

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

RAFAEL APPEL FLORES

**A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Fos APÓS INJEÇÃO  
INTRACEREBROVENTRICULAR DE ADRENALINA EM  
RATOS SACIADOS**

Florianópolis (SC)

2014



RAFAEL APPEL FLORES

**A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Fos APÓS INJEÇÃO  
INTRACEREBROVENTRICULAR DE ADRENALINA EM  
RATOS SACIADOS**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, para à Obtenção do Título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof. Dra. Marta Aparecida Paschoalini

Florianópolis (SC)

2014

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

Appel Flores, Rafael

A expressão da proteína Fos após injeção  
intracerebroventricular de adrenalina em ratos saciados. /  
Rafael Appel Flores ; orientadora, Marta Aparecida  
Paschoalini - Florianópolis, SC, 2014.  
68 p.

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

Inclui referências

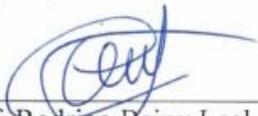
1. Neurociências. 2. Ingestão de alimento. 3. Núcleo  
mediano da rafe. 4. Receptores adrenérgicos. 5.  
Serotonina. I. Paschoalini, Marta Aparecida. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências. III. Título.

RAFAEL APPEL FLORES

**“A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FOS APÓS INJEÇÃO  
INTRACEREBROVENTRICULAR DE ADRENALINA  
EM RATOS SACIADOS”**

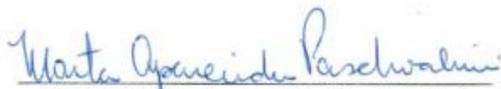
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 30 de maio de 2014.



Prof. Rodrigo Bainy Leal  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Prof. Marta Aparecida Paschoalini  
Orientadora – UFSC



Prof. Domitila Augusta Huber  
Membro – UFSC



Prof. Fernanda B.L. Christian  
Membro - UFSC



## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois acredito que não se vive sem fé. A fé é a força da vida e se o homem vive é porque crê em algo.

Agradeço a minha família, pelo apoio, força e amor dado incondicionalmente em todos os momentos de minha vida. Obrigado pai, mãe, Nanda e Marcelo, vocês foram fundamentais nesta conquista!

Gostaria de fazer um agradecimento especial a minha namorada Renata, pois sem ela nada disso seria possível. Obrigado meu amor por todo apoio, força e carinho. Obrigado pelas tardes que você me fazia companhia no laboratório. Obrigada por você estar sempre ao meu lado, sem você nada disso teria sentido!

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Aparecida Paschoalini, pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório ao longo desses mais de 4 anos. Agradeço por todo o conhecimento que adquiri, pelos conselhos dados e pela confiança em mim depositada.

A todos os colegas de laboratório (Eduardo, Brunno, Larissa, Ana Paula Taschetto) que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho. Pela convivência ao longo desses anos, sempre com muita amizade e respeito. Especialmente, gostaria de agradecer ao colega de laboratório Anderson, com quem comecei essa jornada científica há algum tempo atrás. Obrigado pelos papos científicos, pelos galhos quebrados, pelas ideias mirabolantes e pelo conhecimento compartilhado.

Agradeço a nossa aluna de Iniciação Científica Elisa, pela disponibilidade e auxílio na realização desta pesquisa.

Fica aqui registrado minha imensa gratidão ao Prof. Dr. José Donato Júnior da Universidade de São Paulo, que disponibilizou seu laboratório de pesquisa para que eu concluísse meus experimentos, além de compartilhar todo o seu conhecimento intelectual. Muito obrigado professor.

Aos professores do programa de pós-graduação em neurociências e aos colaboradores do nosso departamento, Nivaldo, dona Vilma e Carlão.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.



## EPÍGRAFE

“...Tu não és para mim senão uma pessoa inteiramente igual a cem mil outras pessoas. E eu não tenho necessidade de ti. E tu não tens necessidade de mim. Mas, se tu me cativas, nós teremos necessidade um do outro. Serás pra mim o único no mundo. E eu serei para ti a única no mundo...”

Trecho do livro “ O Pequeno Príncipe ” de Antoine de Saint-Exupéry.



## RESUMO

Estudos prévios em nosso laboratório sugerem que a injeção de adrenalina (AD) no núcleo mediano da rafe (NMR) diminui a ingestão de alimentos em ratos em restrição alimentar e aumenta a ingestão em ratos saciados. A injeção de agonista  $\alpha$ -2 adrenérgico no NMR provoca aumento da ingestão de alimento em ratos saciados. Por outro lado, a administração de agonista  $\alpha$ -1 adrenérgico, no NMR, não provoca alteração no consumo alimentar, provavelmente devido à presença de elevada atividade adrenérgica e manutenção de um tônus inibitório persistente (possivelmente serotoninérgico) sobre a ingestão de alimento em animais saciados. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão da proteína Fos e sua co-localização com neurônios serotoninérgicos após a injeção de AD no espaço intracerebroventricular (ICV) em ratos saciados. Foram utilizados 84 ratos Wistar com cânulas-guia cronicamente implantadas no ventrículo lateral (VL) ou 4º ventrículo (4V). Primeiramente, foram feitas curvas dose/resposta para a escolha da dose mais efetiva de AD sobre os comportamentos ingestivos. Após a injeção de AD no VL ou 4V, avaliou-se os comportamentos ingestivos e não ingestivos durante 30 minutos e a quantidade de comida e água consumida foram mensuradas. Os resultados mostraram que a dose de 20 nmol de AD injetada no VL e a dose de 60 nmol de AD injetada no 4V, foram as mais efetivas sobre os comportamentos ingestivos, aumentando a ingestão de alimentos. Após, novos grupos experimentais foram feitos com as doses escolhidas no VL e 4V, e realizaram-se reações imunoistoquímicas para proteína Fos e serotonina (5-HT) no NMR e núcleo dorsal da rafe (NDR), e para Fos em núcleo hipotalâmicos. Os resultados apontaram que, após administração de AD 20 nmol no VL, ocorreu aumento na expressão de Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) e hipotálamo ventromedial (HVM) e um aumento de Fos e sua co-localização com 5-HT no NDR. Nenhuma modificação estatisticamente significativa no NMR foi observada. Os resultados após a administração de AD 60 nmol no 4V indicaram que houve apenas aumento de duplas marcações no NDR, não sendo observada nenhuma alteração no NMR. Os dados presentes neste trabalho mostram que a injeção de AD ICV aumenta a ingestão de alimentos em ratos saciados. A expressão de Fos e duplas marcações no NDR demonstra atividade neuronal serotoninérgica e não-serotoninérgica nesta região. No entanto, não obtivemos evidências de que

uma modificação na neurotransmissão adrenérgica em ratos saciados modificasse a expressão de Fos no NMR e que os efeitos adrenérgicos sobre a ingestão de alimentos sejam mediados por ativação de neurônios serotoninérgicos deste núcleo.

**Palavras-chave:** Ingestão de alimento, Núcleo mediano da rafe, Receptores adrenérgicos, Proteína Fos, Serotonina.

## ABSTRACT

Previous studies from our laboratory have shown that adrenaline (AD) injection into the median raphe nucleus (NMR) decreased food intake in food-restricted rats and increases food intake in free-feeding rats. Injection of  $\alpha$ -2 adrenergic agonist into the NMR produced increases food intake in satiated rats. Moreover,  $\alpha$ -1 adrenergic agonist administration into the NMR do not change feeding behavior, may be due to the presence of a high adrenergic activity and maintenance of a persistent inhibitory tone (possibly serotonergic) on food intake in satiated animals. The aim of the present study was to evaluate the Fos protein expression and its colocalization in serotonergic neurons after intraventricular (ICV) injection of AD in free-feeding rats. A guide cannula was chronically implanted in the lateral ventricle (VL) or fourth ventricle (4V) of 84 male wistar rats. First, curves dose/response were made to choose the most effective dose of AD on ingestive behavior. After AD injection in VL or 4V, we assessed ingestive and non ingestive behaviors for 30 minutes and the amount of food and water consumed. The results showed that a dose of AD 20 nmol injected into the VL and a dose of AD 60 nmol injected into the 4V, were the most effective on changing the ingestive behavior. After, new experimental groups were made with the selected VL and 4V doses, and immunohistochemical reactions were performed to measure Fos protein and serotonin (5-HT) in NMR and NDR, and Fos expression in the hypothalamic nuclei. The results showed that administration of AD 20 nmol in VL increased Fos expression in NPV and HVM hypothalamic nuclei and increased Fos and its colocalization with 5-HT in the NDR. No statistically significant change was observed in NMR. The results after administration of AD 60 nmol in 4V showed an increase of double staining on the NDR, but no changes were observed in NMR. The data presented in this paper show that AD ICV injections increases food intake in free-feeding rats. The expression of Fos and double staining on the NDR showed serotonergic and non-serotonergic neuronal activity in this region stimulated by AD. However, we did not obtain evidence that a change in adrenergic neurotransmission in satiated rats modifies the Fos expression in NMR and that the adrenergic effects on food intake are mediated by the activation of serotonergic neurons in this nucleus.

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



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Desenho esquemático representando a localização dos núcleos da rafe de uma secção sagital do encéfalo de rato e as suas projeções (Adaptado de Frazer e Hensler, 1999).....4
- Figura 2:** Representação esquemática de estruturas e neurotransmissores envolvidos na regulação de neurônios 5-HT. As principais áreas são o núcleo pontino (pons) (incluindo o locus coeruleus, LC), córtex prefrontal medial (mPFC), habenula lateral (LHb), substância nigra (SN), substância cinzenta periaquedutal (PAG), bem como as diferentes áreas hipotalâmicas (HTL), dorsal da rafe (DR), mediano da rafe (MnR). Os principais neurotransmissores envolvidos são noradrenalina, glutamato e GABA (Adaptado Adell et al., 2002).....7
- Figura 3:** Aparelho estereotáxico.....16
- Figura 4:** Sistema de injeção das drogas.....18
- Figura 5:** Caixa experimental.....19
- Figura 6:** Registro digital da sessão.....21
- Figura 7:** A) Desenho esquemático demonstrando o correto posicionamento da cânula guia no VL. B) Desenho esquemático demonstrando o correto posicionamento da cânula guia no 4V. A barra de cor preta representa a localização da cânula guia. Para abreviações consultar lista de abreviaturas (Adaptado de Paxinos e Watson, 2007).....27
- Figura 8:** Alterações na quantidade, frequência, duração e latência da ingestão de alimento, após o tratamento com salina (VEH, n = 8) ou AD nas doses de 0,2 nmol (n = 8), 2 nmol (n = 8), 6 nmol (n = 8) e 20 nmol (n = 7) no ventrículo lateral de ratos saciados. Os dados representam a média ± EPM \*p < 0,05. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan.....28
- Figura 9:** Alterações na quantidade, frequência, duração e latência da ingestão de alimento, após o tratamento com salina (VEH, n = 8) ou AD

nas doses de 6 nmol (n = 7), 20 nmol (n = 7) e 60 nmol (n = 7) no 4V de ratos saciados. Os dados representam a média ± EPM \*p < 0,05. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan.....32

**Figura 10:** A e B) Desenhos esquemáticos demonstrando as áreas de quantificação nos núcleos hipotalâmicos estudados. C) Desenho esquemático demonstrando as áreas de quantificação no NMR e NDR. Para abreviações consultar lista de abreviaturas (Paxinos e Watson, 2007).....34

**Figura 11:** Gráficos da quantidade de células 5-HT + para NMR e NDR. A) Número de células 5-HT + no NMR e NDR após administração de AD 20 nmol no VL. B) Número de células 5-HT + no NMR e NDR após administração de AD 60 nmol no 4V. Os dados representam a média ± EPM \*p < 0,05 ( n = 5 por grupo). Teste T de Student.....35

**Figura 12:** Fotomicrografias do NMR e NDR ilustrando as reações imunoistoquímicas para Fos e 5-HT após injeção de AD no VL. Na coluna da esquerda estão apresentados os resultados obtidos após a injeção do veículo e na direita os resultados obtidos após a injeção de AD 20 nmol. A – B) Células 5-HT + no NMR. Não houve expressão estatisticamente significativa de Fos ou de duplas marcações em ambos os grupos analisados. C – D) Expressão de Fos e duplas marcações no NDR. E - F) Fotomicrografias ilustrando células Fos +/5-HT + nos animais tratados com AD 20 nmol em comparação com o grupo controle no NDR. Células 5-HT + (seta nº 1), co-localização com Fos (seta nº 2) e célula Fos + (seta nº 3). Barra de escala = 200µm, com exceção de E-F = 50µm.....36

**Figura 13:** A) Número de células marcadas no NMR (n = 5 por grupo). B) Número de células marcadas no NDR (n = 5 por grupo). C) Gráfico mostrando a porcentagem de células duplamente marcadas do total de células 5-HT + no NDR. Os dados representam a média ± EPM \*p < 0,05. Teste T de Student. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.....37

**Figura 14:** Fotomicrografias ilustrando a expressão de Fos em núcleos hipotalâmicos após a administração de AD 20 nmol no VL. Na coluna da esquerda estão apresentados os resultados obtidos após a injeção do

veículo e na direita os resultados obtidos após a injeção de AD 20 nmol. A – B) Expressão de Fos no NPV. C – D) Expressão de Fos no HVM. E – F) Expressão de Fos no ARC. F – G) Expressão de Fos na AHL. Barra de escala = 200µm. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.....38

**Figura 15:** Gráfico representando o número de células Fos + nos diferentes núcleos hipotalâmicos estudados (n = 3 – 5 por grupo). Os dados representam a média ± EPM \*p < 0,05. Teste T de Student. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.....39

**Figura 16:** Gráficos de correlação entre o número de células marcadas em cada núcleo e a quantidade de alimento ingerido após administração de AD 20 nmol no VL. A) Número de células Fos + NDR *versus* quantidade de alimento ingerido (g) no. B) Número de células Fos +/5-HT + no NDR *versus* quantidade de alimento ingerido (g). C) Número de células Fos + no NPV *versus* quantidade de alimento ingerido (g). Número de células Fos + no HVM *versus* quantidade de alimento ingerido (g). Teste de correlação de Pearson \*p < 0,05.....39

**Figura 17:** Fotomicrografias do NMR e NDR ilustrando as reações imunoistoquímicas para Fos e 5-HT após injeção de AD no 4V. Na coluna da esquerda estão apresentados os resultados obtidos após a injeção do veículo e na direita os resultados obtidos após a injeção de AD 20 nmol. A – B) Células 5-HT + no NMR. Não houve expressão estatisticamente significativa de Fos ou de duplas marcações em ambos os grupos analisados. C – D) Expressão de Fos e células Fos +/5-HT + no NDR. E - F) Fotomicrografias ilustrando células Fos +/5-HT + (indicado pelas setas pretas) nos animais tratados com AD 60 nmol em comparação com o grupo controle no NDR. Barra de escala = 200µm, com exceção de E – F = 50µm. n = 3 por grupo.....41

**Figura 18:** A) Número de células marcadas no NMR (n = 3 por grupo). B) Número de células marcadas no NDR (n = 3 por grupo). Os dados representam a média ± EPM \*p < 0,05. Teste T de Student. C) Gráfico de correlação entre número de células Fos +/5-HT + no NDR *versus* quantidade de alimento ingerido (g) após administração de AD 60 nmol no 4V. Teste de correlação de Pearson \*p < 0,05. D) Gráfico mostrando a porcentagem de células duplamente marcadas do total de células

5-HT + no NDR após administração no 4V de AD. Os dados representam a média  $\pm$  EPM.....42

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Efeitos de AD no VL sobre a duração e frequência dos comportamentos não ingestivos de ratos saciados durante 30 minutos de registro após administração de veículo (0, n = 8), AD 0,2 nmol (n = 8), AD 2 nmol (n = 8), AD 6nmol (n = 8) e 20 nmol (n = 7). Os dados representam a média  $\pm$  EPM \*p < 0,05. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan.....30

**Tabela 2:** Efeitos de AD no 4V sobre a duração e frequência dos comportamentos não ingestivos de ratos saciados durante 30 minutos de registro após administração de veículo (0, n = 8), AD 6 nmol (n = 7), 20 nmol (n = 7) e 60 nmol (n = 7). Os dados representam a média  $\pm$  EPM \*p < 0,05. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan.....33



## LISTA DE ABREVIATURAS

3V	3° Ventrículo
4V	4° Ventrículo
5-HT	Serotonina
8-OH-DPAT	8-hidroxi-2(Di-N-Propilamino) Tetralina
ABC	Complexo Avidina-Biotina
AD	Adrenalina
AHL	Área Hipotalâmica Lateral
ANOVA	Análise de variância
ARC	Núcleo Arqueado
DAB	Tetrahydro Cloridrato Diaminobenzidina
EPM	Erro Padrão Média
f	Fórnix
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GRI	Genes de Resposta Imediata
HVM	Hipotálamo Ventromedial
ICV	Intracerebroventricular
KPBS	Tampão Salina Fostato Potássio Triton X-100
KPBS-T	Tampão Salina Fostato Potássio com Triton100
LC	Locus Coeruleus
NA	Noradrenalina
NDR	Núcleo Dorsal da Rafe
NMR	Núcleo Mediano da Rafe
NPV	Núcleo Paraventricular
NTS	Núcleo do Trato Solitário
PBS	Tampão Salina Fostato
PFA	Paraformaldeído
Pi	Pineal
Pn	Pontino
PnO	Pontino Oral
SNC	Sistema Nervoso Central
VEH	Veículo
VL	Ventrículo Lateral



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	11
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
3.1	Objetivos gerais.....	13
3.1.1	Objetivos específicos.....	13
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
4.1	Animais.....	15
4.2	Procedimentos Cirúrgicos.....	15
4.3	Soluções e Doses Administradas.....	17
4.4	Grupos Experimentais.....	17
4.5	Injeções das Drogas.....	17
4.6	Caixa de Registro Comportamental.....	18
4.7	Procedimentos Experimentais.....	19
4.8	Análise Histológica.....	21
4.9	Imunoistoquímica.....	22
4.10	Contagem de células.....	24
4.11	Análise estatística.....	24
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	27
<b>5.1</b>	<b>Efeitos da AD injetada no VL sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos em ratos saciados da curva dose/resposta</b> .....	27
5.1.1	Efeitos sobre a Quantidade, Latência, Duração e Frequência da ingestão de alimento.....	27
5.1.2	Efeitos sobre os comportamentos de Locomoção, Imobilidade, Exploração Vertical, Exploração não Locomotora e Auto Limpeza.....	29
<b>5.2</b>	<b>Efeitos da AD injetada no 4V sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos em ratos saciados da curva dose/resposta</b> .....	31

5.2.1	Efeitos sobre a Quantidade, Latência, Duração e Frequência da ingestão de alimento.....	31
5.2.2	Efeitos sobre os comportamentos de Locomoção, Imobilidade, Exploração Vertical, Exploração não Locomotora e Auto Limpeza.....	32
<b>5.3</b>	<b>Efeitos da AD 20 nmol injetada no VL sobre a expressão da proteína Fos e sua co-localização com neurônios serotonérgicos em ratos saciados.....</b>	<b>34</b>
<b>5.4</b>	<b>Efeitos da AD 60 nmol injetada no 4V sobre a expressão da proteína Fos e sua co-localização com neurônios serotonérgicos em ratos saciados.....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>6.1</b>	<b>Injeções de AD no VL.....</b>	<b>43</b>
<b>6.2</b>	<b>Injeções de AD no 4V.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo estudo dos mecanismos envolvidos no controle da ingestão alimentar cresceu bastante nos últimos tempos na tentativa de controlar o aumento da grande prevalência da obesidade na população mundial (Berthoud, 2002). A abundância calórica encontrada nos alimentos e a menor necessidade de esforço físico contribuem para este quadro, intensificando a variedade de doenças crônicas como aumento da pressão sanguínea, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares (Kanoski et al., 2007).

A manutenção da vida requer um constante suprimento de fontes nutritivas para todo o corpo, utilizadas para gerar energia e preservar as estruturas corporais, sendo que a produção desta energia é obtida através da ingestão de alimentos (Foster e Mcgarr, 1996). O controle do comportamento alimentar envolve vários níveis de organização, tais como o homeostático e o hedonístico (Antunes-Rodrigues et al., 2002). No controle homeostático, as informações do estado nutricional que chegam ao sistema nervoso central (SNC) são provenientes do tecido adiposo, do plasma, do estômago, dos intestinos delgado e grosso, do pâncreas e do fígado. No controle hedonístico, o SNC avalia tanto as aferências periféricas como as provenientes de outras áreas encefálicas, incluindo as informações visuais, olfatórias, gustatórias, orais, sensibilidade lingual geral, e sensibilidade visceral. É neste nível de controle que avaliamos as características de um alimento, como sua palatabilidade, seus aspectos nutricionais e o quão prazeroso é este alimento (Saper et al., 2002).

Este controle alimentar é altamente complexo e envolve várias regiões cerebrais, estendendo-se do córtex ao tronco encefálico, entretanto, a estrutura neuronal mais estudada tem sido o hipotálamo (Williams et al., 2001). Nele existe uma circuitaria, composta por redes neurais de elaboração e emissão de sinais anorexigênicos e orexigênicos, que ajustam os sinais relacionados ao apetite e saciedade. Os neurônios que produzem esses sinais moleculares estão sujeitos à modulação exercida por estímulos sensoriais e por uma variedade de hormônios e metabólitos encontrados no meio interno (Kalra et al., 1999). Estes mecanismos de sinalização são realizados por diversas substâncias químicas que podem ser neurotransmissores, neuropeptídeos e hormônios. Os neurotransmissores envolvidos na regulação da ingestão

de alimentos são as catecolaminas, a serotonina (5-HT), ácido gama-aminobutírico (GABA) e o glutamato. Entre os neuropeptídeos, destacam-se a galanina, a colecistocinina (CCK) e o neuropeptídeo Y (NPY). Com relação aos hormônios, os mais relevantes são a leptina, ghrelina, peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), insulina, glucagon, GLP-1 e GLP-2 (para revisão: Schwartz et al., 2000).

O hipotálamo foi a primeira estrutura cerebral reconhecida por exercer controle da ingestão alimentar através da descoberta de que lesões no eixo hipotálamo hipófise resultavam em obesidade em animais (Brobeck, 1946). Além disso, a estimulação elétrica do hipotálamo induz comportamentos motivacionais como sede e fome em ratos (Valenstein et al., 1968). Estudos de lesão e estimulação elétrica identificaram vários núcleos hipotalâmicos que são importantes na regulação do comportamento alimentar, como núcleo paraventricular (NPV), núcleo arqueado (ARC), área hipotalâmica lateral (AHL), hipotálamo ventromedial (HVM) e o hipotálamo dorsomedial (HDM) (Berthoud, 2002; Adan et al., 2008). Lesões no NPV (Leibowitz et al., 1981) e no ARC (Choi e Dallman, 1999) de ratos, resultam em hiperfagia e obesidade. Injeções de noradrenalina (NA) (Leibowitz, 1978) e adrenalina (AD) (Leibowitz, et al., 1988) no NPV mostraram que essas catecolaminas estimulam o consumo de alimentos. Por outro lado, o NPV é particularmente sensível ao efeito inibitório induzido por agonistas de receptores 5-HT sobre a ingestão de alimentos (Hutson et al., 1988a). Lesões eletrolíticas no HVM também resultam em aumento na ingestão alimentar e obesidade (Hetherington e Ranson, 1940; Thomas e Mayer, 1968; Hoebel e Teitelbaum, 1966) e a estimulação elétrica da AHL aumenta a ingestão de alimentos em ratos, efeito este encontrado até mesmo em animais saciados (Herberg e Blundell, 1967).

O hipotálamo sofre influência direta de vias adrenérgicas do tronco encefálico sobre o comportamento alimentar, tendo destaque o NPV por ser o núcleo com maior sensibilidade à atividade adrenérgica associada à alimentação (Schwartz et al., 2000; Berthoud, 2002). Por outro lado, o NPV é extensamente inervado pelos núcleos da rafe, sendo também um dos principais locais onde a 5-HT atua modulando a ingestão de alimento em mamíferos (Berthoud, 2002; Vertes e Linney, 2007).

Estruturas do tronco encefálico também participam da regulação da ingestão alimentar, como o núcleo parabraquial, núcleo do trato solitário (NTS), núcleos da rafe e o lócus coeruleus (LC) (Berthoud, 2002). As informações relacionadas a saciedade são em grande parte

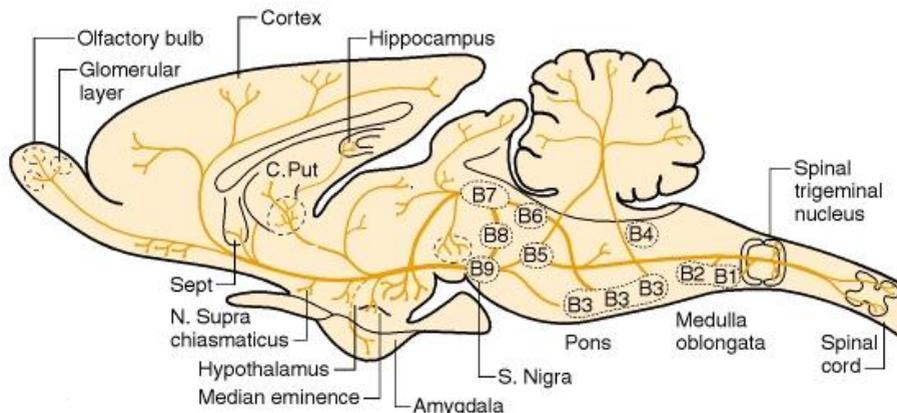
transportadas para o tronco encefálico por meio de fibras aferentes do nervo vago. (Schwartz et al., 2000). Estas informações convergem no NTS, que integra as informações sensoriais provenientes do trato gastrointestinal e vísceras abdominais, bem como informações da cavidade oral (Travers e Norgren, 1987). Além disso, as informações humorais originárias do trato gastrointestinal e de outros tecidos tem acesso ao NTS via receptores nele localizados (Schwartz et al., 2000). O NTS estabelece conexões diretas e recíprocas com outras estruturas importantes para a regulação da ingestão de alimentos, como NPV (Ter Horst et al., 1989) e conexões indiretas com o córtex cerebral através de estruturas do tronco encefálico como o LC, núcleo parabraquial e os núcleos da rafe (Berthoud, 2002).

Os núcleos da rafe são considerados a principal fonte de 5-HT encefálica e constituem uma população neuronal não-homogênea localizada na linha média do tronco encefálico, exibindo diversidade morfológica e característica funcional (Azmitia e Segal, 1978; Jacobs e Azmitia, 1992; Takase e Nogueira, 2008). Os núcleos da rafe foram identificados e organizados em nove grupos de células serotoninérgicas por Dahlstrom e Fuxe (B1 a B9) (1964 apud Vertes e Linley, 2007). Ao longo do bulbo localizam-se os núcleos da rafe caudais, denominados pálido (B1), obscuro (B2) e magno (B3) tendo suas projeções para o tronco encefálico inferior. Na ponte e mesencéfalo estão os núcleos da rafe rostrais, denominados pontino (B5), dorsal (B7) e mediano (B8) ascendendo o tronco encefálico superior e prosencéfalo basal pelo feixe prosencefálico medial (Jacobs e Azmitia, 1992; Vertes e Linley, 2007). O núcleo B9 permaneceu com sua nomenclatura original e tem recebido menos atenção do que outros núcleos serotoninérgicos do tronco cerebral (Vertes e Crane, 1997).

O núcleo dorsal da rafe (NDR) e o núcleo mediano da rafe (NMR) dão origem a quase totalidade das projeções serotoninérgicas para o prosencéfalo (Lucki, 1998; Adell et al., 2002). Além destes núcleos, procedimentos histoquímicos mais recentes revelaram a presença de um número significativo de neurônios serotoninérgicos em regiões mais laterais na ponte e mesencéfalo (Arita et al., 1993; Vertes e Crane, 1997).

Os axônios originários do NDR e NMR representam distintos sistemas de projeção serotoninérgica e cada via predomina em uma determinada estrutura terminal (Mokler et al., 2009). Os neurônios serotoninérgicos presentes no NMR enviam projeções para o hipocampo dorsal, septo medial, núcleo accumbens, área tegmental ventral, cortex

temporal, amígdala central e vários núcleos hipotalâmicos, enquanto que as projeções do NDR atingem o estriado dorsal e ventral, o hipocampo ventral, amígdala, núcleo accumbens, substância nigra, córtex cerebral, septo lateral e diversas estruturas hipotalâmicas, como NPV, HVM, e AHL (Moore et al., 1978; Azmitia e Segal, 1978; Vertes e Linney, 2007; Lechin et al., 2006). Os núcleos da rafe e suas projeções estão representados na figura 1.



**Figura 1:** Desenho esquemático representando a localização dos núcleos da rafe de uma secção sagital do encéfalo de rato e as suas projeções (Adaptado de Frazer e Hensler, 1999).

Deve-se ressaltar que existem consideráveis diferenças morfológicas e funcionais entre NMR e NDR (Moliver, 1987). O NDR apresenta finas fibras com uma distribuição difusa, alta densidade de transportadores de 5-HT e suscetibilidade a agentes neurotóxicos. O NMR apresenta fibras espessas e com uma distribuição topográfica mais precisa, com uma baixa densidade de transportadores de 5-HT e baixa suscetibilidade a agentes neurotóxicos (Hensler, 2006; Moliver, 1987). Além disso, o NDR e o NMR fazem um intercâmbio de projeções axonais serotoninérgicas em proporção à sua população de neurônios 5-HT (Vertes e Martin, 1988; Lechin et al, 2006), sugerindo uma possível coordenação de ambos os núcleos na liberação de 5-HT prosencefálica (Vertes et al., 1999; Mokler et al., 2009).

Em meados do século XX, pesquisadores identificaram uma substância química presente no soro sanguíneo que produzia um efeito vasoconstritor, batizando tal substância de serotonina (do grego *serum* (soro) e *tonic* (tônus)) graças à sua presença no soro e ao seu efeito sobre o tônus vascular (Rapport et al., 1948). Esta substância foi mais tarde demonstrada ser idêntica a uma substância contrátil isolada anteriormente de células enterocromafins da mucosa gastrointestinal chamada enteramina (Erspamer e Asero, 1952).

A 5-HT é um neurotransmissor que compõe o grupo das aminas biogênicas, incluindo ainda as catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina) (Kandel et al., 2000). Sua biossíntese ocorre a partir do aminoácido precursor triptofano, que é convertido a 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano hidroxilase, uma enzima presente em células produtoras de 5-HT e, em seguida, é descarboxilado a 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Rang et al., 2007).

A 5-HT influencia uma variedade de sistemas fisiológicos, tais como o sistema cardiovascular, respiração e termoregulação, e uma variedade de funções comportamentais como ritmo circadiano, ciclo sono-vigília, apetite, agressividade, comportamento sexual, sensibilidade à dor e aprendizado (Lucky, 1998). Diversas pesquisas demonstraram que a manipulação farmacológica de 5-HT, especialmente em centros do controle do apetite no hipotálamo, podem culminar em alterações sobre a ingestão de alimentos (Blundell e Latham, 1979). O efeito da 5-HT na regulação alimentar é associado à saciedade e supressão da alimentação (Blundell, 1991). A administração de 5-HT ou de seus precursores (triptofano ou 5-hidroxitriptofano) em ratos, diminui significativamente a quantidade, a frequência e a duração da ingestão de alimentos (Montgomery et al., 1985; Blundell e Latham, 1979; Halford et al., 2007). Inibidores seletivos da recaptção de 5-HT, como a fluoxetina, sertralina e sibutramina têm demonstrado ser potenciais redutores da ingestão de alimento e induzir perda de peso em mamíferos (Halford et al., 2007). Opostamente a estes efeitos, utilizando drogas que bloqueiam síntese neuronal de 5-HT, observa-se o aumento na ingestão de alimentos (Mackenzie et al., 1979).

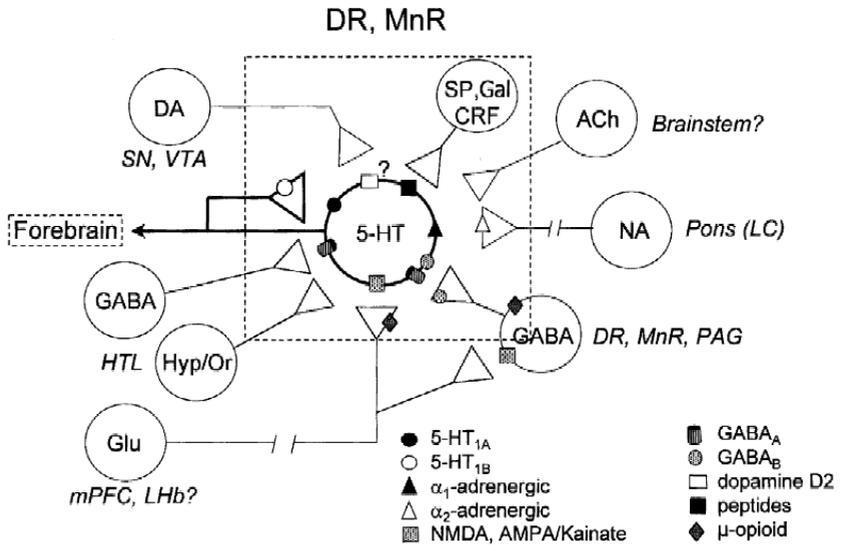
Existem sete classes de receptores 5-HT, classificados como 5-HT<sub>1(1A, 1B, 1C, 1E, 1F)</sub>, 5-HT<sub>2(2A, 2B, 2C)</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5(5A, 5B)</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub>, compreendendo um total de 14 receptores serotoninérgicos estrutural e funcionalmente distintos. Todos os receptores são pertencentes à classe de receptores acoplados à proteína G, com exceção

do receptor 5-HT<sub>3</sub> que está ligado a um canal iônico (para revisão, Barnes e Sharp, 1999).

De suma importância para este trabalho, destacam-se os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, os quais atuam como autoreceptores somatodendríticos em neurônios serotoninérgicos, sendo este mecanismo chamado de autorregulação de células 5-HT. Estes receptores funcionam como sensores que respondem diminuindo a liberação do neurotransmissor, diminuindo também o disparo das células serotoninérgicas, quando a concentração de 5-HT no espaço extracelular torna-se excessiva (Adell et al., 2002; Adell e Artigas., 1998). O NDR e NMR são as áreas do cérebro com a mais alta densidade de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Chalmers e Watson, 1991; Kia et al., 1996; Adell et al., 2002). Agonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, como a 8-hidroxi-2 (di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT) quando injetados no NMR, estimulam a ingestão de alimento (Bendotti e Samanin, 1986; Fletcher e Coscina, 1991; Currie e Coscina, 1993) por intermédio da inibição da atividade neuronal serotoninérgica e redução na liberação de 5-HT em regiões prosencefálicas terminais.

No entanto, outros neurotransmissores podem influenciar a regulação dos neurônios 5-HT no NDR e NMR em um mecanismo chamado de heterorregulação (Adell et al., 2002), conforme a figura 2. Além da 5-HT, NA, glutamato, GABA, dopamina, glicina, óxido nítrico e também neuropeptídeos, podem influenciar a ação dos neurônios 5-HT alterando a frequência de disparos e, conseqüentemente, os comportamentos ingestivos (Wirtshafter, 2001; Adell et al., 2002).

Sistemas adrenérgicos são circuitos neurais e endócrinos que utilizam NA e AD como neurotransmissores e têm funções importantes na ingestão de alimentos, cognição, reprodução, emoção, entre outros. (Marino-Neto et al., 2004). O LC é a principal fonte de NA no SNC (Kandel et al., 2000) e ambos NMR e NDR recebem projeções aferentes noradrenérgicas (Adell et al., 2002). Portanto, o entendimento destes circuitos adrenérgicos e sua influência sobre os núcleos da rafe tornam-se indispensáveis para nossa pesquisa.



**Figura 2:** Representação esquemática de estruturas e neurotransmissores envolvidos na regulação de neurônios 5-HT. As principais áreas são o núcleo pontino (pons) (incluindo o locus coeruleus, LC), córtex prefrontal medial (mPFC), habenula lateral (LHb), substância nigra (SN), substância cinzenta periaquedual (PAG), bem como as diferentes áreas hipotalâmicas (HTL), dorsal da rafe (DR), mediano da rafe (MnR). Os principais neurotransmissores envolvidos são noradrenalina, glutamato e GABA (Adaptado Adell et al., 2002).

O NDR recebe aferências do LC, fazendo conexões com o córtex cerebral, enquanto que o NMR recebe aferências que partem da área tegmental lateral, do LC/subcoeruleus e do grupamento de corpos celulares A1 e A2. Além disso, os neurônios do NMR também recebem projeções de neurônios contendo AD encontrada no grupamento celular C1+C2 em núcleos do bulbo (Marzinkiewicz et al., 1989; Massari et al., 1979; Morgane et al., 1995; Moore e Card, 1984; Peyron et al., 1996; Hopwood e Stamford, 2001; Adell e Artigas, 1999; Adell et al., 2002; Lechin et al., 2006). Consistentemente, a noradrenalina, seu transportador e suas enzimas sintetizadoras também foram encontrados nos núcleos da rafe (Saavedra et al., 1976; Ordway et al., 1997; Adell et al., 2002).

Os receptores adrenérgicos são organizados em nove subtipos -  $\alpha$ -1 (A, B, D),  $\alpha$ -2 (A, B, C) e  $\beta$  (1, 2, 3) – sendo que todos são acoplados à proteína G (Philip e Hein, 2004). Estudos apontaram a presença de níveis relativamente elevados de RNAm para a expressão de receptores  $\alpha$ -1 (Day et al., 1997) e receptores  $\alpha$ -2 (Unnerstall et al., 1985; Rosin et al., 1993; Talley et al., 1996) no NMR e NDR. Os receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos parecem estar situados no corpo celular de células 5-HT (Gallagher e Aghajanian, 1976), enquanto que os receptores  $\alpha$ -2 estão localizados nas terminações nervosas noradrenérgicas (Yoshioka et al., 1992; Haddjeri et al., 1996).

As aferências noradrenérgicas exercem um controle facilitatório na liberação de 5-HT, agindo através de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos (Adell et al., 2002). Estudos de microdiálise mostraram que o agonista  $\alpha$ -1 cirazoline aumentou a liberação de 5-HT no NMR (Adell e Artigas, 1999), enquanto que o antagonista  $\alpha$ -1 prazosin suprimiu a liberação de 5-HT basal no NMR e NDR (Adell e Artigas, 1999; Bortolozzi e Artigas, 2003). Porém a influência facilitatória noradrenérgica na liberação de serotonina mediada por receptores  $\alpha$ -1 parece ser mais evidente no NMR do que no NDR (Rouquier, et al., 1994).

Contrariamente aos receptores  $\alpha$ -1, os receptores  $\alpha$ -2 exercem um papel inibitório sobre a liberação de 5-HT (Adell et al., 2002). A injeção de clonidina, um agonista de receptor  $\alpha$ -2 adrenérgico, diminui a liberação de 5-HT em 30% dos valores basais no NMR e 60% no NDR, enquanto que um antagonista  $\alpha$ -2 aumenta a liberação em ambos os núcleos. (Adell e Artigas, 1999; Adell et al, 2002). Estes resultados sugerem que a ativação dos receptores  $\alpha$ -2 inibe a liberação de NA em terminais pré-sinápticos noradrenérgicos, eliminando assim o tônus estimulante dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos sobre os neurônios serotoninérgicos, o que resulta em diminuição da liberação de 5-HT (Adell e Artigas, 1999).

Uma maneira de estudar as alterações no padrão de atividade de diferentes tipos neuronais é o emprego dos genes de resposta imediata (GRI). Eles foram descritos como uma classe de genes expressos de forma rápida e transitória em diferentes áreas do sistema nervoso após estimulação específica (Morgan e Curran, 1991; Sng et al., 2004).

O produto do GRI *c-fos*, a proteína Fos, tem sido aplicada com sucesso na verificação das alterações neuronais relacionadas aos diferentes aspectos do comportamento alimentar em roedores (Olson, 1993; Takase e Nogueira, 2008; Franchini et al., 2002). A proteína de expressão imediata Fos tem por funções alterar rapidamente a transcrição de genes, positivamente ou negativamente, em resposta a sinais da superfície celular (Hoffman et al., 1993). Em condições normais ou basais, a expressão de Fos é reduzida ou ausente, porém é rapidamente induzida nos núcleos neuronais em resposta a estímulos eficazes, atingindo o pico máximo de seus níveis dentro de 90 a 120 minutos (Herdegen and Leah, 1998; Hoffman and Lyo, 2002). Além disso, sua expressão pode ser combinada com outras técnicas de imunistoquímica para demonstrar co-marcação com um antígeno citoplasmático, podendo ser um neurotransmissor (ex. serotonina) ou uma enzima (ex. triptofano-hidroxilase) ( Takase e Nogueira, 2008).

Estudos prévios em nosso laboratório sugerem que AD injetada no NMR diminui a ingestão de alimentos e encurta a duração da ingestão em ratos em restrição alimentar, o que não ocorre com a injeção de NA no mesmo núcleo (Maidel et al., 2002). Por outro lado, a injeção de AD no NMR em ratos saciados aumentou a ingestão de alimentos, a frequência e diminuiu o tempo de latência para iniciar a ingestão (Santos et al., 2009). Com base nessas evidências, a hipofagia induzida pela AD em ratos com restrição alimentar pode ser explicada pela ativação de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos em neurônios serotoninérgicos no NMR resultando em liberação de 5-HT e uma ação indireta inibitória da AD na ingestão de alimentos (Maidel et al., 2002).

Em ratos saciados, os efeitos na ingestão alimentar provocados por injeções de AD podem ser atribuídos à ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha$ -2 no NMR, que por sua vez, poderiam exercer um efeito supressor sobre a liberação de 5-HT e a sua ação inibitória sobre o comportamento alimentar (Santos et al., 2009). A injeção de clonidina, um agonista  $\alpha$ -2, no NMR em ratos saciados provocou resposta hiperfágica, sendo comparada à resposta induzida pela AD (Mansur et al., 2010). O tratamento com fenilefrina, um agonista  $\alpha$ -1 adrenérgico, no NMR de ratos saciados não modificou os comportamentos ingestivos, sugerindo que em animais saciados a atividade adrenérgica mediada por  $\alpha$ -1 adrenoceptores seja elevada e o consequente tônus inibitório da 5-HT sobre a ingestão de alimento também elevado (Mansur et al., 2011). Além disso, em outro trabalho de nosso grupo, a injeção de prazosin, um antagonista  $\alpha$ -1 adrenérgico, no NMR provocou resposta hiperfágica em

ratos saciados e a injeção de ioimbina, um antagonista  $\alpha$ -2 adrenérgico, mostrou-se capaz de bloquear o efeito hiperfágico induzido pela injeção de clonidina (Mansur et al., 2011). Reforçando essas sugestões, dados recentes de nosso laboratório revelaram que a injeção de fenilefrina no NMR diminuiu a ingestão de alimentos em ratos em condições de restrição alimentar e o tratamento com clonidina não afetou o comportamento ingestivo (Ribas et al., 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA.

Os experimentos conduzidos em nosso laboratório indicam que a modificação da neurotransmissão adrenérgica no NMR acentua ou remove uma influência inibitória sobre a ingestão de alimentos, possivelmente serotoninérgica, devido à presença de neurônios produtores de 5-HT nesse núcleo. Até o momento, não obtivemos nenhuma evidência direta de que os efeitos adrenérgicos sobre a ingestão de alimentos sejam mediados por mudanças na liberação de 5-HT.

A proteína Fos tem sido aplicada com sucesso na verificação das alterações neuronais relacionadas aos diferentes aspectos do comportamento alimentar em roedores (Olson, 1993; Takase e Nogueira, 2008; Franchini et al., 2002), sendo rapidamente induzida nos núcleos neuronais em resposta a estímulos eficazes (Herdegen and Leah, 1998; Hoffman and Lyo, 2002).

Nossa hipótese consiste que em animais saciados, os neurônios serotoninérgicos do NMR estejam tonicamente ativados e que a ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha$ -2 remova esta ativação. Deste modo, sugerimos que uma modificação na atividade neuronal serotoninérgica no NMR, através da modificação da neurotransmissão adrenérgica, pode ou não ser capaz de diminuir a expressão da proteína Fos e assim, mostrar uma possível atividade neuronal neste núcleo. Além disso, utilizando-se de técnicas de imunistoquímica, poderemos demonstrar uma possível co-localização da proteína Fos com neurônios serotoninérgicos, sugerindo assim uma provável atividade neuronal serotoninérgica no NMR.

Ainda não existem estudos sobre uma possível influência adrenérgica em neurônios serotoninérgicos do NDR sobre a ingestão de alimentos. Com este trabalho poderemos verificar uma possível participação do NDR sobre os comportamentos alimentares e, através de técnicas imunistoquímicas, demonstrar atividade neuronal serotoninérgica nesta região.



### **3 OBJETIVOS.**

#### **3.1 Objetivos gerais.**

Avaliar a expressão da proteína Fos e sua co-localização com neurônios serotonérgicos no NMR e NDR após a injeção de AD no espaço intracerebroventricular (ICV) em ratos saciados. Além disso, objetivamos avaliar a ativação de núcleos hipotalâmicos por meio da expressão da proteína Fos.

##### **3.1.1 Objetivos específicos.**

- Realizar curva dose/resposta, através de injeção de AD no ventrículo lateral (VL), analisando os comportamentos ingestivos e não ingestivos na caixa de registro comportamental, para seleção da dose mais efetiva.
- Realizar curva dose/resposta através de injeção AD no 4º ventrículo (4V), analisando os comportamentos ingestivos e não ingestivos na caixa de registro comportamental, para seleção da dose mais efetiva.
- Utilizando-se a dose mais efetiva de AD no VL ou 4V, realizar imunoistoquímica para Fos e 5-HT no NMR e NDR
  - Realizar imunoistoquímica para Fos nos núcleos hipotalâmicos – núcleo paraventricular (NPV), hipotálamo ventromedial (HVM), núcleo arqueado (ARC) e área hipotalâmica lateral (ALH).
  - Avaliar a expressão de proteína Fos em neurônios do NMR e NDR após injeção de AD no VL e 4V.
  - Avaliar a colocalização da proteína Fos e 5-HT em neurônios do NMR e NDR após a injeção de AD no VL e 4V.
  - Avaliar a expressão de proteína Fos após injeção de AD no VL e 4V em neurônios nos núcleos hipotalâmicos - núcleo paraventricular (NPV), hipotálamo ventromedial (HVM), núcleo arqueado (ARC) e área hipotalâmica lateral (ALH).



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS.

### 4.1 Animais.

Neste trabalho foram utilizados 84 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com peso corporal entre 270 e 310g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm), forradas com maravalha, dispondo de água e alimento granulado (CR-1, Nuvilab) *ad libitum*. Ficaram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, com temperatura controlada em  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo o início do período de luz às 07:00h e término às 19:00h. Todos os procedimentos experimentais desse estudo foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo o protocolo de experimentação aprovado pelo Comitê de Ética ao Uso de Animais (CEUA) nº PP755 da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### 4.2 Procedimentos Cirúrgicos.

Os animais foram submetidos ao processo de cirurgia estereotáxica ICV para o implante de cânulas guias e posterior microinjeção da droga no 4V ou VL. Para implantação da cânula guia, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina/cloridrato de cetamina (13 mg/Kg de xilazina; 87 mg/Kg de cloridrato de cetamina) injetada por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram adaptados ao aparelho estereotáxico (Marca Insight, Ribeirão Preto, Brasil, mostrado na figura 3) tendo a cabeça fixada por intermédio de barras posicionadas nos condutos auditivos e incisivos superiores. Foi realizada tricotomia da área desejada, assepsia e incisão longitudinal para exposição da calota craniana. Após esse procedimento, foi feita a raspagem do perióstio para melhor visualização das estruturas de referência. A seguir, uma cânula guia feita a partir de segmento de agulha hipodérmica 11 (23G BD®), com 0,6 mm de diâmetro externo e 15mm de comprimento, foi posicionada dentro do VL ou uma cânula guia, com o mesmo diâmetro e 18mm de comprimento, foi posicionada no 4V. As coordenadas para VL foram: antero-posterior ao bregma: - 0,8mm; deslocamento lateral: 1,50mm; dorsoventral 3,00mm. As

coordenadas para 4V foram: anteroposterior ao bregma: 8,5mm; dorsoventral: 6,2mm; deslocamento lateral: 1,9mm. Para evitar o rompimento do seio sagital superior durante a cirurgia estereotáxica, o que poderia levar o animal a morte, a haste foi inclinada 20°. Estas coordenadas foram obtidas através do atlas de encéfalo de rato Paxinos e Watson (2007).

As cânulas foram fixadas à calota craniana por meio de um parafuso de aço inoxidável e envolvido por acrílico autopolimerizável. O correto posicionamento da cânula no espaço ICV foi verificado através do deslocamento da coluna líquida (soro fisiológico estéril). Um mandril de aço inoxidável foi introduzido no interior das cânulas para evitar seu entupimento. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, os animais retornaram ao biotério onde foram mantidos individualmente, com água e ração *ad libitum*, sendo manipulados para verificação das cânulas guias e para limpeza das caixas de hospedagem a cada dois dias. Após o período de uma semana para recuperação da cirurgia, os procedimentos experimentais foram iniciados.



**Figura 3:** Aparelho estereotáxico.

### **4.3 Soluções e Doses Administradas.**

Utilizou-se agonista adrenérgico Adrenalina (AD) (Sigma) nas doses de 0,2, 2, 6, 20, e 60  $\eta$ mol, além de solução de NaCl 0,9% (VEH), estéril, pH 7,4, que foi utilizada como veículo para diluição das drogas. O volume injetado nos ventrículos foi de 1 $\mu$ l. As doses de AD foram estabelecidas com base em trabalhos prévios publicados por nosso grupo de pesquisa.

### **4.4 Grupos Experimentais.**

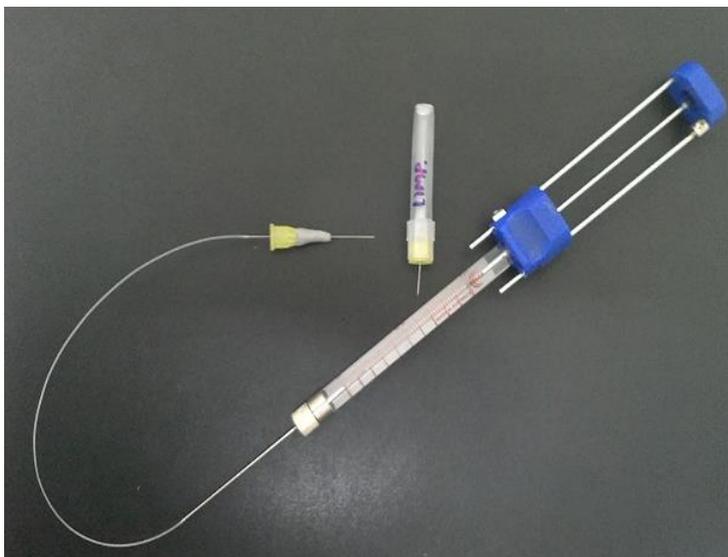
Os procedimentos experimentais foram separados em dois momentos:

- I. Realizou-se uma curva dose/resposta após a administração de AD ICV, utilizando as doses de 0,2, 2, 6 e 20 nmol para VL e as doses de 6, 20 e 60 nmol para 4V, analisando os comportamentos ingestivos e não ingestivos.
- II. Após a análise da curva dose/resposta, verificou-se a dose mais efetiva de AD sobre os comportamentos alimentares. Esta foi utilizada em novos grupos experimentais em que se realizou imunistoquímica reativa para Fos e 5-HT no NMR e NDR e apenas para Fos nos núcleos hipotalâmicos.

### **4.5 Injeções das Drogas.**

Os animais do grupo controle receberam injeção de VEH e os grupos experimentais receberam injeção de AD. Cada animal recebeu apenas uma injeção. A injeção de AD ou veículo foi feita através de agulha injetora confeccionada a partir de uma agulha gengival odontológica, 30G (Injex, Indústrias Cirúrgicas LTDA; Brasil), com as seguintes dimensões: 0,3 mm de diâmetro e 20 mm de comprimento para 4<sup>o</sup> ventrículo e 17mm de comprimento para ventrículo lateral. O comprimento da agulha injetora excede o da cânula guia em dois mm para que o bisel da agulha ultrapasse completamente a cânula. A agulha injetora é introduzida na guia e conectada por um tubo de polietileno (PE 10) a uma microseringa SGE® de 1 $\mu$ L (demonstrado na figura 4). As soluções foram administradas no decorrer de 1 minuto. Em seguida, espera-se o mesmo período de tempo com a agulha injetora ainda dentro

da cânula guia, para que assim tenha-se uma melhor difusão da solução. O volume injetado,  $1\mu\text{L}$ , foi sempre o mesmo nos animais despertos.

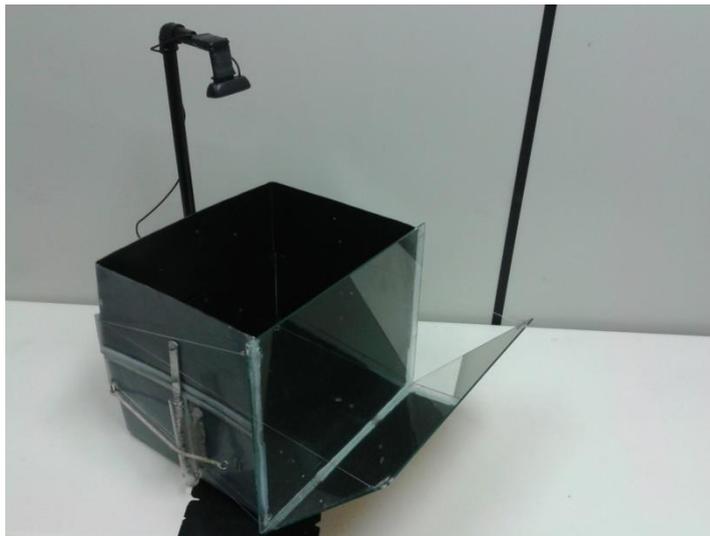


**Figura 4:** Sistema de injeção das drogas.

#### 4.6 Caixa de Registro Comportamental.

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

através de uma webcam posicionada sobre a caixa experimental. A caixa experimental esta mostrada na figura 5.



**Figura 5:** Caixa experimental.

#### **4.7 Procedimentos Experimentais.**

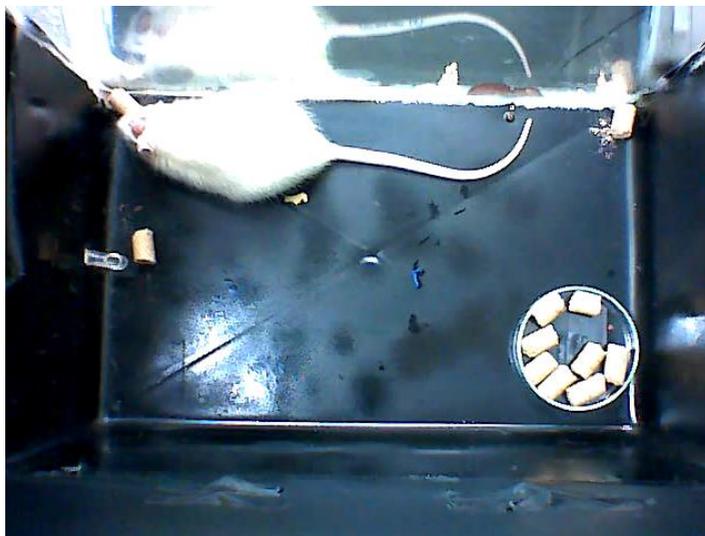
No dia do experimento o animal foi retirado da sua caixa de hospedagem e tratado com uma injeção de veículo (solução NaCl 0,9%) ou AD. Imediatamente após a microinjeção, o animal foi colocado na caixa de registro experimental onde estava depositada ração granulada em uma placa de petri e água em um bebedouro. Em seguida, o registro digital da sessão (30 minutos) foi iniciado, como demonstrado na figura 6. Ao término da sessão, a ração restante na caixa experimental foi recolhida e pesada, sendo o consumo de alimento avaliado pela diferença entre a quantidade de ração inicial e final. O animal foi ambientado no período de dois dias antecedentes a data de experimento. A ambientação consiste na simulação de todos os eventos que serão feitos no dia de experimento. Posteriormente os vídeos foram analisados

em um computador e as categorias comportamentais registradas através do programa Etholog 2.2 (Otoni, 2000). As categorias comportamentais analisadas foram as previamente descritas por Halford et al., 1998.

As categorias são:

- Ingestão de alimento: Quando o animal se aproxima do comedouro e ingere alimento sólido;
- Ingestão de água: quando o animal se aproxima do bico do bebedouro e lambe a sua ponta;
- Exploração vertical: exploração do ambiente apoiado somente nas patas traseiras (ereto);
- Autolimpeza: comportamentos típicos de autolimpeza como: limpar a cabeça com as patas, limpar as unhas, coçar o corpo ou genitais, morder a cauda;
- Locomoção: qualquer deslocamento pela caixa, sem apresentar outro comportamento citado;
- Imobilidade: o animal permanece imóvel, sem apresentar outros comportamentos;
- Exploração do alimento: quando o animal cheira ou manipula a ração, sem ingeri-la;
- Exploração não locomotora: quando o animal estiver explorando o ambiente com a cabeça, seja cheirando o ar ou o chão, sem tirar as patas traseiras do local onde se encontra.

As variáveis analisadas para os comportamentos de ingestão alimentar ou ingestão hídrica foram a quantidade de alimento ou água ingerida, a latência para iniciar o comportamento (em segundos), a frequência (número de episódios que o animal exibe tal comportamento ao longo dos 30 minutos de experimento) e a duração total da execução do comportamento (em segundos) no decorrer dos 30 minutos de gravação. Para o restante dos comportamentos foram analisadas apenas a frequência e a duração.



**Figura 6:** Registro digital da sessão.

#### **4.8 Análise Histológica.**

Para a curva dose/resposta, ao final de cada experimento os animais foram anestesiados com uretana e em seguida realizou-se a perfusão transcardíaca com solução salina (0,9%) e formalina (10%). Logo após a perfusão foi injetado 1  $\mu$ l de azul de Evans (10%), utilizando o mesmo sistema das injeções das drogas, para verificação da correta posição das cânulas guias nas regiões desejadas. Os cérebros foram removidos do crânio do animal e observou-se macroscopicamente a marcação com o azul de Evans a posição da cânula no ventrículo lateral ou 4º ventrículo.

No caso dos animais que foram utilizados para as reações imunoistoquímicas, a verificação do correto posicionamento da cânula foi feito no momento da cirurgia estereotáxica, através do deslocamento da coluna líquida (soro fisiológico estéril) e através da análise histológica dos cortes dos cérebros, podendo-se visualizar a posição da cânula dentro do VL ou 4V. Somente dados de animais com as cânulas corretamente posicionadas foram incluídos neste estudo.

#### 4.9 Imunoistoquímica.

Para a realização da imunoistoquímica, no período de 90 a 120 minutos após a injeção das drogas ou controle (contando com os 30 minutos de gravação do registros comportamentais), os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina/cloridrato de cetamina (13 mg/Kg de xilazina; 87 mg/Kg de cloridrato de cetamina) injetada por via intraperitoneal e perfundidos transcárdialmente com uma solução salina (0,9%) seguido por paraformaldeído (PFA 4%, pH 9,5 a 4 °C, 750 ml) por 25 minutos. Os cérebros foram removidos do crânio do animal, pós-fixados durante 2 horas em PFA (4%) e transferidos para uma solução crioprotetora tampão salina fostato (PBS, pH 7,2, 0,1 M) contendo 20% de sacarose por 12 horas. Os cérebros foram cortados em um micrótomo por congelamento em fatias de 40 µm no plano transversal, coletando quatro séries alternadas e armazenado-as em solução anti-freeze à temperatura de -20°C, até serem realizadas as reações imunoistoquímicas.

Todos os passos de lavagens e incubações a seguir foram feitos sob agitação suave. Para imunoistoquímica para proteína Fos, os cortes foram lavados em uma solução de 0,02M de tampão salina fostato potássio (KPBS, pH 7,4) durante 30 minutos, em seis trocas para completa remoção da solução anti-congelante. Em seguida, os cortes foram incluídos em uma solução de Triton X-100 (0,3%; Sigma Chemical, St. Louis, MO) em KPBS (0,02M, pH 7,4) que é denominado KPBS-T, contendo também 0,3% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Nesta solução os cortes foram incubados durante 30 minutos para inibir a atividade da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados novamente em KPBS (0,02M, pH 7,4) até que todas as bolhas da reação anterior sumissem e ficaram incubados durante 60 minutos em KPBS-T contendo 3% de soro normal de burro, para bloquear ligações não específicas. Imediatamente após, os cortes foram incubados overnight em anticorpo primário anti-Fos (1:20000; Calbiochem, EMD Chemicals Inc., San Diego, USA) feito em coelho contendo KPBS-T com azida e soro normal de burro a 3%, em temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados durante 30 minutos em seis trocas com solução de KPBS (0,02M, pH 7,4). Incubou-se os cortes durante 60 minutos com uma solução contendo anticorpo secundário biotilado anti-coelho, feito em burro (1:1000; Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) em KPBS-T, seguido de novas lavagens durante 30 minutos em 3 trocas com KPBS (0,02M,

pH 7,4). Então, os cortes foram incubados durante 60 minutos com o complexo ABC (complexo avidina-biotina) (1:5000; Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) em KPBS (0,02M, pH 7,4), que foi preparado com no mínimo 60 minutos de antecedência. Lavou-se as secções durante 20 minutos em duas trocas com KPBS (0,02M, pH 7,4). Em seguida, os cortes foram submetidos a uma rápida reação (2 a 3 minutos) com DAB (tetrahydro cloridrato diaminobenzidina; Sigma) contendo tampão acetado 0,1M, solução de sulfato de níquel (0,5%) e  $H_2O_2$  (0,001%). O DAB/sulfato de níquel funciona como um cromógeno, corando de marrom escuro o núcleo da célula Fos +. Para terminar a reação, lavou-se as secções em tampão acetado 0,1M durante 10 minutos e em KBPS (0,02M, pH 7,4) durante 30 minutos em 3 trocas.

Para dupla marcação com 5-HT, os cortes foram incubados durante 15 minutos em KPBS-T contendo  $H_2O_2$  (0,3%) e em seguida lavados em KPBS (0,02M, pH 7,4) até que todas as bolhas da reação anterior sumissem. Incubou-se durante 60 minutos em KPBS-T contendo 3% de soro normal de burro, para bloquear ligações não específicas. Em seguida, os cortes foram incubados overnight em anticorpo primário anti-5-HT (1:10000; Immunostar) feito em coelho contendo KPBS-T com azida e soro normal de burro a 3% a temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados durante 30 minutos em seis trocas com solução de KPBS (0,02M, pH 7,4). Incubou-se os cortes durante 60 minutos com uma solução contendo anticorpo secundário biotilado anti-coelho feito em burro (1:1000; Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) em KPBS-T, seguido de novas lavagens durante 30 minutos em 3 trocas com KPBS (0,02M, pH 7,4). Os cortes foram incubados durante 60 minutos com o complexo ABC (1:5000; Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) em KPBS (0,02M, pH 7,4). Lavou-se as secções durante 20 minutos em duas trocas com KPBS (0,02M, pH 7,4) e em seguida, os cortes foram submetidos à reação com DAB contendo KPBS e  $H_2O_2$  (0,3%), sem a adição de níquel, resultando em uma coloração marrom-clara do citoplasma de células contendo 5-HT. A reação foi interrompida como descrita anteriormente.

Após os procedimentos imunoistoquímicos, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, secas ao ar livre por 24 horas e então desidratadas em uma série graduada de alcoóis e xilóis antes de serem cobertas por lamínula com DPX (Sigma Chemical, St. Louis, MO).

#### **4.10 Contagem de células.**

As secções foram inicialmente analisadas em microscópio óptico (Olympus Bx41) com uma câmara acoplada (Q-imaging Olympus) para identificação de células marcadas para Fos (Fos +), marcadas para 5-HT (5-HT +) ou marcação dupla (Fos +/5-HT +). De acordo com a análise preliminar, três cortes representativos dos núcleos analisados de cada animal foram selecionados para as contagens. Fotomicrografias digitais foram feitas das secções representativas utilizando o software de captura de imagens Q-capture Pro 5.1 e todos os tipos de marcação celular foram quantificados com o software Image J 1.46r. Foram quantificados o número de células Fos +, 5-HT +, Fos +/5-HT + nos núcleos NDR e NMR na região do tronco encefálico em secções aos níveis: Bregma - 7,68 mm a Bregma - 8,04 mm. Nos núcleos hipotalâmicos NPV, HVM, ARC e AHL foram quantificados o número de células Fos+ em secções aos níveis: Bregma - 1,32 mm a Bregma - 1,92 mm para NPV e AHL, Bregma -2,04 a Bregma - 3,00 mm para HVM e Bregma -1,92 a - 3,60 para ARC. Nos núcleos hipotalâmicos foram quantificados apenas um dos lados de cada núcleo, visto que todos eles apresentam duas porções iguais divididas medialmente pelo terceiro ventrículo. Os núcleos quantificados foram identificados, nomeados e tiveram seus limites estabelecidos de acordo com o atlas de encéfalo de rato Paxinos e Watson (2007). Para marcação Fos + foram consideradas apenas as células em que o núcleo celular foi facilmente visualizado. Os neurônios que exibiram corpos celulares marrom-claro foram considerados 5-HT + e aqueles exibindo núcleos com uma coloração marrom-escuro cercada por um corpo celular marrom-claro foram considerados duplamente marcados para Fos +/ 5-HT +.

#### **4.11 Análise estatística**

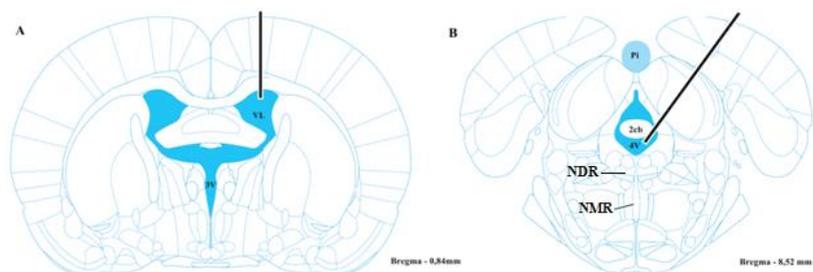
Os dados obtidos referentes aos comportamentos ingestivos e não ingestivos da curva dose/resposta foram analisados por intermédio de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de post hoc de Duncan. Para os grupos em que se realizou imunistoquímica, os dados obtidos referentes aos comportamentos ingestivos e não ingestivos foram analisados através do Teste T de Student. O número de células marcadas por núcleo de células Fos +, 5-HT + e Fos +/5-HT + foi analisado separadamente, primeiramente pelo teste de normalidade de

Kolmogorov-Smirnov. Depois de verificada a normalidade, utilizou-se o Teste T de Student para comparações entre grupos. Correlações entre comportamentos ingestivos e os diferentes índices de marcação celular foram realizadas através do coeficiente de correlação paramétrico de Pearson. Em todas as análises estatísticas foram aceitos apenas os valores de  $p < 0,05$  como sendo estatisticamente significativos. Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do software Statistica 8.0 (Statsoft).



## 5 RESULTADOS.

A figura 7 representa desenhos esquemáticos modificados de cortes coronais do atlas Paxinos e Watson (2007) que demonstram o correto posicionamento da cânula guia no sistema ventricular.



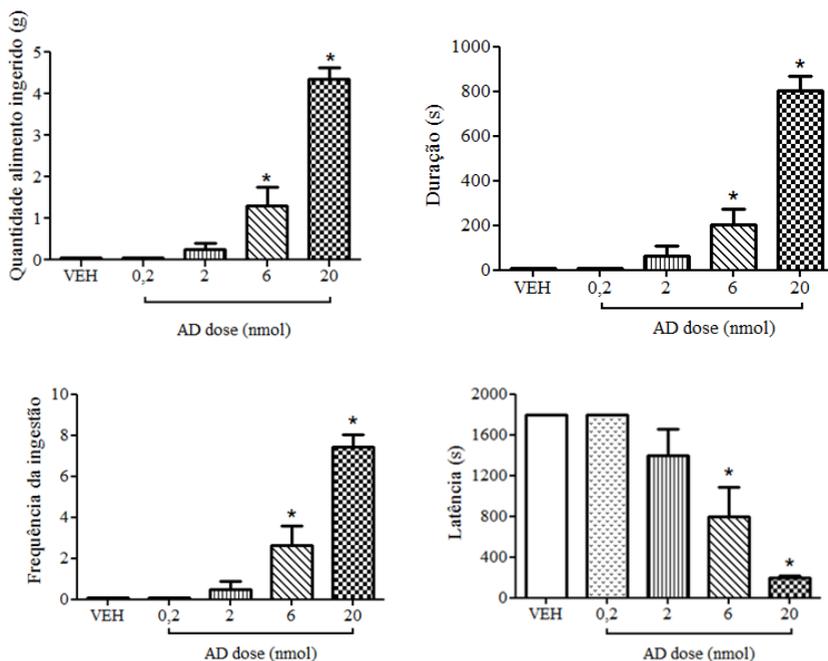
**Figura 7:** A) Desenho esquemático demonstrando o correto posicionamento da cânula guia no VL. B) Desenho esquemático demonstrando o correto posicionamento da cânula guia no 4V. A barra de cor preta representa a localização da cânula guia. Para abreviações consultar lista de abreviaturas (Adaptado de Paxinos e Watson, 2007).

### 5.1 Efeitos da AD injetada no VL sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos obtidos nos experimentos referentes a construção da curva dose/resposta.

#### 5.1.1 Efeitos sobre a Quantidade, Latência, Duração e Frequência da ingestão de alimento.

A análise através do teste de ANOVA revelou que a quantidade de alimento ingerido [ $F(4, 34) = 55,33, p = 0,0000$ ], a frequência dos episódios de ingestão de alimento [ $F(4, 34) = 32,77, p = 0,0000$ ], a duração [ $F(4, 34) = 11,97, p = 0,0000$ ] e a latência para iniciar o consumo [ $F(4, 34) = 45,59, p = 0,0000$ ] em ratos saciados, foram alteradas pelo tratamento com AD no VL. A quantidade de alimento

ingerido aumentou após a administração das doses de 6 e 20nmol em comparação com o grupo controle, assim como a frequência e a duração da ingestão de alimento (Figura 1). A latência para iniciar o consumo diminuiu após a administração das doses de 6 e 20 nmol em comparação ao grupo controle (Figura 1). As demais doses de AD não alteraram os comportamentos ingestivos. Não ocorreu ingestão de água nos animais tratados com AD ou veículo.



**Figura 8:** Alterações na quantidade, frequência, duração e latência da ingestão de alimento, após o tratamento com salina (VEH, n = 8) ou AD nas doses de 0,2 nmol (n = 8), 2 nmol (n = 8), 6 nmol (n = 8) e 20 nmol (n = 7) no VL de ratos saciados. Os dados representam a média ± EPM \*p < 0,05. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan.

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

A administração de AD no VL modificou a duração e a frequência dos comportamentos de imobilidade, exploração do alimento e auto limpeza, como mostrado na tabela na tabela 3. Somente a dose de AD 20 nmol provocou uma diminuição na duração [ $F(4, 34) = 4,97, p = 0,0029$ ] e na frequência da imobilidade [ $F(4, 34) = 11,193, p = 0,0000$ ] em comparação ao grupo controle. O teste post-hoc de Duncan revelou que a duração [ $F(4, 34) = 16,92, p = 0,0000$ ] e a frequência [ $F(4, 34) = 18,78, p = 0,0000$ ] da exploração do alimento sofreram um aumento com as doses de AD 6 e 20 nmol, não sendo observada o mesmo aumento nas outras doses. A auto limpeza teve sua duração reduzida [ $F(4, 34) = 6,1807, p = 0,0008$ ] após administração das doses de AD 6 e 20nmol, bem como sua frequência [ $F(4, 34)=3,58, p = 0,0153$ ], porém esta última apenas com a dose de 20 nmol. Não houve modificações estatisticamente significantes nos demais comportamentos.

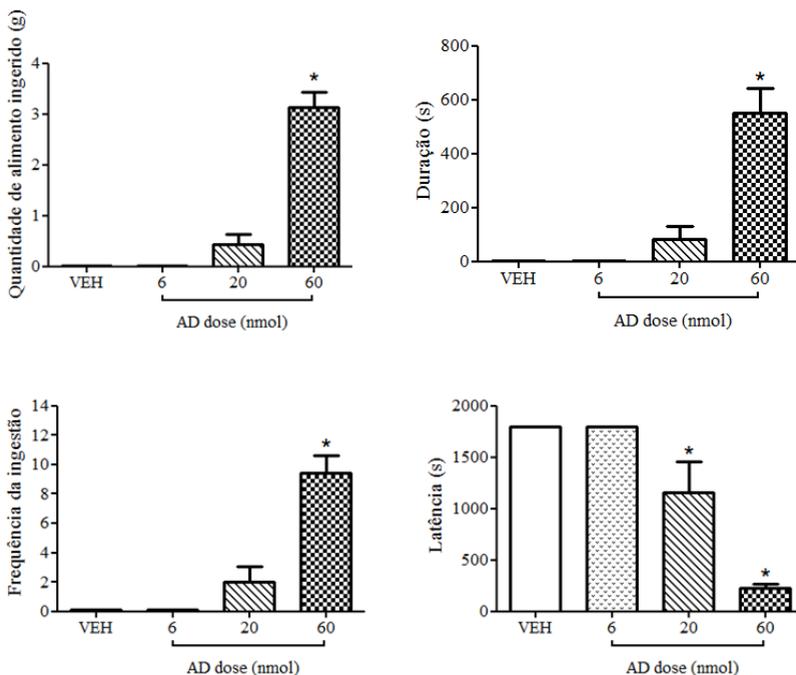
**Tabela 1:** Efeitos de AD no VL sobre a duração e frequência dos comportamentos não ingestivos de ratos saciados durante 30 minutos de registro após administração de veículo (0, n = 8), AD 0,2 nmol (n = 8), AD 2 nmol (n = 8), AD 6 nmol (n = 8) e 20 nmol (n = 7). Os dados representam a média  $\pm$  EPM \*p < 0,05. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan.

Comportamento	Dose (nmol)	Duração Total (s)	Frequência (Episódios)
Locomoção	0	124 $\pm$ 17	30 $\pm$ 5
	0.2	165 $\pm$ 22	36 $\pm$ 5
	2	193 $\pm$ 38	31 $\pm$ 6
	6	166 $\pm$ 27	29 $\pm$ 5
	20	105 $\pm$ 11	20 $\pm$ 2
Exploração não Locomotora	0	477 $\pm$ 43	60 $\pm$ 4
	0.2	504 $\pm$ 36	59 $\pm$ 6
	2	547 $\pm$ 77	49 $\pm$ 6
	6	512 $\pm$ 50	48 $\pm$ 4
	20	368 $\pm$ 45	50 $\pm$ 5
Exploração Vertical	0	95 $\pm$ 25	17 $\pm$ 2
	0.2	153 $\pm$ 39	22 $\pm$ 5
	2	108 $\pm$ 39	25 $\pm$ 6
	6	152 $\pm$ 37	28 $\pm$ 5
	20	89 $\pm$ 24	19 $\pm$ 4
Exploração do Alimento	0	6 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1
	0.2	14 $\pm$ 5	3 $\pm$ 1
	2	25 $\pm$ 9	5 $\pm$ 1
	6	67 $\pm$ 10 *	7 $\pm$ 1 *
	20	125 $\pm$ 24 *	13 $\pm$ 1 *
Auto Limpeza	0	244 $\pm$ 60	12 $\pm$ 2
	0.2	328 $\pm$ 39	14 $\pm$ 2
	2	200 $\pm$ 58	11 $\pm$ 3
	6	92 $\pm$ 32 *	7 $\pm$ 2
	20	50 $\pm$ 15 *	4 $\pm$ 1 *
Imobilidade	0	853 $\pm$ 65	25 $\pm$ 3
	0,2	606 $\pm$ 109	12 $\pm$ 2
	2	664 $\pm$ 151	12 $\pm$ 2
	6	608 $\pm$ 60	11 $\pm$ 1
	20	245 $\pm$ 39 *	6 $\pm$ 1 *

## **5.2 Efeitos da AD injetada no 4V sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos obtidos nos experimentos referentes a construção da curva dose/resposta.**

### **5.2.1 Efeitos sobre a Quantidade, Latência, Duração e Frequência da ingestão de alimento.**

A análise de variância demonstrou que a quantidade de alimento ingerido [ $F(3, 25) = 80,31, p = 0,0000$ ], a frequência dos episódios de ingestão de alimento [ $F(3, 25) = 34,52, p = 0,0000$ ], a duração [ $F(3, 25) = 27,612, p = 0,0000$ ] e a latência para iniciar o consumo em ratos saciados [ $F(3, 25) = 24,80, p = 0,0000$ ] foram alteradas pelo tratamento com AD no 4V. A quantidade de alimento ingerido aumentou apenas após a administração da dose de 60 nmol de AD em comparação com o grupo controle, assim como a frequência e a duração da ingestão de alimento (Figura 2). A latência para iniciar o consumo diminuiu após a administração das doses de 20 e 60nmol em comparação ao grupo controle (Figura 2). As demais doses de AD não apresentaram resultados estatisticamente significantes sobre os comportamentos ingestivos. Não houve ingestão de água nos animais tratados com AD ou veículo durante o período de observação (30 minutos de registro).



**Figura 9:** Alterações na quantidade, frequência, duração e latência da ingestão de alimento, após o tratamento com salina (VEH, n = 8) ou AD nas doses de 6 nmol (n = 7), 20 nmol (n = 7) e 60 nmol (n = 7) no 4V de ratos saciados. Os dados representam a média ± EPM \*p < 0,05. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan.

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

A análise estatística revelou que a administração de AD no 4V modificou a duração e a frequência dos comportamentos de exploração do alimento e auto limpeza, como mostrado na tabela na tabela 4. A imobilidade e locomoção tiveram apenas suas durações alteradas. Somente a dose de AD 60 nmol provocou uma diminuição na duração da imobilidade [F (3, 25) = 13,92, p = 0,0000] em comparação ao grupo controle (tabela 2). A duração [F (3, 25) = 18,58, p = 0,0000] e a frequência [F (3, 25) = 13,23, p = 0,0002] da exploração do alimento

sofreram um aumento com a dose de AD 60 nmol, não sendo observado o mesmo aumento nas outras doses. A auto limpeza teve sua duração [F (3, 25) = 8,21, p = 0,0006] e frequência [F (3, 25) = 17,45, p = 0,0000] reduzida após administração da dose de 60 nmol. Apenas a maior dose de AD (60 nmol) foi capaz aumentar a duração [F (3, 25) = 3,51, p = 0,0299] do comportamento locomoção. Não houve modificações estatisticamente significantes nos demais comportamentos.

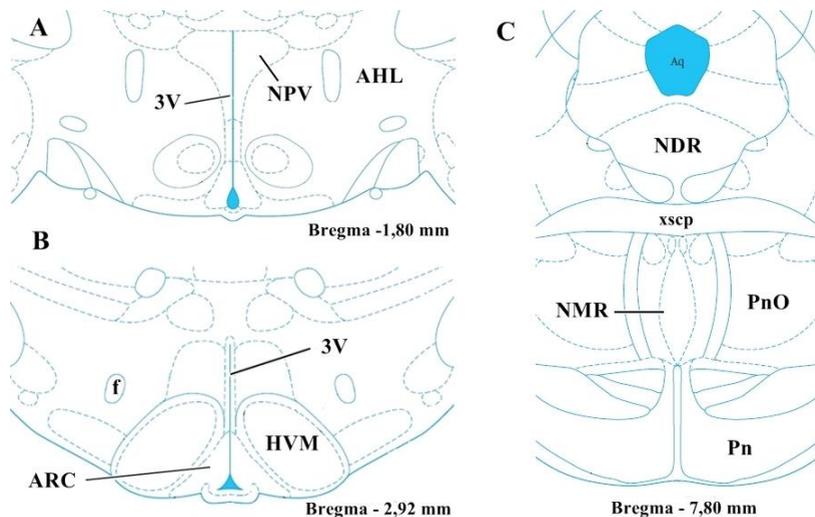
**Tabela 2:** Efeitos de AD no 4V sobre a duração e frequência dos comportamentos não ingestivos de ratos saciados durante 30 minutos de registro após administração de veículo (0, n = 8), AD 6 nmol (n = 7), 20 nmol (n = 7) e 60 nmol (n = 7). Os dados representam a média ± EPM \*p < 0,05. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan.

Comportamento	Dose (nmol)	Duração Total (s)	Frequência (Episódios)
Locomoção	0	163 ± 19	30 ± 4
	6	161 ± 47	25 ± 7
	20	202 ± 37	36 ± 6
	60	290 ± 44 *	46 ± 8
Exploração não Locomotora	0	442 ± 43	48 ± 4
	6	364 ± 19	33 ± 4
	20	526 ± 57	53 ± 3
	60	416 ± 30	48 ± 6
Exploração Vertical	0	99 ± 23	21 ± 4
	6	73 ± 40	16 ± 7
	20	119 ± 23	22 ± 4
	60	158 ± 27	26 ± 5
Exploração do Alimento	0	6 ± 3	2 ± 1
	6	31 ± 23	3 ± 2
	20	51 ± 16	5 ± 1
	60	158 ± 27 *	26 ± 5 *
Auto Limpeza	0	403 ± 50	16 ± 2
	6	179 ± 125	5 ± 3
	20	261 ± 82	11 ± 2
	60	15 ± 5 *	2 ± 1*
Imobilidade	0	668 ± 69	13 ± 2
	6	991 ± 189	12 ± 2
	20	558 ± 49	12 ± 2
	60	240 ± 38 *	7 ± 2 *

### 5.3 Efeitos da AD 20 nmol injetada no VL sobre a expressão da proteína Fos e sua co-localização com neurônios serotoninérgicos em ratos saciados.

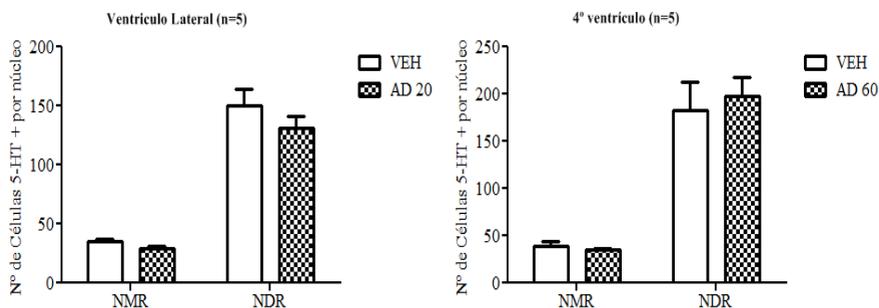
Depois de realizadas as curvas dose/resposta no VL, escolheu-se a dose de 20 nmol de AD (dose mais efetiva) e fizeram-se novos grupos experimentais, analisando os comportamentos ingestivos e não ingestivos na caixa de registro comportamental. Tais comportamentos foram muito semelhantes àqueles encontrados nos experimentos anteriores (dados não mostrados). Após a análise comportamental, realizaram-se as análises imunoistoquímicas para NMR, NDR e núcleos hipotalâmicos.

A figura 10 representa cortes coronais das áreas de contagem hipotalâmicas e do tronco encefálico, esquematizando suas localizações no cérebro do rato.



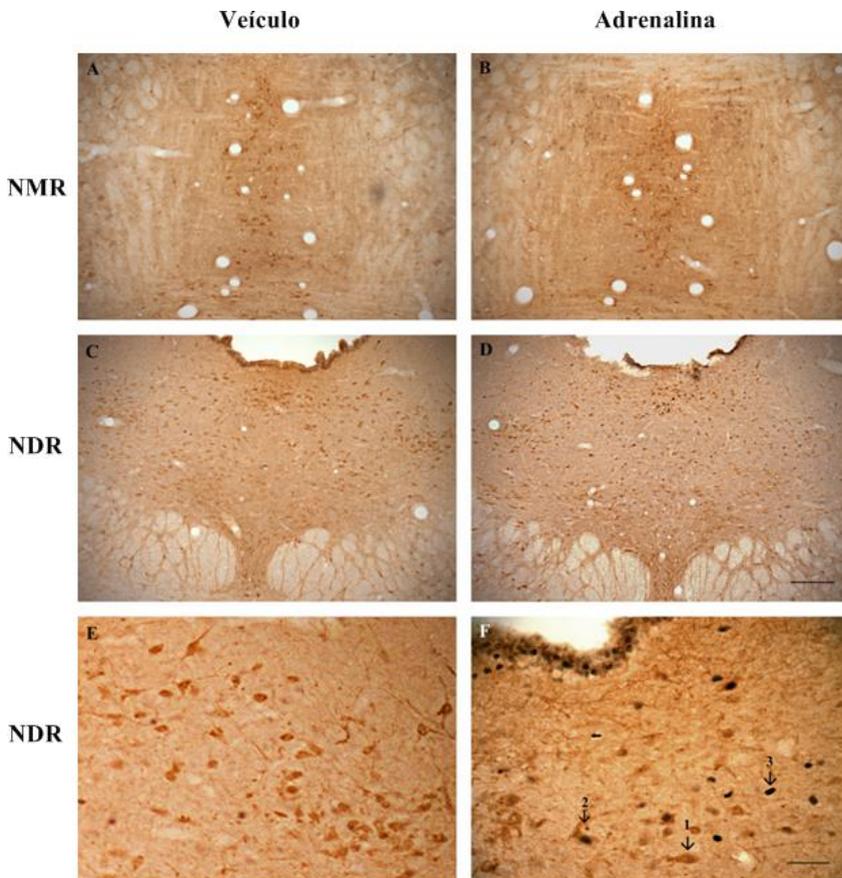
**Figura 10:** A) e B) Desenhos esquemáticos demonstrando as áreas de quantificação nos núcleos hipotalâmicos estudados. C) Desenho esquemático demonstrando as áreas de quantificação no NMR e NDR. Para abreviações consultar lista de abreviaturas (Paxinos e Watson, 2007).

A análise estatística através do Teste T de Student revelou que a quantidade média dos corpos celulares 5-HT + para NMR e NDR entre os diferentes grupos experimentais foi similar, sugerindo que a amostragem destas células foi estável tanto para os experimentos no VL quanto para 4V (Figura 11).

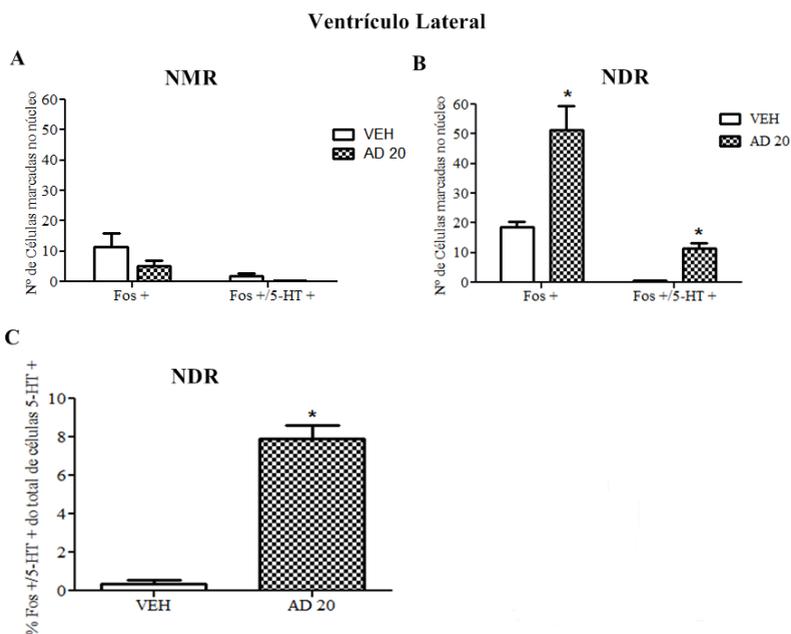


**Figura 11:** Gráficos da quantidade de células 5-HT + para NMR e NDR. A) Número de células 5-HT + no NMR e NDR após administração de AD 20 nmol no VL. B) Número de células 5-HT + no NMR e NDR após administração de AD 60 nmol no 4V. Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0,05$  ( $n = 5$  por grupo). Teste T de Student.

Por outro lado, o número de marcações Fos + e Fos +/5-HT + foram afetadas pelos diferentes tratamentos. O Teste T de Student indicou que no NMR não houve nenhuma alteração estatisticamente significativa na quantidade de células imunorreativas para Fos e células duplamente marcadas entre os grupos analisados (Figura 13A) e no NDR observa-se um maior número de células Fos + após a injeção de AD 20 nmol no VL em comparação ao grupo controle tendo como t calculado: 3,27;  $p = 0,0105$ . Além disso, o número de células Fos +/5-HT + no NDR também é maior em comparação ao grupo controle, tendo como t calculado: 5,37;  $p = 0,0011$  (Figura 13B). A porcentagem de células Fos +/5-HT + do total de células imunorreativas para 5-HT no NDR foi aproximadamente 8% (Figura 13C). Os testes de correlação de Pearson mostraram que no NDR houve correlação positiva da quantidade de células Fos + ( $r = 0,78$ ,  $p = 0,014$ ) e Fos +/5-HT + ( $r = 0,86$ ,  $p = 0,003$ ) com a quantidade de alimento ingerido nos animais tratados com AD 20 nmol ou veículo (Figura 16).

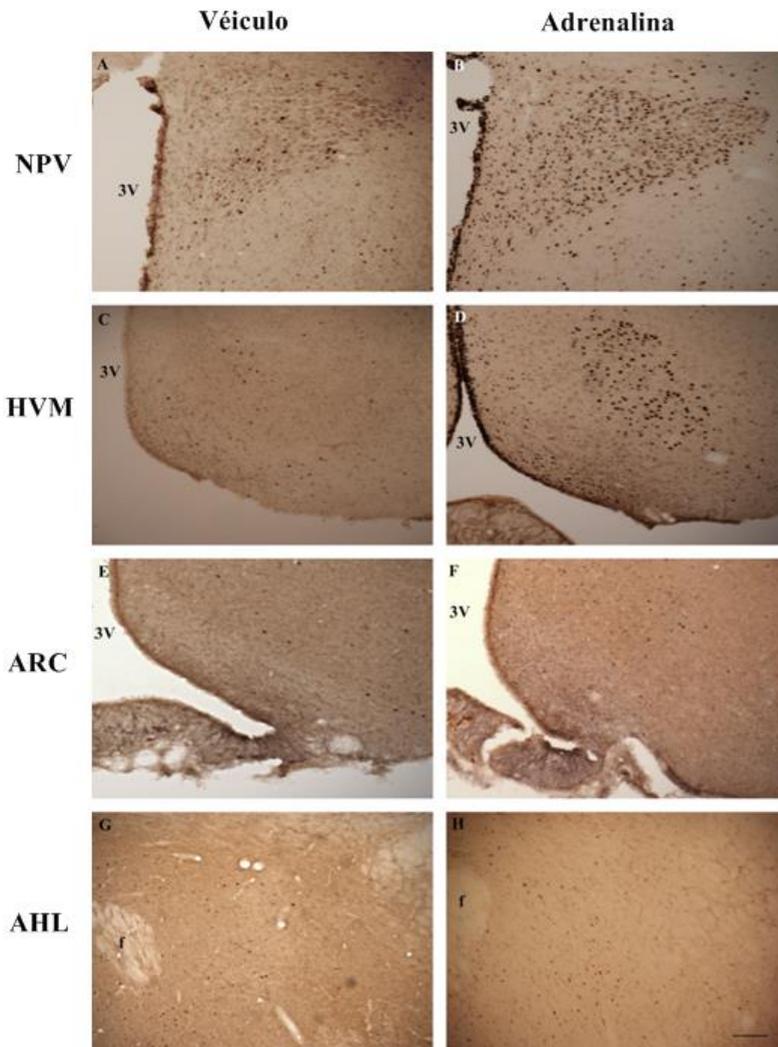


**Figura 12:** Fotomicrografias do NMR e NDR ilustrando as reações imunoistoquímicas para Fos e 5-HT após injeção de AD no VL. Na coluna da esquerda estão apresentados os resultados obtidos após a injeção do veículo e na direita os resultados obtidos após a injeção de AD 20 nmol. A – B) Células 5-HT + no NMR. Não houve expressão estatisticamente significativa de Fos ou de duplas marcações em ambos os grupos analisados. C – D) Expressão de Fos e duplas marcações no NDR. E - F) Fotomicrografias ilustrando células Fos +/5-HT + nos animais tratados com AD 20 nmol em comparação com o grupo controle no NDR. Células 5-HT + (seta nº 1), co-localização com Fos (seta nº 2) e célula Fos + (seta nº 3). Barra de escala = 200µm, com exceção de E-F = 50µm.

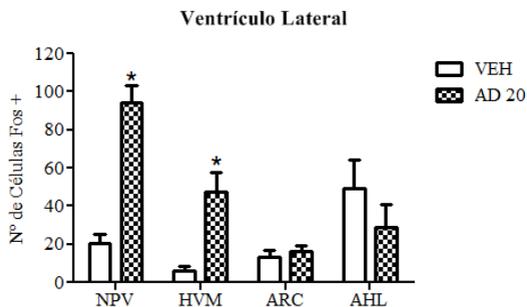


**Figura 13:** A) Número de células marcadas no NMR (n = 5 por grupo). B) Número de células marcadas no NDR (n = 5 por grupo). C) Gráfico mostrando a porcentagem de células duplamente marcadas do total de células 5-HT + no NDR. Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0,05$ . Teste T de Student. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.

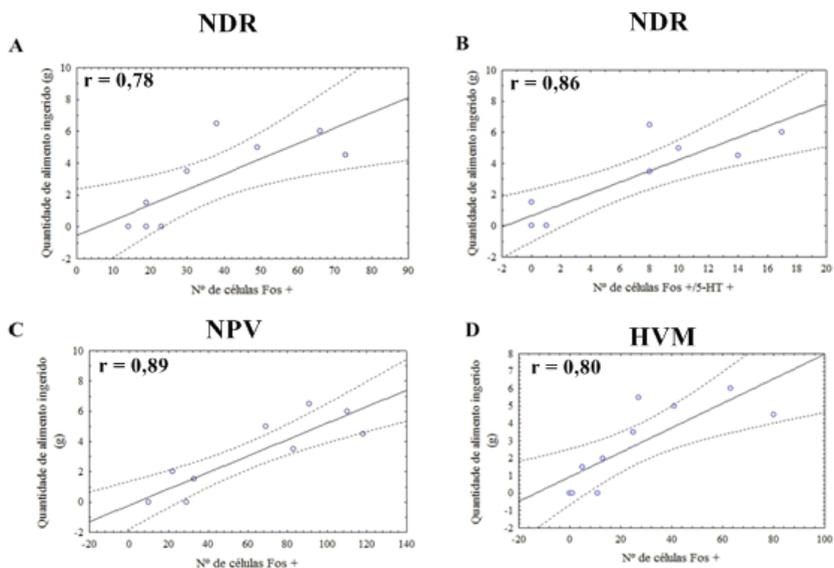
Com relação aos núcleos hipotalâmicos, a injeção de AD 20 nmol aumentou o número de células Fos + no NPV em comparação ao grupo controle tendo como t calculado: 7,27;  $p = 0,0001$ ; assim como o HVM também apresentou aumento nas células Fos + tendo como t calculado: 3,76;  $p = 0,0055$  (Figura 15). A AHL e o ARC não apresentaram modificações estatisticamente significantes na expressão de Fos nos grupos analisados. Os testes de correlação indicaram que no NPV a quantidade de células Fos + nos animais tratados com AD 20 nmol ou veículo foi positivamente correlacionada com a quantidade de alimento ingerido ( $r = 0,89$ ,  $p = 0,001$ ), sendo observada a mesma correlação positiva para o HVM ( $r = 0,80$ ,  $p = 0,006$ ) (Figura 16).



**Figura 14:** Fotomicrografias ilustrando a expressão de Fos em núcleos hipotalâmicos após a administração de AD 20 nmol no VL. Na coluna da esquerda estão apresentados os resultados obtidos após a injeção do veículo e na direita os resultados obtidos após a injeção de AD 20 nmol. A – B) Expressão de Fos no NPV. C – D) Expressão de Fos no. E – F) Expressão de Fos no ARC. F – G) Expressão de Fos na AHL. Barra de escala = 200µm. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.



**Figura 15:** Gráfico representando o número de células Fos + nos diferentes núcleos hipotalâmicos estudados ( $n = 3 - 5$  por grupo). Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0,05$ . Teste T de Student. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.

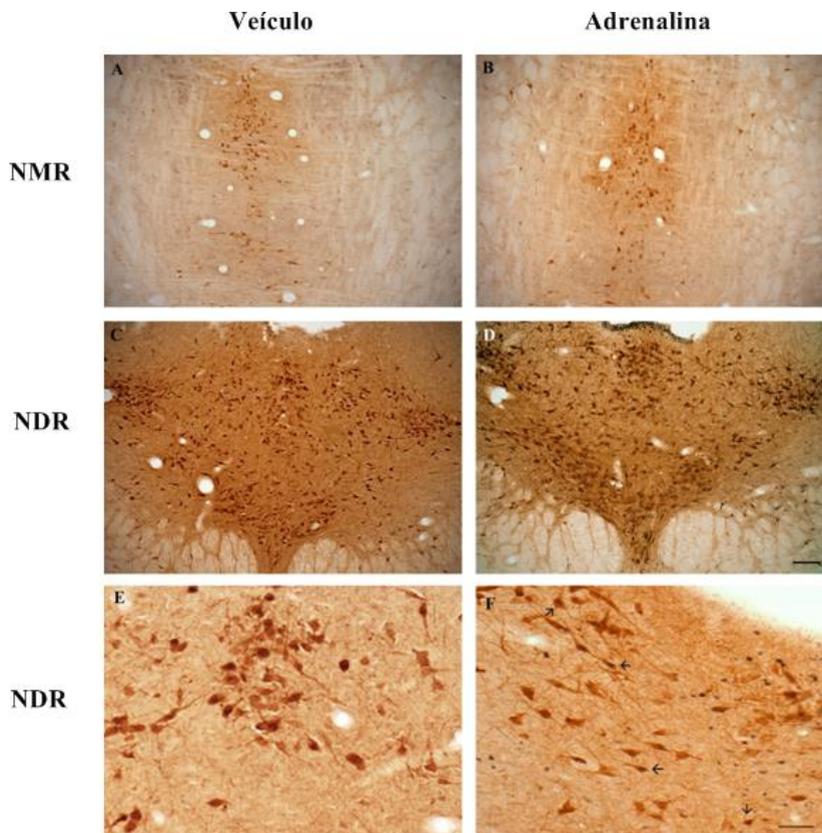


**Figura 16:** Gráficos de correlação entre o número de células marcadas em cada núcleo e a quantidade de alimento ingerido após administração de AD 20 nmol no VL. A) Número de células Fos + no NDR *versus* quantidade de alimento ingerido (g). B) Número de células Fos +/5-HT + no NDR *versus* quantidade de alimento ingerido (g). C) Número de células Fos + no NPV *versus* quantidade de alimento ingerido (g). D) Número de células Fos + no HVM *versus* quantidade de alimento ingerido (g). Teste de correlação de Pearson \* $p < 0,05$ .

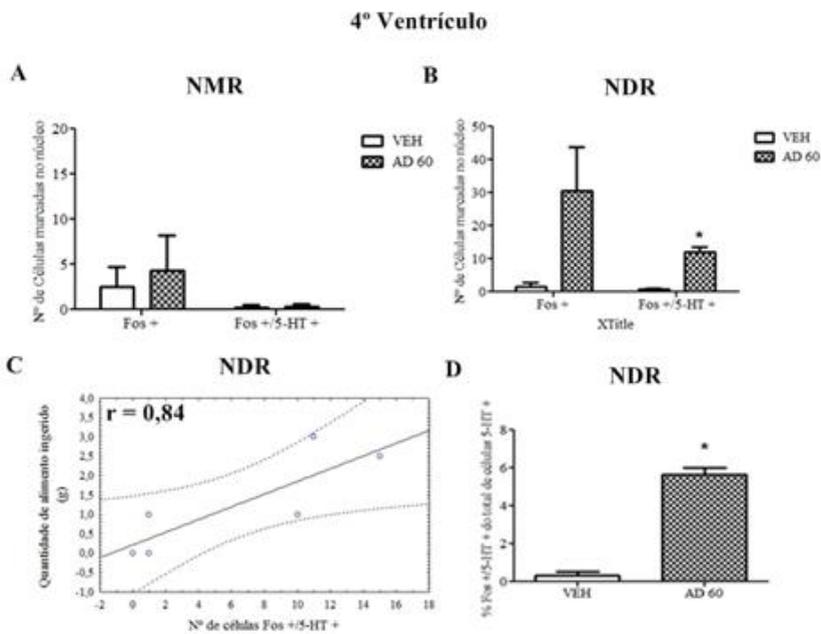
#### **5.4 Efeitos da AD 60 nmol injetada no 4V sobre a expressão da proteína Fos e sua co-localização com neurônios serotoninérgicos em ratos saciados.**

Após a realização das curvas dose/resposta no 4V, a dose de 60 nmol de AD (dose mais efetiva) foi utilizada para fazer novos grupos experimentais, analisando os comportamentos ingestivos e não ingestivos na caixa de registro comportamental. Tais comportamentos também foram muito semelhantes àqueles encontrados na curva dose/resposta (dados não mostrados). Após a análise comportamental, realizaram-se as análises imunoistoquímicas para NMR e NDR.

A análise através do Teste T de Student indicou que no NMR não houve nenhuma alteração estatisticamente significativa na quantidade de células Fos + e Fos +/5-HT + entre os grupos analisados (Figura 18). No entanto, no NDR houve aumento apenas no número de células duplamente marcadas para Fos e 5-HT após a administração de AD 60 nmol no 4V em comparação ao grupo controle tendo como t calculado: 7,25;  $p = 0,0019$ , não sendo observado nenhuma alteração estatisticamente significativa no número de células Fos + (Figura 18). A porcentagem de células duplamente marcadas para Fos e 5-HT do total de células 5-HT+ no NDR foi aproximadamente 6% (Figura 18). O teste de correlação mostrou que no NDR a quantidade de células Fos +/5-HT + em todos os grupos estudados foi positivamente correlacionada com a quantidade de alimento ingerido ( $r = 0,84$ ,  $p = 0,036$ ) (Figura 18).



**Figura 17:** Fotomicrografias do NMR e NDR ilustrando as reações imunoistoquímicas para Fos e 5-HT após injeção de AD no 4V. Na coluna da esquerda estão apresentados os resultados obtidos após a injeção do veículo e na direita os resultados obtidos após a injeção de AD 20 nmol. A – B) Células 5-HT + no NMR. Não houve expressão estatisticamente significativa de Fos ou de duplas marcações em ambos os grupos analisados. C – D) Expressão de Fos e células Fos +/5-HT + no NDR. E - F) Fotomicrografias ilustrando células Fos +/5-HT + (indicado pelas setas pretas) nos animais tratados com AD 60 nmol em comparação com o grupo controle no NDR. Barra de escala = 200µm, com exceção de E – F = 50µm.



**Figura 18:** A) Número de células marcadas no NMR (n = 3 por grupo). B) Número de células marcadas no NDR (n = 3 por grupo). Os dados representam a média  $\pm$  EPM \*p < 0,05. Teste T de Student. C) Gráfico de correlação entre número de células Fos +/-5-HT + no NDR *versus* quantidade de alimento ingerido (g) após administração de AD 60 nmol no 4V. Teste de correlação de Pearson \*p < 0,05. D) Gráfico mostrando a porcentagem de células duplamente marcadas do total de células 5-HT + no NDR após administração no 4V de AD. Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

## 6 DISCUSSÃO.

### 6.1 Injeções de AD no VL.

Os resultados do presente estudo indicaram que a administração de AD na dose 20 nmol no VL aumentou a ingestão de alimentos em ratos saciados. Os animais apresentaram hiperfagia, aumentando a duração, a frequência e diminuindo a latência para iniciar a resposta de ingestão alimentar em comparação com o grupo controle. Estes dados corroboram com estudos anteriores, em que a administração central de NA ou AD nos ventrículos cerebrais, ou diretamente em determinados núcleos hipotalâmicos, estimula fortemente a ingestão de alimentos em várias espécies de mamíferos em diferentes condições nutricionais (Booth, 1968, Antunes-Rodrigues e McCann, 1970; Leibowitz, 1978; Leibowitz et al., 1984; Levine et al., 1991).

Com relação às análises imunoistoquímicas, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão da proteína Fos e sua co-localização com neurônios serotoninérgicos no NMR entre os grupos experimentais analisados. O número de células duplamente marcadas foi baixo no grupo controle e AD, assim como as células marcadas somente para Fos.

Faz-se necessário ressaltar que existem algumas limitações para a expressão da proteína Fos, uma vez que nem todos os neurônios ativados a expressam e outros genes de expressão imediata como Jun, Fos-B,  $\Delta$ -FOS ou Krox podem ser expressos (Herdengen e Leah, 1998). Além disso, a transcrição de c-fos pode variar em diferentes neurônios, sendo que alguns podem expressar níveis baixos, não sendo detectáveis pela concentração de anticorpo primário utilizada (Zimmer et al., 1997).

Trabalhos anteriores de nosso laboratório mostraram que a injeção de AD no NMR em ratos saciados também aumentou a ingestão de alimentos (Santos et al., 2009). Em contrapartida, a administração de AD no NMR de ratos restritos diminuiu e encurtou a duração da ingestão (Maidel et al., 2002). Relacionamos que esta diferença de resultados em animais restritos e saciados seja devido à ativação de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos em neurônios serotoninérgicos no NMR

resultando em liberação de 5-HT e uma ação indireta inibitória da AD na ingestão de alimentos (Adell e Artigas, 1999).

O tratamento no NMR com fenilefrina (agonista  $\alpha$ -1) em ratos saciados não causou nenhuma alteração no comportamento ingestivo (Mansur et al., 2011), já o tratamento com clonidina (agonista  $\alpha$ -2) resulta em hiperfagia (Mansur et al., 2011). Estes efeitos foram atribuídos a um controle inibitório da liberação de 5-HT através de receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos (Adell e Artigas, 1999) presentes em terminais nervosos noradrenérgicos (Yoshioka et al., 1992; Haddjeri et al., 1996) que quando ativados, reduzem a liberação de noradrenalina na sinapse e seu efeito sobre receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos em neurônios serotoninérgicos (Gallagher e Aghajanian, 1976), resultando em uma diminuição na liberação de 5-HT. No que diz respeito à ausência de efeito no tratamento com fenilefrina, sugere-se que em animais saciados exista um elevado tônus adrenérgico sobre os neurônios serotoninérgicos do NMR (Adell e Artigas, 1999) e elevada influência inibitória sobre a ingestão de alimentos. Reforçando estas hipóteses, estudos já descreveram que o tônus serotoninérgico em ratos restritos é menor do que em ratos com livre acesso ao alimento (Happe et al., 2004; Kang et al., 2001; Kaye, 2008; Kelley et al., 2005). Em animais restritos, a administração de fenilefrina no NMR causou redução na quantidade de alimento ingerido e a administração de clonidina não afetou os comportamentos ingestivos do animal, confirmando a sugestão prévia e reforçando um possível papel da 5-HT como mediador dos efeitos ingestivos provocados pela ativação de receptores adrenérgicos (Ribas et al., 2012).

Com base nestes estudos, sugere-se que em ratos saciados haja uma ativação basal tônica dos neurônios serotoninérgicos. Em condições basais, ou em neurônios tonicamente ativos, a expressão de Fos é nula ou muito reduzida (Herrera e Robertson, 1996), porém é rapidamente induzida nos núcleos neuronais em resposta a estímulos eficazes (Herdegen and Leah, 1998; Hoffman and Lyo, 2002). Deste modo, esta pode ser uma provável causa para a baixa expressão de Fos nos animais controle, impossibilitando distinguir uma diferença de expressão de Fos ou duplas marcações nos animais tratados com AD. Não conseguimos confirmar nossa hipótese de que uma modificação na neurotransmissão adrenérgica em ratos saciados, diminuisse a expressão de Fos no NMR. Além disso, não obtivemos nenhuma evidência conclusiva de que os efeitos adrenérgicos sobre a ingestão de alimentos sejam mediados por

ativação de neurônios serotonérgicos neste núcleo e consequentes mudanças na liberação de 5-HT. Como sugestão, um estudo da expressão de Fos e sua co-localização com neurônios serotonérgicos com animais em regime restrito de alimento seria interessante, já que neste caso o nível de atividade basal neuronal serotonérgica possivelmente estaria baixa ou ausente.

O NDR apresentou aumento na expressão de Fos e duplas marcações após administração de AD em comparação ao grupo controle. O número de células Fos +/5-HT + foi correlacionado positivamente com a quantidade de alimento ingerido para cada animal analisado, sendo esta mesma correlação positiva para as células imunorreativas para Fos.

O NDR recebe aferências noradrenérgicas originárias do LC (Baraban e Aghajanian, 1981; Peyron et al., 1996) e também possui receptores  $\alpha$ -1 (Day et al., 1997) e autorreceptores  $\alpha$ -2 (Unnerstall et al., 1985; Rosin et al., 1993; Talley et al., 1996). Estudos eletrofisiológicos demonstram que a ativação de receptores  $\alpha$ -1 aumenta a taxa de disparo de neurônios serotonérgicos no NDR (Baraban e Aghajanian, 1980; Marwaha e Aghajanian, 1982; Vandermaelen e Aghajanian, 1983) sendo que a ativação de receptores  $\alpha$ -2 diminui a taxa de disparos (Svensson et al., 1975; Garratt et al., 1991; Haddjeri et al., 1996). Além disso, antagonistas  $\alpha$ -1 diminuem a liberação de 5-HT nas áreas de projeção (Rouquier et al., 1994; Hjorth et al., 1995) enquanto que agonistas  $\alpha$ -2 inibem a síntese, metabolismo e liberação de 5-HT no NDR (Clement et al., 1992; Yoshioka et al., 1992). Com base nestes estudos, não se descarta a hipótese de que os efeitos hiperfágicos causados pela administração de AD no VL possam ser desencadeados por uma possível participação do NDR. Sua localização anatômica no tronco encefálico ventralmente ao aqueduto favorece ainda mais esta hipótese.

A porcentagem de duplas marcações no NDR do total de células imunorreativas para 5-HT foi de 8%. Estudos encontraram um baixo número de células duplamente marcadas em condições basais, e até mesmo com um agente estressor, como um choque inevitável na cauda ou diálise peritoneal, foi capaz de ativar apenas 7% da população estimada de neurônios serotonérgicos do NDR (Franchini et al., 2002; Takase et al., 2004). A pouca quantidade de neurônios serotonérgicos que são ativados não reflete necessariamente sua capacidade em ser responsivo, visto que um único neurônio serotonérgico projeta fibras para várias estruturas, em que a variedade e quantidade de terminações

nervosas constituem um substrato para ação modulatória (Takase e Nogueira, 2008). Ainda não existem estudos sobre uma possível influência adrenérgica em neurônios serotonérgicos do NDR sobre a ingestão de alimentos, porém o aumento nas duplas marcações sugere que possa haver interações entre estes dois sistemas neurais, podendo influenciar o comportamento alimentar.

Nos núcleos da rafe, neurônios serotonérgicos são apenas uma das várias populações de células neuroquímicas observadas. Apesar de um número substancial de neurônios no NDR e NMR conter serotonina, a maioria das células em ambos os núcleos são não-serotonérgicas (Leger e Wiklund, 1982; Vertes e Crane, 1997; Adell et al, 2002). Um número grande de outros neurotransmissores, tais como GABA, dopamina e glutamato estão igualmente presentes nestes núcleos (Adell et al., 2002; Jacobs e Azmitia, 1992; Commons et al, 2003; Day et al, 2004). Desta forma, o aumento do número de células Fos + no NDR pode ser explicado devido a ativação de outras células não-serotonérgicas, que podem ou não estar influenciando a ingestão alimentar no animal.

No entanto, os resultados da curva dose/resposta demonstraram que a dose de 20 nmol de AD injetada no 4V não foi capaz de reproduzir os mesmos efeitos hiperfágicos encontrados nas injeções no VL. Este resultado compromete a possibilidade de que os efeitos sobre a ingestão de alimentos sejam desencadeados por uma atuação direta da AD sobre o NDR. Partindo deste pressuposto, surge uma outra hipótese de que os efeitos observados sobre a expressão de Fos e duplas marcações sejam em decorrência das alterações causadas nos núcleos hipotalâmicos após a injeção de AD, pois o NDR recebe aferências neuronais diretas provenientes do NPV e HVM (Vertes e Linley, 2008).

As análises imunoistoquímicas revelaram um aumento na expressão de Fos nos núcleos hipotalâmicos após injeções de AD no VL. Houve um aumento significativo na expressão de Fos no NPV nos animais tratados com AD em comparação ao grupo controle, bem como no HVM. Em ambos os núcleos foram encontradas correlações positivas com a quantidade de células imunorreativas para Fos e a quantidade de alimento ingerido (g) para cada animal analisado. O número de células Fos + na AHL não apresentou diferenças estatisticamente significantes, apresentando uma baixa distribuição entre os animais tratados com AD ou veículo. O ARC também não apresentou modificações

estatisticamente significantes sobre a quantidade de células imunorreativas para Fos entre os grupos analisados.

Em 1962, Grossman descobriu que a injeção de NA no hipotálamo pode estimular a ingestão de alimentos em ratos saciados. Estudos documentaram a presença de receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos no NPV (Young e Kuhar, 1980; Leibowitz et al., 1982) e o efeito estimulante da NA na alimentação tem sido associada à ativação destes receptores. Injeções no NPV de agonistas  $\alpha$ -2 (NA e clonidina) estimulam a ingestão de alimentos em ratos saciados (Leibowitz, 1988), porém em ratos pré-tratados com um antagonista  $\alpha$ -2 (ioimbina), tal efeito não é observado (Goldman et al., 1985). Além disso, estudos das respostas eletrofisiológicas de células no NPV indicaram que a injeção de NA resulta em inibição celular, sendo este resultado reforçado pela administração de clonidina, produzindo o mesmo efeito (Inenaga et al., 1986). Estes resultados demonstram que a NA pode induzir potenciais pós-sinápticos inibitórios em certas células do NPV e sugerem que este efeito pode resultar na inibição de neurônios que geram sinais de saciedade, o que por sua vez leva a uma ação estimulatória sobre a alimentação (Wellman, 2000).

No entanto, a NA também se liga a receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1 localizados no NPV (Young e Kuhar, 1980). Tecidos que contêm ambos os subtipos  $\alpha$ -adrenérgicos podem mostrar uma organização antagonica em que a ativação de um subtipo resulta em um determinado efeito fisiológico, enquanto que a ativação do outro subtipo resulta em um efeito oposto do primeiro (Wellman et al., 1993). Agonistas de receptores  $\alpha$ -1, quando injetados no NPV, reduzem a ingestão de alimento em ratos (Wellman et al., 1993). Em resumo, estes estudos sugerem que os receptores adrenérgicos, localizados em neurônios noradrenérgicos dentro do NPV podem ser organizados antagonicamente, de modo que a ativação de receptores  $\alpha$ -1 ativa neurônios inibitórios sobre o comportamento alimentar, resultando na supressão da ingestão de alimentos, enquanto que a ativação de receptores  $\alpha$ -2 aumenta a ingestão alimentar por inibição destes neurônios (Wellman et al., 1993).

A demonstração de que os terminais nervosos do NPV contêm feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT), a enzima conversora de AD, levou à hipótese de que esta catecolamina possa ter efeitos semelhantes aos da NA (Hokfelt et al., 1974; Hokfelt et al., 1988). Além disso, a injeção de AD no NPV de ratos saciados aumentou

significativamente a ingestão de alimento (Leibowitz et al., 1988). Assim como o NPV, o HVM também possui receptores  $\alpha$  adrenérgicos (Leibowitz, 1970) e injeções de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, como a AD, no HVM mostraram serem capazes de aumentar a ingestão alimentar em ratos (Leibowitz, 1970; Leibowitz, 1970).

Com base nestes estudos, os efeitos observados sobre a ingestão alimentar nos animais submetidos ao tratamento com AD no VL podem ser devidos a uma participação do NPV e HVM, muito provavelmente através de ativação de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. A presença de Fos indicando atividade neuronal nestes núcleos, suas posições anatômicas próximas ao 3º ventrículo e o aumento no comportamento ingestivo são fatores que reforçam ainda mais essa sugestão.

Existem duas categorias de sinais que contribuem para o controle do tamanho da refeição, denominados controles diretos e controles indiretos (Smith, 1996; Smith, 2000). Os controles diretos fazem referência aos sinais de saciedade que incluem sinais sensoriais decorrentes dos alimentos ingeridos que passam pelo trato gastrointestinal, como a distensão estomacal e os hormônios intestinais liberados em resposta as características do bolo alimentar (CCK, PYY, GLP-1 etc.). Estes sinais de saciedade ativam os receptores em fibras vagais aferentes e suas projeções terminam em neurônios no NTS e, desse núcleo terminações neurais podem seguir diretamente para núcleos hipotalâmicos como o ARC e NPV, de forma indireta até o córtex através de estruturas do tronco encefálico como o LC e os núcleos da rafe (Berthoud, 2002). O controle do tamanho da refeição também é influenciado por sinais não diretamente ligados ao trato gastrointestinal, estes são chamados de controles indiretos. Esses controles podem ser sinais metabólicos, sinais rítmicos (ciclo circadiano), sinais condicionados (preferência ou aversão a um alimento), sinais ambientais, entre outros. (Smith, 1996).

A partir destas informações, sugerimos outra hipótese em que as alterações na expressão de Fos no NPV, HVM e NDR não sejam necessariamente em resposta ao estímulo gerado pela injeção de AD *per se*, mas sim devido a outros estímulos gerados pela própria ingestão alimentar do animal. Neste caso, sinais saciatórios diretos ou indiretos poderiam estar atuando nestes núcleos, modificando a atividade neuronal. Para excluir esta possibilidade, sugerimos um modelo experimental adicional em que o animal recebe a injeção de AD no VL, porém não tem disponível o alimento no momento do experimento.

## 6.2 Injeções de AD no 4V.

Os resultados encontrados após administração de AD na dose de 60 nmol no 4V indicaram hiperfagia em ratos saciados, aumentando a frequência de ingestão de alimento, a duração e diminuindo a latência para iniciar o consumo.

Assim como nas injeções no VL, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na expressão de Fos e sua colocalização em neurônios serotoninérgicos no NMR. Poucas células Fos + e Fos +/5-HT + foram encontradas no grupo controle, acontecendo o mesmo nos animais tratados com AD. A baixa expressão de Fos em neurônios tonicamente ativados pode ser a provável justificativa para estes resultados (Herrera e Robertson, 1996). Contudo, não podemos excluir a possibilidade de que os efeitos hiperfágicos encontrados sejam devido a uma participação do NMR (Santos et al., 2009).

O NDR apresentou diferença estatisticamente significativa apenas no número de duplas marcações após a administração de AD. Células Fos +/5-HT + ocorreram mais intensamente nos animais tratados com AD quando comparados ao grupo controle. O número de células Fos +/5-HT + foi correlacionado positivamente com a quantidade de alimento ingerido para cada animal analisado. A porcentagem de duplas marcações no NDR do total de células imunorreativas para 5-HT foi em torno de 6%. Assim como nos animais tratados no VL, os animais tratados no 4V apresentaram uma baixa porcentagem de duplas marcações quando comparadas ao número total de células imunorreativas para 5-HT encontradas no NDR, o que necessariamente não indica que estes mesmos neurônios tenham uma baixa responsividade quando estimulados (Franchini et al., 2002; Takase et al., 2004; Takase e Nogueira, 2008). Deve-se levar em conta que as modificações encontradas na quantidade de duplas marcações possam ser devido a uma possível coordenação do NMR e NDR sobre o controle da liberação de 5-HT (Vertes et al., 1999; Mokler et al., 2009), já que ambos os núcleos fazem um intercâmbio de projeções axonais serotoninérgicas em proporção à sua população de neurônios 5-HT (Vertes e Martin, 1988; Lechin et al., 2006).

Nossa hipótese consistia de que injeções de AD no 4V seriam mais efetivas sobre a expressão de Fos no NMR e NDR. A localização anatômica do 4V favorece esta idéia, pois a probabilidade de que uma injeção de AD neste mesmo ventrículo alcançasse estruturas do tronco encefálico seria bem maior do que em injeções no VL. Além disso,

excluiríamos uma probabilidade de que possíveis efeitos sobre a ingestão de alimento após a injeção de AD, sejam mediados por influências hipotalâmicas. Entretanto, no que diz respeito as duplas marcações no NDR, nossos resultados foram semelhantes, indicando um número total de neurônios serotoninérgicos ativados aproximado nos dois sítios de injeção.

Com relação a presença de células Fos + no NDR, o presente estudo não mostrou diferenças estatisticamente significantes, sendo observado apenas uma tendência estatística a maior expressão de Fos nos animais tratados com AD em comparação com o grupo controle. Atribuímos este resultado a um baixo número de animais por grupo experimental ( $n = 3$ ). Pelo mesmo motivo, não foi possível analisar os efeitos das injeções no 4V de AD sobre núcleos hipotalâmicos. Faz-se necessário aumentar o  $n$  de animais por grupo experimental que serão utilizados nas análises imunoistoquímicas para podermos realizar um estudo mais completo e conclusivo.

Alterações nos comportamentos não-ingestivos também foram observadas ao longo de todos os grupos experimentais. Os comportamentos de imobilidade, exploração do alimento e auto-limpeza tiveram suas durações e frequências modificadas após o tratamento com AD, enquanto que o comportamento de exploração locomotora teve apenas sua duração alterada no tratamento com AD 60 nmol no 4V.

A ingestão hídrica manteve-se inalterada em todos os grupos experimentais neste trabalho, tanto na manipulação de AD no VL quanto no 4V. Os comportamentos de ingestão de alimento e água parecem estar relacionados (Wirtshafter, 2001), entretanto, o intervalo de avaliação de 30 minutos na caixa de registro comportamental pode ter sido relativamente curto. Possivelmente, com avaliação em um tempo maior, o consumo de água induzido pelo consumo de alimento poderia ter sido relatado. Estudos também demonstram que o NMR tem influência sobre consumo de água (Wirtshafter, 2001), em que a injeção de agonistas GABAérgicos aumentam a ingestão de líquido, mesmo sem a presença do alimento (Klitenick e Wirtshafter, 1988; Wirtshafter et al., 1993).

O aumento da ingestão alimentar após administração de AD no VL e 4V juntamente com a ativação de neurônios serotoninérgicos no NDR fornece indícios de uma possível participação deste núcleo sobre os comportamentos ingestivos. Como já mencionado anteriormente, ainda não existem estudos sobre uma possível influência adrenérgica em neurônios serotoninérgicos do NDR sobre a ingestão de alimentos.

Portanto, a investigação da neurotransmissão adrenérgica neste núcleo torna-se relevante e fica a sugestão para trabalhos futuros nesta área de pesquisa.



## 7 CONCLUSÃO.

Em conclusão, os dados presentes neste trabalho mostram que a injeção de AD ICV provocou hiperfagia em ratos saciados e aumentou a expressão de proteína Fos em núcleos hipotalâmicos, especificamente no NPV e HVM. Não obtivemos evidências de que uma modificação na neurotransmissão adrenérgica em ratos saciados diminuisse a expressão de Fos no NMR e que os efeitos adrenérgicos sobre a ingestão de alimentos sejam mediados por ativação de neurônios serotoninérgicos deste núcleo. No entanto, no NDR, além da expressão de Fos, houveram duplas marcações demonstrando atividade neuronal serotoninérgica e não-serotoninérgica nesta região. Estes resultados fortalecem a ideia de uma possível participação deste núcleo sobre os comportamentos ingestivos em ratos, abrindo novas possibilidades de estudo sobre os controles neurais da ingestão de alimento.



## 8 REFERÊNCIAS.

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

ADELL, A.; ARTIGAS, F. A microdialysis study of the *in vivo* release of 5-HT in the median raphe nucleus of the rat. **British journal of Pharmacology.**, 125:1361-1367, 1998.

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

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

ANTUNES-RODRIGUES, J.; McCANN, S. M. Water, sodium chloride and food intake induced by injections of cholinergic and adrenergic drugs into the third ventricle of the rat brain. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 133:1464-1470, 1970.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A.C.; ELIAS, L.L.K.; DE CASTRO, M. Neuroendocrinologia básica e aplicada. **Guanabara Koogan S.A.** 11:135162, 2002.

ARITA, H.; M. SAKAMOTO, M.; HIROKAWA, Y.; OKADO N. Serotonin innervation patterns differ among the various medullary motoneuronal groups involved in upper airway control. **Exp. Brain Res.**, 95 100–110, 1993.

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol.**, 179: 641- 668, 1978.

BARABAN, J.M.; AGHAJANIAN, G.K. Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. **Neuropharmacology**, 19:355-363, 1980.

BARABAN, J.M.; AGHAJANIAN, G.K. Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: demonstration by electron microscopic autoradiography. **Brain Res.**, 204:1–11, 1981.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A. A review of a central 5-HT receptors and their functions. **Neuropharmacology.**, 38:1083-1152, 1999.

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

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

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

BLUNDELL, J.E.; HILL, A.J. Nutrition, serotonin and appetite: case study in the evolution of a scientific idea. **Appetite** 8., 183–194, 1987.

BLUNDELL, J.E.; LATHAM, C.J. Serotonergic influences on food intake: Effect of 5- hydroxytryptophan on parameters of feeding behavior in deprived and free feeding rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 11:431-437, 1979.

BOOTH, D. A. Mechanism of action of norepinephrine in eliciting an eating response on injections into the rat hypothalamus. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 160:336-348; 1968.

BORTOLOZZI, A.; ARTIGAS, F. Control of 5-hydroxytryptamine release in the dorsal raphe nucleus by the noradrenergic system in rat brain. Role of  $\alpha$ -adrenoceptors. **Neuropsychopharmacology.**, 28(3):421-34, 2003.

BROBECK, J.R. Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol. Rev.*, 26:541-559, 1946.

CHALMERS, S. J.; WATSON, S.J. Comparative anatomical distribution of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA and 5-HT<sub>1A</sub> binding in rat brain – a combined in situ hybridization / in vitro receptor autoradiographic study. **Brain Res.**, 561:51-60, 1991.

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

CLEMENT, H.W.; GEMSA, D.; WESEMANN, W. The effect of adrenergic drugs on serotonin metabolism in the nucleus raphe dorsalis of the rat, studied by in vivo voltammetry. *Eur. J. Pharmacol.*, 217, 43±48, 1992.

COMMONS, K.G.; CONNOLLEY, K.R.; VALENTINO, R.J. A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders. **Neuropsychopharmacology**. 28:206–215, 2003.

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

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

DOS SANTOS R.L.D.; MANSUR S.S.; STEFFENS S.M.; FARIA M.S.; MARINO NETO J.; PASCHOALINI M.A. Food intake increased after injection of adrenaline into the median raphe nucleus of free-feeding rats. **Behav Brain Res.**, 6:197:411, 2009.

ERSPAMER, V.; ASERO, B. Identification of enteramine, specific hormone of enterochromaffin cells, as 5-hydroxytryptamine. **Nature.**, 169: 800-801, 1952.

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

FOSTER, D.W.; McGARR, J.D. Glucose, lipid and protein metabolism. In: GRIFFIN, J.J.E.; OJEDA, S.R. (Eds). **Textbook of endocrine physiology**. USA, 349-374, 1996.

FRANCHINI, L.F.; JOHNSON, A.K.; OLMOS, J.; VIVAS, L. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. **Am J Physiol-Reg.**, 282:235-243, 2002.

FRAZER, A.; HENSLER, J.G. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Lippincott-Raven: Philadelphia, 6 ed. 1999. ISBN-10: 0-397-51820-X

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

GOLDMAN, C.K.; MARINO, L.; LEIBOWITZ, S.F. Postsynaptic  $\alpha$ -2 noradrenergic receptors mediate feeding induced by paraventricular nucleus injection of norepinephrine and clonidine. **Eur J Pharmacol.**, 9:115, 1985.

GROSSMAN, S. P. Direct adrenergic and cholinergic stimulation of hypothalamic mechanisms. **Am. J. Physiol.** 202:872-882, 1962.

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

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

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

HALL H.; LUNDKVIST C.; HALLDIN C.; FARDE L.; PIKE VW.; MCCARRON J.A.; FLETCHER A.; CLIFFE I.A.; BARF T.; WIKSTRÖM H.; SEDVALL G. Autoradiographic localization of 5HT<sub>1A</sub> receptors in the post-mortem human brain using [3H] WAY-100635 and [11C] WAY 100635. **Brain Res.**, 745:96-108, 1997.

HAPPE, H. K.; COULTER, C. L.; GERETY, M. E.; SANDERS, J. D.; O'ROURKE, M.; BYLUND, D. B.; MURRIN, L. C. Alpha-2 adrenergic receptor development in rat CNS: an autoradiographic study. **Neuroscience**, 123:167–178, 2004.

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

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

HERDEGEN, T.; LEAH, J.D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, 28:370–490, 1998.

HERRERA, D.G.; ROBERTSON, H.A. Activation of c-fos in the brain. **Prog. Neurobiol.**, 50:83-107, 1996.

HETHERINGTON, A.W.; RANSON, S.W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **Anat. Rec.**, 78:149–172, 1940.

HJORTH, S.; BENGTSSON, H.J.; MILANO, S.; LUNDBERG, J.F.; SHARP, T. Studies on the role of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors and  $\alpha$ -1 adrenoceptors in the inhibition of 5-HT release - I. BMY7378 Prazosin. **Neuropharmacology**, 34:615-620. 1995.

HOFFMAN, G.E.; LYO, D. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? **J. Neuroendocrinol.**, 14:259–268, 2002.

HOFFMAN, G.E.; SMITH, M.S.; VERBALIS, J.G. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. **Front. Neuroendocrinol.**, 14:173–213, 1993.

HOKFELT, T.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.; JOHANSSON, O. Immunohistochemical evidence for the existence of adrenaline neurons in the rat brain. **Brain Res.**, 66:235-251; 1974.

HOKFELT, T.; FOSTER, G. A.; JOHANSSON, O.; SCHULTZBERG, M.; HOLETS, V.; JU, G.; SKAGERBERG, G.; PALKOVITS, M.; SKIRBOLL, L.; STOLK, J. M.; UP e HARD, D.C.; GOLDSTEIN, M. Central phenylethanolamineN-Methyltransferase-immunoreactive-neurons: Distribution, projections, fine structure, ontogeny and coexisting peptides. **Epinephrine in the central nervous system**. New York: Oxford University Press, 10-32. 1988.

HOPWOOD, S.E.; STAMFORD, J.A. Noradrenergic modulation of serotonin release in rat dorsal and median raphe nuclei via  $\alpha 1$  and  $\alpha 2A$  adrenoceptors. **Neuropharmacology.**, 41:433-42, 2001.

HUTSON P.H.; DONOHOE T.P.; CURZON, G. Infusion of the 5-hydroxytryptamine agonists RU24969 and TFMPP into the paraventricular nucleus of the hypothalamus causes hypophagia. **Psychopharmacol.**, 195:550-552, 1988a.

INENAGA, K.; DYBALL, R.E.; OKUYA, S.; YAMASHITA H. Characterization of hypothalamic noradrenaline receptors in the supraoptic nucleus and periventricular region of the paraventricular nucleus of mice in vitro. **Brain Res.**, 369:37, 1986.

JACOBS, B. L.; AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiol. Rev.**, 72:165-229, 1992.

KALRA, S.P.; DUBE, M.G.; PU, S.; XU, B.; TAMAS, L.H. Interacting appetite-regulating pathways the hypothalamic regulation of body weight. **Endocrine Reviews.**, 20:68-100, 1999.

KANDEL, E.H.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. Principles of neural science. **McGraw-Hill Companies**: New York, 4 ed. 2000.

KANG, M.; PARK, C.; AHN, H.; HUH, Y. Ectopic expression of serotonin-positive neurons in the hypothalamus associated with a significant serotonin decrease in the midbrain of food restricted rats. **Neuroscience Letters**, 314:25-28, 2001.

KANOSKI, S.E.; MEISEL, R.L.; MULLINS, A.J.; DAVIDSON, T.L. The effects of energy-rich diets on discrimination reversal learning and on BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of the rat. **Behav. Brain. Res.**, 1150:57-66, 2007.

KAYE, W. Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. **Physiology & Behavior**, 94:121-135, 2008.

KELLY, A. E.; BALDO, B. A.; PRATT, W. E.; WILL, M. J. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. **Physiology & Behavior**, 86:773-795, 2005.

KIA, H.K.; MIQUEL, M.C.; BRISORGUEIL, M.J.; DAVAL, G.; RIAD, M.; EL MESTIKAWY, S.; HAMOM, M.; VERGÉV, D. Immunocytochemical localization of serotonin 1A receptors in the rat central nervous system. **J Comp Neurol.**; 365:289-305, 1996.

KLITENICK, M. A.; WIRTSHAFTER, D. Comparative studies of the ingestive behaviors produced by microinjections of muscimol into the midbrain raphe nuclei of the ventral tegmental area of the rat. **Life Sciences**, 42:775-782, 1988.

LECHIN, F.; DIJS B. V.D.; HERNANDEZ-ADRIAN G. Dorsal raphe vs. median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: Relevance for neuropharmacological therapy. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.**, 30:565 - 585, 2006.

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

LEIBOWITZ, S.F. Hypothalamic  $\beta$ -adrenergic "satiety" system antagonizes an  $\alpha$ -adrenergic "hunger" system in the rat. **Nature**, 226: 963-964, 1970.

LEIBOWITZ, S.F. Reciprocal hunger-regulating circuits involving alpha- and beta-adrenergic receptors located, respectively, in the ventromedial and lateral hypothalamus.

**Proc. natn. Acad. Sci.**, 67: 1063-1070, 1970.

LEIBOWITZ, S.F. Paraventricular nucleus: a primary site mediating adrenergic stimulation of feeding and drinking. **Pharmacol Biochem Behav.**, 8:163-175, 1978.

LEIBOWITZ, S.F.; HAMMER, N.J.; CHANG, K.; Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produced overeating and obesity in the rat. **Physiol. Behav.**, 27:1031-1040, 1981.

LEIBOWITZ, S.F.; JHANWAR-UNIYAL, M.; DVORKIN, B.; MAKMAN, M.H. Distribution of  $\alpha$ -1 adrenergic,  $\alpha$ -2 adrenergic and dopaminergic receptors in discrete hypothalamic areas. **Brain Res.**; 233:97, 1982.

LEIBOWITZ, S.F.; ROOSIN, P.; ROSENN, M. Chronic norepinephrine injection into the hypothalamic paraventricular nucleus produces hyperphagia and increased body weight in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 21:801-808; 1984.

LEIBOWITZ, S.F. Hypothalamic paraventricular nucleus: interaction between  $\alpha$ 2- noradrenergic system and circulating hormones and nutrients in the relation to energy balance. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 12:101, 1988.

LEIBOWITZ, S.F.; SLADEK, C.; SPENCER, L.; TEMPEL, D. Neuropeptide Y, Epinephrine and Norepinephrine in the Paraventricular Nucleus: Stimulation of Feeding and the Release of Corticosterone, Vasopressin and Glucose. **Brain Research Bulletin**, 21:905-912, 1988.

LEVINE, A. S.; KUSKOWSKI, M. A.; GRACE, M.; BILLINGTON, C. J. Food deprivation-induced vs. drug-induced feeding: A behavioral evaluation. **Am. J. Physiol.**, 260:546-552; 1991.

LUCKI, I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. **Biol Psychiatry.**, 44: 151-162, 1998.

MACKENZIE, R.G.; HOEBEL, B.G.; DUCRET, R.P.; TRULSON, M. E. Hyperphagia following intraventricular p-chlorophenylalanine-, leucyne- or tryptophan-methyl esters: lack of correlation with white

brain serotonin levels. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 10:951-955, 1979.

MAIDEL, S.; LUCINDA, A.M.; AQUINO, V.W.; FARIA, M.S.; PASCHOALINI, M.A. The adrenaline microinjection into the median raphe nucleus induced hypophagic effect in rats submitted to food restriction regimen. **Neurosci Letters.**, 422:123–7, 2007.

MANSUR, S.S.; TERENCE, M.G.; MARINO-NETO, J.; FARIA, M.S.; PASCHOALINI, M.A. Alpha<sub>1</sub> receptor antagonist in the median raphe nucleus evoked hyperphagia in free-feeding rats. **Appetite.**, 57:498-503, 2011.

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

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

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

MARWAHA, J.; AGHAJANIAN, G.K. Relative potencies of alpha-1 and alpha-2 antagonists in the locus ceruleus, dorsal raphe and dorsal lateral geniculate nuclei: an electrophysiological study. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 222:287-293, 1982

MARZINKIEWICZ, M.; MORCOS, R.; CHRETIEN, M. CNS connections with the median raphe nucleus: retrograde tracing with WGAapoHRP-Gold complex in the rat. **J. Comp. Neurol.**, 289: 11–35, 1989.

MASSARI, V.J.; TIZABI, Y.; JACOBOWITZ, D.M. Potential noradrenergic regulation of serotonergic neurons in the median raphe nucleus. **Exp. Brain Res.**, 34: 177–182, 1979.

MOKLER, D. J.; DUGAL, J. R.; HOFFMAN, J. M.; MORGANE, P. J. Functional interrelations between nucleus raphé dorsalis and nucleus raphé medianus. A dual probe microdialysis study of glutamate-stimulated serotonin release. **Brain Research Bulletin.**, 78, 132–138, 2009.

MOLIVER, M.E. Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. **J. Clin. Psychopharmacol.**, 7: 3S–23S, 1987.

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

MOORE, R.Y.; CARD, J.P. Noradrenalin-containing neuron systems. In: A. Bjorklund and T. Hokfelt, Editors, **Handbook of chemical neuroanatomy**, vol. 2: Classical transmitters in the CNS, Elsevier, Amsterdam, pp. 123–156, 1984.

MOORE, R.Y.; HALARIS, A.E.; JONES. B.E. Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. **J. Comp. Neurol.**, 180:417–438, 1978.

MORGAN, J.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annu Rev Neurosci.**, 14:421- 51, 1991.

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

OLSON, B.R.; FREILINO, M.; HOFFMAN, G.E.; STRICKER, E.M.; SVED, A.F.; VERBALIS, J.G. C-fos expression in rat brain and brainstem nuclei in response to treatments that alter food intake and gastric motility. **Mol. Cell Neurosci.**, 4, 93–106, 1993.

ORDWAY, G.A.; STOCKMEIER, C.A.; CASON, G.W.; KLIMEK, V. Pharmacology and distribution of norepinephrine transporters in the human locus coeruleus and raphe nuclei. **J. Neurosci.**, 17:1710–1719, 1997.

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

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

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

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

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

RAPPORT, M.M.; GREEN, A.A.; PAGE, I.H. Serum vasoconstrictor (serotonin) IV. Isolation and characterization. **J Biol Chem.**, 176: 1243–51, 1948.  
**Rev.**,30: 203–214, 2006.

RIBAS, A.S.; FLORES, R.A.; DE NAZARETH A.M.; FARIA, M.S.; TERENCE, M.G.; MARINO-NETO, J.; PASCHOALINI, M.A. Feeding behaviour after injection of  $\alpha$ -adrenergic receptor agonists into the median raphe nucleus of food-deprived rats. **Physiology & Behavior.**, 105: 220-229, 2012.

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

ROUQUIER, L.; CLAUSTREI, Y.; BENAVIDES, J.  $\alpha$ 1-Adrenoceptor antagonists differentially control serotonin release in the hippocampus and striatum: a microdialysis study. **Eur. J. Pharmacol.**, 261:59-64, 1994.

SAAVEDRA, J.M.; GROBECKER, H.; ZIVIN, J. Catecholamines in the raphe nuclei of the rat. **Brain Res.**, 114:337-345, 1976.

SAPER, C.B.; CHOU, T.C; ELMQUIST, J.K. The need to feed, homeostatic and hedonic control of eating. **Neuron.**, 36:199-211, 2002.

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

SINTON C.M.; FALLON S.L. Electrophysiological evidence for a functional differentiation between subtypes of the 5-HT1 receptor. **Eur J Pharmacol.**, 157:173-81, 1988.

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

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

SNG, JCG.; TANIURA, H.; YONEDA, Y. A Tale of Early Response Genes. **Biol Pharm Bull.**, 27 (5):606-612, 2004.

SVENSON, T.H.; BUNNEY, B.S.; AGHAJANIAN, G.K. Inhibition of both noradrenergic and serotonergic neurons in brain by the alpha-adrenergic agonist clonidine. **Brain Res.**, 92:291-306, 1975.

TAKASE L.F.; NOGUEIRA M.I. Patterns of fos activation in rat raphe nuclei during feeding behavior. **Brain Res.**, 1200:10-8, 2008.

TAKASE L.F.; NOGUEIRA M.I.; BARATTA, M.; BLAND, S.T.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F.; FORMAL, C.A.; JACOBS, B.L. Inescapable shock activates serotonergic neurons in all raphe nuclei of rat. **Behav. Brain Res.** 153: 233-239, 2004

TALLEY, E.M.; ROSIN, D.L.; LEE, A.; GUYENET, P.G.; LYNCH, K.R. Distribution of alpha 2A-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. **J. Comp. Neurol.**, 372: 111–134, 1996.

TER HORST, G.; DE BOER, P.; LUITEN, P.; VAN WILLIGEN, J. Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A *Phaseolus vulgaris* lectin tracing study in the rat. **Neuroscience**, 31:785–797, 1989.

TRAVERS, S.; NORNGREN, R. Gustatory neural processing in the hindbrain. **Annu. Rev. Neurosci.**, 10:595–632, 1987.

UNNERSTALL, J.R.; FERNANDEZ, I.; ORENSANZ, L.M. The alpha-adrenergic receptor: radiohistochemical analysis of functional characteristics and biochemical differences. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 22: 859–874, 1985.

VALENSTEIN, E.S.; COX, V.C.; KAKOLEWSKI, J.W. Modification of motivated behavior elicited by electrical stimulation of the hypothalamus. **Science**, 159:1119–1121, 1968.

VANDERMAELEN, C.P.; AGHAJANIAN, G.K. Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. **Brain Res.**, 289:109–119, 1983.

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

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

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

VERTES, R.P.; LINLEY, S.B. Efferent and afferent connections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **Serotonin and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects**, 69-102, 2008.

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

WELLMAN, P.J. Norepinephrine and the control of food intake. **Nutrition**, 16:837– 842, 2000.

WELLMAN, P.J.; DAVIES, B.T.; MORIEN, A.; McMAHON, L. Modulation of feeding by hypothalamic paraventricular nucleus  $\alpha$ -1 and  $\alpha$ -2 adrenergic receptors. **Life Sci**, 53:669, 1993.

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

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

WIRTSHAFTER, D.; STRATFORD, T. R.; PITZER, M. R. Studies on the behavioral activation produced by stimulation of GABA-B receptors in the median raphe nucleus. **Behavioural Brain Research**, 59:83–93, 1993.

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

YOUNG, W.S. III.; KUHAR, M.J. Noradrenergic alpha 1 and alpha 2 receptors: light microscopic autoradiographic localization. **Proc Natl Acad Sci USA**, 77: 1696, 1980.

ZIMMER, L.A.; ENNIS, M.; SHIPLEY, M.T. Soman-induced seizures rapidly activate astrocytes and microglia in discrete brain regions. **J. Comp. Neurol.**, 378: 482–492, 1997.