 2005.

Hatfield, T., J. S. Han e M. Conley. Neurotoxic lesions of basolateral, but not central, amygdala interfere with Pavlovian second-order conditioning and reinforcer devaluation effects. The Journal of Neuroscience. 1996.

Higgins, G. A. e P. J. Elliott. Differential behavioural activation following intra-raphé infusion of 5-HT1A receptor agonists. Eur J Pharmacol, v.193, n.3, Feb 14, p.351-6. 1991.

Hoebel, B. G., L. Hernandez, D. H. Schwartz, G. P. Mark e G. A. Hunter. Microdialysis Studies of Brain Norepinephrine, Serotonin, and Dopamine Release During Ingestive Behavior Theoretical and Clinical Implications. Ann N Y Acad Sci, v.575, p.22. 1989.

Holland, P. C., T. Hatfield e M. Gallagher. Rats with basolateral amygdala lesions show normal increases in conditioned stimulus processing but reduced conditioned potentiation of eating. Behavioral Neuroscience, v.115, n.4, p.945-950. 2001.

Holland, P. C., G. D. Petrovich e M. Gallagher. The effects of amygdala lesions on conditioned stimulus-potentiated eating in rats. Physiology & behavior, v.76, n.1, p.117-129. 2002.

Hopwood, S. E. e J. A. Stamford. Noradrenergic modulation of serotonin release in rat dorsal and median raphe nuclei via alpha(1) and alpha(2A) adrenoceptors. Neuropharmacology, v.41, n.4, Sep, p.433-42. 2001.

Hornung, J. P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. J Chem Neuroanat, v.26, n.4, Dec, p.331-43. 2003.

Hutson, P. H., C. T. Dourish e G. Curzon. Neurochemical and behavioural evidence for mediation of the hyperphagic action of 8-OH-DPAT by 5-HT cell body autoreceptors. European Journal of Pharmacology. 1986.

_____. Evidence that the hyperphagic response to 8-OH-DPAT is mediated by 5-HT< sub>1A</sub> receptors. European Journal of Pharmacology. 1988.

Judge, S. J. e S. E. Gartside. Firing of 5-HT neurones in the dorsal and median raphe nucleus in vitro shows differential alpha1-adrenoceptor and 5-HT1A receptor modulation. Neurochemistry International, v.48, n.2, p.100-107. 2006.

Kang, M., C. Park, H. Ahn e Y. Huh. Ectopic expression of serotonin-positive neurons in the hypothalamus associated with a significant serotonin decrease in the midbrain of food restricted rats. Neurosci Lett, v.314, n.1-2, Nov 13, p.25-8. 2001.

Katschinski, M. Nutritional implications of cephalic phase gastrointestinal responses. Appetite, v.34, n.2, Apr, p.189-96. 2000.

Kaye, W. Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. Physiology & behavior, v.94, n.1, p.121-135. 2008.

Kia, H. K., M. C. Miquel, M. J. Brisorgueil, G. Daval, M. Riad, S. El Mestikawy, M. Hamon e D. Verge. Immunocytochemical localization of serotonin 1A receptors in the rat central nervous system. J Comp Neurol, v.365, n.2, Feb 5, p.289-305. 1996.

Kilduff, T. S. e L. De Lecea. Mapping of the mRNAs for the hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone receptors: networks of overlapping peptide systems. J Comp Neurol, v.435, n.1, Jun 18, p.1-5. 2001.

Klein, D. A. e B. T. Walsh. Eating disorders: clinical features and pathophysiology. Physiology & behavior, v.81, n.2, p.359-374. 2004.

Klitenick, M. A. e D. Wirtshafter. 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, v.42, n.7, p.775-82. 1988.

_____. Elicitation of feeding, drinking, and gnawing following microinjections of muscimol into the median raphe nucleus of rats. Behav Neural Biol, v.51, n.3, May, p.436-41. 1989.

Kokkotou, E. G., N. A. Tritos, J. W. Mastaitis, L. Sliker e E. Maratos-Flier. Melanin-concentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain. Endocrinology, v.142, n.2, Feb, p.680-6. 2001.

Korczynski, R. e E. Fonberg. Spontaneous locomotor activity and food and water intake in rats with medial amygdala lesions. Acta Neurobiol Exp (Wars), v.39, n.4, p.227-40. 1979.

Lechin, F., B. Van Der Dijs e G. Hernandez-Adrian. Dorsal raphe vs. median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: relevance for neuropharmacological therapy. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.30, n.4, Jun, p.565-85. 2006.

Lee, M. G., O. K. Hassani e B. E. Jones. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. The journal of neuroscience. 2005.

Leibowitz, S. F. e J. T. Alexander. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. Biological psychiatry. 1998.

Loscher, W., C. Brandt e U. Ebert. Excessive weight gain in rats over extended kindling of the basolateral amygdala. Neuroreport, v.14, n.14, p.1829-1832. 2003.

Lucki, I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. Biol Psychiatry, v.44, n.3, Aug 1, p.151-62. 1998.

Ludwig, D. S., N. A. Tritos, J. W. Mastaitis, R. Kulkarni, E. Kokkotou, J. Elmquist, B. Lowell, J. S. Flier e E. Maratos-Flier. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. J Clin Invest, v.107, n.3, Feb, p.379-86. 2001.

- Lund, J. P., A. Kolta, K. G. Westberg e G. Scott. Brainstem mechanisms underlying feeding behaviors. Curr Opin Neurobiol, v.8, n.6, Dec, p.718-24. 1998.
- Maidel, S., A. M. Lucinda, V. W. De Aquino, M. S. Faria e M. A. Paschoalini. The adrenaline microinjection into the median raphe nucleus induced hypophagic effect in rats submitted to food restriction regimen. Neurosci Lett, v.422, n.2, Jul 11, p.123-7. 2007.
- Mansur, S. S., M. G. Terenzi, J. Marino Neto, M. S. Faria e M. A. Paschoalini. Alpha1 receptor antagonist in the median raphe nucleus evoked hyperphagia in free-feeding rats. Appetite, v.57, n.2, Oct, p.498-503. 2011.
- Mansur, S. S., M. G. Terenzi, J. M. Neto, M. S. Faria e M. A. Paschoalini. Changes in food intake and anxiety-like behaviors after clonidine injected into the median raphe nucleus. Behav Brain Res, v.212, n.1, Sep 1, p.71-7. 2010.
- Marcus, J. N., C. J. Aschkenasi, C. E. Lee, R. M. Chemelli, C. B. Saper, M. Yanagisawa e J. K. Elmquist. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. J Comp Neurol, v.435, n.1, Jun 18, p.6-25. 2001.
- Mokler, D. J., J. R. Dugal, J. M. Hoffman e P. J. Morgane. Functional interrelations between nucleus raphe dorsalis and nucleus raphe medianus: a dual probe microdialysis study of glutamate-stimulated serotonin release. Brain Res Bull, v.78, n.4-5, Mar 16, p.132-8. 2009.
- Moore, R. Y., A. E. Halaris e B. E. Jones. Serotonin neurons of the midbrain raphe: Ascending projections. The Journal of Comparative Neurology, v.180, n.3, p.417-438. 1978.
- Moriguchi, T., T. Sakurai, T. Nambu, M. Yanagisawa e K. Goto. Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. Neurosci Lett, v.264, n.1-3, Apr 2, p.101-4. 1999.
- Muraki, Y., A. Yamanaka, N. Tsujino, T. S. Kilduff, K. Goto e T. Sakurai. Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT1A receptor. Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT1A receptor: Soc Neuroscience: 7159-7166 p. 2004.
- Nakamura, Y., N. Katakura e M. Nakajima. Generation of rhythmical ingestive activities of the trigeminal, facial, and hypoglossal motoneurons in in vitro CNS preparations isolated from rats and mice. J Med Dent Sci, v.46, n.2, Jun, p.63-73. 1999.
- Nonogaki, K., A. M. Strack, M. F. Dallman e L. H. Tecott. Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT2C receptor gene. Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT2C receptor gene: Nature Publishing Group: 1152-1156 p. 1998.
- Oliveira Margatho, L., S. Pereira Barbosa, L. Antonio De Luca, Jr. e J. Vanderlei Menani. Central serotonergic and adrenergic/imidazoline inhibitory mechanisms on sodium and water intake. Brain Res, v.956, n.1, Nov 22, p.103-9. 2002.
- Parker, G. C. e D. V. Coscina. Lesions of the posterior basolateral amygdala block feeding induced by systemic 8-OH-DPAT. Pharmacol Biochem Behav, v.68, n.4, Apr, p.729-34. 2001a.

_____. Lesions of the posterior basolateral amygdala block feeding induced by systemic 8-OH-DPAT. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.68, n.4, p.729734. 2001b.

Petrovich, G. D. e M. C. Gallagher. Control of food consumption by learned cues: a forebrain-hypothalamic network. Physiology & behavior, v.91, n.4, p.397-403. 2007.

Petrovich, G. D., C. A. Ross e P. Mody. Central, but not basolateral, amygdala is critical for control of feeding by aversive learned cues. The Journal of Neuroscience. 2009.

Peyron, C., D. K. Tighe, A. N. Van Den Pol, L. De Lecea, H. C. Heller, J. G. Sutcliffe e T. S. Kilduff. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. J Neurosci, v.18, n.23, Dec 1, p.9996-10015. 1998.

Pickard, G. E. e M. A. Rea. Serotonergic innervation of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and photic regulation of circadian rhythms. Biol Cell, v.89, n.8, Nov, p.513-23. 1997.

Popkin, B. M., K. Duffey e P. Gordon-Larsen. Environmental influences on food choice, physical activity and energy balance. Physiology & Behavior, v.86, n.5, p.603-613. 2005.

Qu, D., D. S. Ludwig, S. Gammeltoft, M. Piper, M. A. Pelleymounter, M. J. Cullen, W. F. Mathes, R. Przypek, R. Kanarek e E. Maratos-Flier. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. Nature, v.380, n.6571, Mar 21, p.243-7. 1996.

Ribas, A. S., R. A. Flores, A. M. De Nazareth, M. S. Faria, M. G. Terenzi, J. Marino-Neto e M. A. Paschoalini. Feeding behaviour after injection of alpha-adrenergic receptor agonists into the median raphe nucleus of food-deprived rats. Physiol Behav, v.105, n.2, Jan 18, p.220-9. 2012.

Richardson, B. P. Serotonin and nociception. Ann N Y Acad Sci, v.600, p.511-9; discussion 519-20. 1990.

Rosin, D. L., E. M. Talley, A. Lee, R. L. Stornetta, B. D. Gaylinn, P. G. Guyenet e K. R. Lynch. Distribution of alpha 2C-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. J Comp Neurol, v.372, n.1, Aug 12, p.135-65. 1996.

Saito, Y., M. Cheng, F. M. Leslie e O. Civelli. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. J Comp Neurol, v.435, n.1, Jun 18, p.26-40. 2001.

Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R. M. Chemelli, H. Tanaka, S. C. Williams, J. A. Richardson, G. P. Kozlowski, S. Wilson, J. R. Arch, R. E. Buckingham, A. C. Haynes, S. A. Carr, R. S. Annan, D. E. McNulty, W. S. Liu, J. A. Terrett, N. A. Elshourbagy, D. J. Bergsma e M. Yanagisawa. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell, v.92, n.4, Feb 20, p.573-85. 1998.

Saper, C. B., T. C. Chou e T. E. Scammell. The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. Trends Neurosci, v.24, n.12, Dec, p.726-31. 2001.

Saper, C. B., T. E. Scammell e J. Lu. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. Nature, v.437, n.7063, p.1257-1263. 2005.

- Scheinin, M., J. W. Lomasney, D. M. Hayden-Hixson, U. B. Schambra, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz e R. T. Freneau, Jr. Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. Brain Res Mol Brain Res, v.21, n.1-2, Jan, p.133-49. 1994.
- Schreiber, R., K. Selbach, M. Asmussen, D. Hesse e J. De Vry. Effects of serotonin(1/2) receptor agonists on dark-phase food and water intake in rats. Pharmacol Biochem Behav, v.67, n.2, Oct, p.291-305. 2000.
- Schwartz, D. H., S. McClane, L. Hernandez e B. G. Hoebel. Feeding increases extracellular serotonin in the lateral hypothalamus of the rat as measured by microdialysis. Brain research. 1989.
- Shimada, M., N. A. Tritos, B. B. Lowell, J. S. Flier e E. Maratos-Flier. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. Nature, v.396, n.6712, Dec 17, p.670-4. 1998.
- Smith, B. K., D. A. York e G. A. Bray. Activation of hypothalamic serotonin receptors reduced intake of dietary fat and protein but not carbohydrate: American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v.277. 1999. R802-R811 p.
- Sotelo, C., B. Cholley, S. El Mestikawy, H. Gozlan e M. Hamon. Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT1A Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei. Eur J Neurosci, v.2, n.12, p.1144-1154. 1990.
- Stroebele, N. e J. M. De Castro. Effect of ambience on food intake and food choice. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), v.20, n.9, p.821-838. 2004.
- Szczypka, M. S., M. A. Rainey e R. D. Palmiter. Dopamine is required for hyperphagia in Lepob/ob mice. Nature genetics. 2000.
- Takase, L. F. e M. I. Nogueira. Patterns of fos activation in rat raphe nuclei during feeding behavior. Brain Res, v.1200, Mar 20, p.10-8. 2008.
- Talley, E. M., D. L. Rosin, A. Lee, P. G. Guyenet e K. R. Lynch. Distribution of alpha 2A-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. J Comp Neurol, v.372, n.1, Aug 12, p.111-34. 1996.
- Tamashiro, K. L., M. A. Hegeman, M. M. Nguyen, S. J. Melhorn, L. Y. Ma, S. C. Woods e R. R. C. Sakai. Dynamic body weight and body composition changes in response to subordination stress. Physiology & behavior, v.91, n.4, p.440-448. 2007.
- Travers, J. B., L. A. Dinardo e H. Karimnamazi. Medullary reticular formation activity during ingestion and rejection in the awake rat. Exp Brain Res, v.130, n.1, Jan, p.78-92. 2000.
- Tsujino, N. e T. Sakurai. Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. Pharmacological reviews, v.61, n.2, p.162-176. 2009.
- Van De Kar, L. D. e S. A. Lorens. Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and median midbrain raphe nuclei. Brain research. 1979.
- Vertes, R. P., W. J. Fortin e A. M. Crane. Projections of the median raphe nucleus in the rat. The Journal of Comparative Neurology, v.407, n.4, p.555-582. 1999.

Walther, D. J. e M. Bader. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. Biochem Pharmacol, v.66, n.9, Nov 1, p.1673-80. 2003.

Wirtshafter, D. The control of ingestive behavior by the median raphe nucleus. Appetite, v.36, n.1, Feb, p.99-105. 2001.

Wirtshafter, D. e J. C. Krebs. Control of food intake by kainate/quisqualate receptors in the median raphe nucleus. Psychopharmacology (Berl), v.101, n.1, p.137-41. 1990.

Wirtshafter, D., T. R. Stratford e M. R. Pitzer. Studies on the behavioral activation produced by stimulation of GABAB receptors in the median raphe nucleus. Behav Brain Res, v.59, n.1-2, Dec 31, p.83-93. 1993.

Wirtshafter, D. e R. Trifunovic. Stimulation of ingestive behaviors following injections of excitatory amino acid antagonists into the median raphe nucleus. Pharmacol Biochem Behav, v.30, n.2, Jun, p.529-33. 1988.

Woods, S. C. Signals that influence food intake and body weight. Physiology & behavior, v.86, n.5, p.709-716. 2005.

Yamamoto, T., R. Matsuo, Y. Kiyomitsu e R. Kitamura. Sensory and motor responses of trigeminal and reticular neurons during ingestive behavior in rats. Exp Brain Res, v.76, n.2, p.386-400. 1989.

Zheng, H., M. M. Corkern, S. M. Crousillac, L. M. Patterson, C. B. Phifer e H. R. Berthoud. Neurochemical phenotype of hypothalamic neurons showing Fos expression 23 h after intracranial AgRP. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.282, n.6, Jun, p.R1773-81. 2002.