

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

Cristiane Lavado

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT<sub>1A</sub>  
PÓS-SINÁPTICO NA HIPOFAGIA INDUZIDA PELA INJEÇÃO  
DE 8-OH-DPAT NA ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL**

Dissertação Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como Requisito Parcial à Obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Marta Aparecida Paschoalini.

Florianópolis

2012

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

Lavado, Cristiane

Avaliação da participação do receptor 5-HT1A pós-sináptico na hipofagia induzida pela injeção de 8-OH-DPAT na Área Hipotalâmica Lateral [dissertação] / Cristiane Lavado ; orientadora, Marta Aparecida Paschoalini ; co-orientadora, Adelina Martha dos Reis. - Florianópolis, SC, 2012.

96 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. 2. Serotonina. 3. Área Hipotalâmica Lateral. 4. Ingestão de alimento. 5. Hipofagia. I. Paschoalini, Marta Aparecida. II. Reis, Adelina Martha dos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

Cristiane Lavado

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT<sub>1A</sub>  
PÓS-SINÁPTICO NA HIPOFAGIA INDUZIDA PELA INJEÇÃO  
DE 8-OH-DPAT NA ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas.

Florianópolis, 4 de setembro de 2012

---

Prof. Alex Rafacho, Dr.

Coordenador do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**Banca Examinadora:**

---

Profa. Dra. Marta Aparecida Paschoalini  
Orientadora

---

Prof. Dra. Fernanda Barbosa Lima Christian  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Daniel B. Zoccal  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes  
Universidade de São Paulo



Dedico à minha família, que permanece em meus pensamentos 24 horas por dia. Tudo que faço, faço por vocês!



## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À minha família que me fizeram entender que nada é tão difícil e que a vida pode ser fácil quando se tem planos para sonhar. Fizeram-me enxergar caminhos a seguir, é só olhar com outros olhos o que temos de melhor e viver um dia após o outro; mostraram-me que não existe amor, se não houver saudade, mesmo quando se está perto! Criaram-me para ser livre, porém sem esquecer aqueles que fizeram parte da minha história, daqueles que são minha essência, daqueles que são minha força, o ombro para o meu descanso, o sorriso da minha conquista, o meu TUDO!

À minha orientadora Marta Aparecida Paschoalini por acreditar em mim e me dar a oportunidade. Pela paciência, pela dedicação, pelas palavras encorajadoras e por ter sido sempre tão atenciosa quando precisei de ajuda. Obrigada por toda orientação e tempo despendidos, com a Marta aprendi lições que levarei comigo o resto da minha caminhada.

Fica aqui um agradecimento carinhoso ao Paulo que foi quem estive ao meu lado nos últimos meses, me apoiando e me dando forças. Fica difícil achar as palavras corretas para colocar aqui no papel, mas “você faz toda diferença”! Obrigada por ser tão maravilhoso, tão presente, tão importante, tão dedicado e por ter me reencontrado depois de tanto tempo. Você foi uma das melhores coisas que me aconteceu esse ano!

À Dani Felício, acho que as palavras “muito obrigada” não seriam aqui suficientes para demonstrar minha real gratidão. Considero você a maior participante de tudo isso, me ajudou nos experimentos, me ajudou com os animais, estive comigo nos momentos mais difíceis (e que não foram poucos) e, acima de tudo, me ajudou muito fora do laboratório. Sua presença foi marcante na minha vida, aprendi muito contigo e a sua amizade vou levar com muito carinho.

À Lari Kochenborger por incontáveis momentos de descontração, por inúmeras gargalhadas compartilhadas, pelos conselhos, pelo carinho, por me levar chocolate quando eu fazia experimentos nos finais de semana, pela amizade. Sempre foi um alento estar perto de ti por me

fazerem tão bem. A saudade vai ficar junto com a lembrança de tantos momentos bons.

Ao Anderson Ribas (mozão) que se mostrou fundamental no meu primeiro ano de mestrado, fazendo de tudo para que as condições de trabalho fossem as melhores possíveis, sempre inventando “gambiarras” que facilitassem minha vida. Obrigada por toda ajuda que você me deu.

À Fernandinha Possamai que mais que uma colega de trabalho, uma vizinha, uma amiga, se mostrou uma verdadeira irmã. Aquela que posso contar pro que der e vier, que esteve sempre ali pra me ajudar. Sua falta agora na fase final está sendo sentida todos os dias, volta logo!

À IC, Laís Ganzer, que apesar de ter trabalhado pouco tempo comigo foi indispensável! Seu bom humor, competência e seu profissionalismo serão a chave do seu sucesso. Aos colegas de laboratório Lucas, Rafa, Eduardo, Ana Paula, Renata, Soci, Bruno, Nathália, Fernandinho, Luís, Ângeluz, Tiago, Rennan e Ana Taschetto por estarem sempre me ajudando e incentivando, pela convivência, pelos momentos de diversão.

Aos professores José Marino Neto e Mariana Terenzi por terem disponibilizado seus laboratórios e seus conhecimentos para a realização deste trabalho. Por terem tirado minhas dúvidas e compartilhado sabedoria.

Não posso deixar de agradecer os professores da USP-RP que mudaram minha forma de entender a fisiologia humana, que me acolheram e muito me ensinaram. Agradeço também os inúmeros amigos que fiz em Ribeirão Preto que me acompanham mesmo depois que voltei de lá: Gabi, Samira, Aline, Procópio, Léo, Teddy, Fabiano, Naya, Cris, Ricardo, dentre tantos outros.

Ao Seu Carlão por ser sempre tão querido, educado e divertido. Por estar sempre disponível para ajudar sem importar o horário.

Aos animais, que sem eles simplesmente a pesquisa não teria acontecido.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Finalmente, agradeço a todos que direta ou indiretamente participaram de alguma forma na execução deste trabalho, àqueles que contribuíram de alguma forma para que isso tudo se tornasse realidade. A todos vocês o meu sincero: muitíssimo obrigada!

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores.  
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas.  
Se não houver folhas, valeu a intenção da  
semente.”

*Maurício Francisco Ceolin*



## RESUMO

Estudos conduzidos em nosso laboratório avaliaram os efeitos da injeção local de 8-hidroxi-2-(di-npropilamino)-tetralina (8-OH-DPAT) na Área Hipotalâmica Lateral (AHL) sobre o comportamento ingestivo de fêmeas adaptadas a comer uma ração enriquecida com 10% de sacarose, durante o período diurno do estro e diestro. Os resultados mostraram que 8-OH-DPAT reduziu significativamente a ingestão de alimentos em ambos os estágios do ciclo. Investigações posteriores mostraram que o pré-tratamento da AHL com WAY100635 (antagonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>) suprimiu o efeito hipofágico provocado pelo 8-OH-DPAT nas duas fases do ciclo. Neste contexto, a proposta do presente estudo foi investigar a localização do receptor 5-HT<sub>1A</sub> no circuito serotoninérgico da AHL por meio da injeção de um antagonista considerado de ação pós-sináptica, 1-(2-methoxyphenyl)-4-(4-succinimidobutyl)-piperazine (MM-77), em ratas em diestro e estro. Ratas adaptadas a consumir uma dieta rica em sacarose 10% e com cânulas cronicamente implantadas na AHL foram pré-tratadas com o veículo (ácido ascórbico 5%) ou MM-77 (doses de 0,37 e 0,74 nmol/200 nl) seguida pela injeção de veículo ou 8-OH-DPAT (6 nmol/200 nl). Os comportamentos foram avaliados durante 1 hora após a administração das drogas e os resultados mostraram que a injeção de 8-OH-DPAT reduziu significativamente a ingestão de alimentos em 60% na fase estro e 49% no diestro. Essa redução na quantidade de alimento ingerido foi acompanhada por uma redução na duração e na frequência de ingestão, na fase estro. Os animais que foram tratados com MM-77 seguido de veículo não apresentaram alterações nos comportamentos ingestivos e/ou não ingestivos. Porém, os animais tratados com MM-77 seguido de 8-OH-DPAT apresentaram um bloqueio do efeito hipofágico induzido pela injeção de 8-OH-DPAT. Estes resultados indicam que receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados na AHL participam no controle serotoninérgico de mecanismos relacionados à regulação da ingestão de alimentos e que estes circuitos são, possivelmente, afetados por hormônios esteroides ovarianos. Além disso, observa-se que a reversão da hipofagia (provocada por um antagonista de receptor 5-HT<sub>1A</sub> pós-sináptico) pode ter sido realizada por um bloqueio prévio do receptor pelo antagonista, indicando sua localização pós-sináptica.

**Palavras-chave:** Serotonina, área hipotalâmica lateral, ingestão de alimento, hipofagia.



## ABSTRACT

Studies conducted in our laboratory evaluated the effects of local injection of 8-hydroxy-2-(di-npropylamino)-tetralin (8-OH-DPAT) in the lateral hypothalamic area (AHL) on feeding behavior of females adapted to eating a diet supplemented with 10% sucrose during the daytime estrus and diestrus. The results showed that 8-OH-DPAT significantly reduced food intake in both stages of the cycle. Subsequent investigations showed that pretreatment with WAY100635 (antagonist of 5-HT<sub>1A</sub>) abolished the hypophagic effect caused by 8-OH-DPAT in both stages of the cycle. In this context, the purpose of this study was to investigate the location of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the serotonergic circuit of the AHL by injection of an antagonist considered with postsynaptic action, 1 - (2-methoxyphenyl) -4 - (4-succinimidobutyl )-piperazine (MM-77), in rats in diestrus and estrus. Rats adapted to consume a diet rich in 10% sucrose and carrying chronically implanted cannulas toward to the AHL were pretreated with the vehicle (5% ascorbic acid) or MM-77 (0.37 and 0.74 nmol) followed by injection of vehicle or 8-OH-DPAT (6 nmol). The behaviors were evaluated for 1 hour after drug administration and the results showed that the injection of 8-OH-DPAT reduced the food intake by 60% in the phase of the estrous and 49% in the diestrus. This reduction in food intake was accompanied by a reduction in the duration and frequency of the ingestive behavior, during the estrus. Animals that were treated with MM-77 followed by the vehicle showed no alterations in the ingestive and/or non ingestive behaviors. However, animals treated with MM-77 followed by 8-OH-DPAT showed blockage of the hypophagic effects induced by injection of 8-OH-DPAT. These results indicate that 5-HT<sub>1A</sub> receptors located in the AHL are involved in the serotonergic control of the mechanisms related to the regulation of food intake and that these circuits are possibly affected by ovarian steroid hormones. Furthermore, it is observed that the reversal of the hypophagia (caused by an antagonist of 5-HT<sub>1A</sub> postsynaptic receptor) may have been carried out by a previous blockade of the receptor by the antagonist, indicating its postsynaptic location.

**Keywords:** Serotonin, lateral hypothalamic area, food intake, hypophagia.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Conexões entre tronco encefálico, hipotálamo, áreas corticais e circuitaria de recompensa envolvidas com regulação do apetite.....	26
Figura 2: Anatomia do hipotálamo de rato.....	27
Figura 3: Neurocircuitos hipotalâmicos e mecanismo de transdução de sinal envolvidos na homeostase energética.....	28
Figura 4: Modelo para integração de informações relacionadas à recompensa e adiposidade.....	32
Figura 5: Síntese e metabolismo da serotonina.....	34
Figura 6: Principais projeções serotoninérgicas.....	37
Figura 7: Padrões de estradiol, progesterona e LH em humanos (A) e ratos (B) durante o ciclo reprodutivo.....	40
Figura 8: Microfotografia de um corte coronal (coloração pelo método de Nissl) do hipotálamo de rato.....	53
Figura 9: Representação esquemática de cortes coronais de cérebro de rato, demonstrando o sítio aproximado das microinjeções.....	54
Figura 10: Efeito da injeção de 8-OH-DPAT sobre a ingestão de alimentos após o pré-tratamento da AHL com veículo ou MM-77 em ratas em estro e diestro.....	55
Figura 11: Efeito da injeção de 8-OH-DPAT sobre a duração da ingestão de alimentos após o pré-tratamento da AHL com veículo ou MM-77 em ratas em estro e diestro.....	56
Figura 12: Efeito da injeção de 8-OH-DPAT sobre a frequência da ingestão de alimentos após o pré-tratamento da AHL com veículo ou MM-77 em ratas em estro e diestro.....	57
Figura 13: Efeito da injeção de 8-OH-DPAT sobre a latência da ingestão de alimentos após o pré-tratamento da AHL com veículo ou MM-77 em ratas em estro e diestro.....	57



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais hormônios intestinais envolvidos na regulação do apetite.....	24
Tabela 2: Resposta dos animais com relação ao consumo de água durante 1h após o pré-tratamento da AHL com o veículo ou diferentes doses de MM-77 seguido 7 min após pela injeção de veículo ou de 8-OH-DPAT em ratas na fase de estro. ....	59
Tabela 3: Resposta dos animais com relação ao consumo de água durante 1h após o pré-tratamento da AHL com o veículo ou diferentes doses de MM-77 seguido 7 min após pela injeção de veículo ou de 8-OH-DPAT em ratas na fase de diestro. ....	60
Tabela 4: Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1h após o pré-tratamento da AHL com veículo ou diferentes doses de MM-77 seguido 7 min após pela injeção de veículo ou de 8-OH-DPAT em ratas em fase de estro. ....	61
Tabela 5: Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1h após o pré-tratamento da AHL com veículo ou diferentes doses de MM-77 seguido 7 min após pela injeção de veículo ou de 8-OH-DPAT em ratas em fase de diestro. ....	62



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRP – Proteína Relacionada ao agouti  
AHL – Área Hipotalâmica Lateral  
APF – Área Perifornical  
CART – Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina  
CCK – Colecistocinina  
CRH – Hormônio liberador de corticotropina  
DMN – Núcleo dorsomedial do hipotálamo  
E2 – Estrogênio  
FSH – Hormônio folículo estimulante  
GABA – Ácido gama-aminobutírico  
GLP-1 – Peptídeo semelhante ao glucagon -1  
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina  
i.c.v. – Intracerebroventricular  
LH – Hormônio luteinizante  
MAO – Enzima monoamino oxidase  
MCH – Hormônio concentrador de melanina  
MET – Metergolina  
MM-77 – 1-(2-methoxyphenyl)-4-(4-succinimidobutyl)-piperazine  
ARC – Núcleo arqueado do hipotálamo  
NDR – Núcleo dorsal da rafe  
NPY – Neuropeptídeo Y  
NTS – Núcleo do trato solitário  
OT - Ocitocina  
OXM – Oxintomodulina  
POMC – Pró-ópiomelanocortina  
pBLA – Região posterior da amígdala basolateral  
PP – Polipeptídeo pancreático  
PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo  
PYY – Peptídeo YY  
TGI – Trato gastrointestinal  
TRH – Hormônio liberador de tirotropina  
VMN – Núcleo ventromedial do hipotálamo  
VTA – Área Tegmental Ventral  
WAY 100635 – Maleato de ciclo hexano carboxamida n-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-n-(2-piridil)  
 $\alpha$ -MSH – Hormônio estimulante de  $\alpha$ -melanócito  
 $\beta$ -MSH – Hormônio estimulante de  $\beta$ -melanócito  
5-HT – 5-hidroxitriptofano; serotonina

5-HIAA – Ácido 5-hidroxiindolacético

8-OH-DPAT – 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina

SNC – Sistema nervoso central

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1 Controle central da ingestão de alimentos .....	25
1.2 O sistema serotoninérgico .....	32
1.2.1 Síntese e metabolismo de serotonina .....	33
1.2.2 Subtipos e localização dos receptores.....	33
1.2.3 Regulação serotoninérgica da ingestão de alimento .....	35
1.3 Influência do ciclo ovariano na ingestão alimentar .....	39
1.3.1 Características hormonais do ciclo estral.....	39
1.3.2 Ciclo ovariano e ingestão de alimento .....	40
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
2.1 Objetivo Geral .....	45
2.2 Objetivos Específicos .....	45
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
3.1 Animais .....	47
3.2 Procedimento cirúrgico .....	47
3.3 Determinação da fase do ciclo estral .....	48
3.4 Soluções e doses administradas .....	49
3.5 Injeções intracerebrais .....	49
3.6 Procedimento experimental.....	50
3.7 Registro comportamental.....	51
3.8 Análise histológica .....	52
3.9 Análise estatística.....	52
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
4.1 Ingestão de alimento.....	55
4.2 Ingestão de água .....	57
4.3 Comportamentos não ingestivos.....	58
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>



# 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os temas relacionados a transtornos alimentares tornaram-se de grande relevância em nossa sociedade e acabaram despertando interesse para a compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo (WILLIAMS et al., 2001). A busca pelos mecanismos fisiológicos que melhor elucidem a regulação da ingestão de alimentos e do balanço energético corporal tornou-se um dos principais focos de estudo, devido ao crescente aumento dos casos de transtornos alimentares, tais como obesidade, anorexia e bulimia (ERLANSAN-ALBERTSSON, 2005; SIMPSON et al., 2009).

Os mecanismos que controlam a ingestão de alimentos envolvem uma complexa interação de sinais periféricos (tecido adiposo e gastrointestinal) e sinais do Sistema Nervoso Central (SNC), que são influenciados pela avaliação do alimento e do balanço energético, além de fatores genéticos, psicológicos e ambientais (SCHWARTZ et al., 2000; WILLIAMS et al., 2000; WOODS et al., 2000; CHAPTINI, PEIKIN, 2008; SIMPSON et al., 2009; OWYANG, HELDSINGER, 2011).

O ato de comer não envolve somente um instinto de sobrevivência, mas um mecanismo de recompensa (DIETRICH, HORVATH, 2009). O controle hedônico está associado à representatividade ou significância do alimento em uma determinada situação (WOOD, SEELEY, 2000; FULTON, 2010). Atualmente, sabe-se que além de áreas primárias, tais como tronco cerebral, mesencéfalo e hipotálamo, estarem envolvidas na ingestão, áreas mais superiores como núcleo accumbens, amígdala e córtex orbitofrontal possuem influência importante na homeostase ingestiva diária. (DIETRICH, HORVATH, 2009)

Com relação aos sinais periféricos relacionados com esta regulação, hormônios secretados pelo trato gastrointestinal (TGI) ocupam um papel primário na complexa interação neuroendócrina que é a base da regulação da ingestão de alimento. Esses hormônios gastrintestinais podem atuar periféricamente e, também, diretamente em receptores localizados nos neurônios do hipotálamo e do tronco encefálico, que são regiões do SNC que fazem parte do controle central do apetite. Essa interação ocorre devido a uma fragilidade da barreira hemato-encefálica na eminência mediana e área postrema, onde estruturas do SNC próximas acabam recebendo influências destes fatores (CHAUDHRI et al., 2006; CHAPTINI, PEIKIN, 2008; SILVA et al., 2012; SUZUKI et

al., 2011). No tronco encefálico, o complexo vagal dorsal (consistindo do núcleo dorsal motor do vago, área postrema e núcleo do trato solitário – NTS) desempenha papel crucial no processamento de sinais periféricos, como aferentes vagais, do intestino para o hipotálamo (SUZUKI et al., 2011).

Estes hormônios estão relacionados a dois tipos de efeitos: anorexígenos e orexígenos (tabela 1). Os efeitos anorexígenos relacionados à redução da ingestão de alimento podem ser mediados pela oxintomodulina (OXM), peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), peptídeo YY (PYY), transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), insulina, leptina, colecistoquinina (CCK). Por outro lado, os efeitos orexígenos relacionados ao aumento da ingestão alimentar podem ser mediados pela grelina (Tabela 1) (SCHWARTZ et al., 2000; MORTON et al. 2006; MEISTER, 2007; SUZUKI et al., 2011).

Tabela 1: Principais hormônios intestinais envolvidos na regulação do apetite. Adaptado de Chaptini, Peikin, 2008; Morton et al., 2006; Schwartz et al., 2000; Suzuki et al., 2011; Trujillo et al., 2011.

<b>Efeito</b>	<b>Hormônio</b>	<b>Principais ações</b>
Anorexígeno	PYY	Atrasa o efeito do SNC e nervo vago no esvaziamento gástrico
	GLP-1	Liberação de glicose dependente de insulina; Atrasa o efeito do SNC e nervo vago no esvaziamento gástrico
	OXM	Idem GLP-1
	Insulina	Glicólise, glicogênese, lipogênese
	CCK	Contração da vesícula biliar; atrasa esvaziamento gástrico; secreção enzimas pancreáticas
	PP	Atrasa esvaziamento gástrico
	Leptina	Inibe neurônios NPY/AgRP e ativa POMC
Orexígeno	Grelina	Aumenta motilidade gástrica; ativa neurônios NPY/AgRP e inibe POMC, no ARC.

Além destes hormônios gastrintestinais, alguns neuropeptídeos podem estar envolvidos com a modulação da ingestão de alimento como hormônio estimulante de  $\alpha$ -melanócito ( $\alpha$ -MSH), hormônio liberador de corticotropina (CRH) e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) com efeitos anorexígenos; e cortisol, endorfinas, galanina,

hormônio concentrador de melanina (MCH), neuropeptídeo Y (NPY), orexinas A e B e proteína relacionada ao agouti (AgRP) com efeitos orexígenos (SCHWARTZ et al., 2000; MORTON et al., 2006; MEISTER, 2007).

## **1.1 Controle central da ingestão de alimentos**

As principais regiões encefálicas envolvidas na regulação homeostática da ingestão de alimento estão localizadas no hipotálamo e no tronco encefálico (MURPHY, BLOOM, 2006). Como ilustrado na figura 1, o hipotálamo é importante na integração de sinais aferentes do intestino e tronco encefálico assim como no processamento destes sinais que modulam a ingestão de alimento e o gasto energético. O hipotálamo é subdividido em núcleos interconectados, incluindo o núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN), núcleo ventromedial (VMN), núcleo dorsomedial (DMN) e área hipotalâmica lateral (AHL) (Figura 2). Caminhos neuronais entre estes núcleos estão organizados em uma complexa rede na qual circuitos influenciam a ingestão de alimentos e o gasto energético (Figura 1) (SCHWARTZ et al., 2000; MORTON et al., 2006; MURPHY, BLOOM, 2006; SIMPSON et al., 2009).

Neurônios hipotalâmicos expressam neuropeptídios orexígenos e anorexígenos que são mediadores chave no controle da homeostase energética. Neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada ao agouti (AgRP) do ARC e orexinas e Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) na área hipotalâmica lateral (AHL) compreendem neuropeptídios orexígenos hipotalâmicos importantes. Por outro lado, proopiomelanocortina (POMC) e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) no ARC, e fator liberador de corticotropina e ocitocina (OT) no PVN são mediadores anorexígenos envolvidos no controle da ingestão alimentar (UCHOA et al., 2012).

Inicialmente, vários experimentos com a utilização de lesões e estimulações de núcleos hipotalâmicos, sugeriram o papel de centro da saciedade ao VMN e de centro da fome a AHL (STELLAR, 1954). No entanto, estudos subsequentes mostraram que lesões de vários núcleos hipotalâmicos medio-basais resultavam em roedores obesos, diminuição da atividade física e distúrbios neuroendócrinos (OLNEY, 1969; DEBONS et al., 1977).

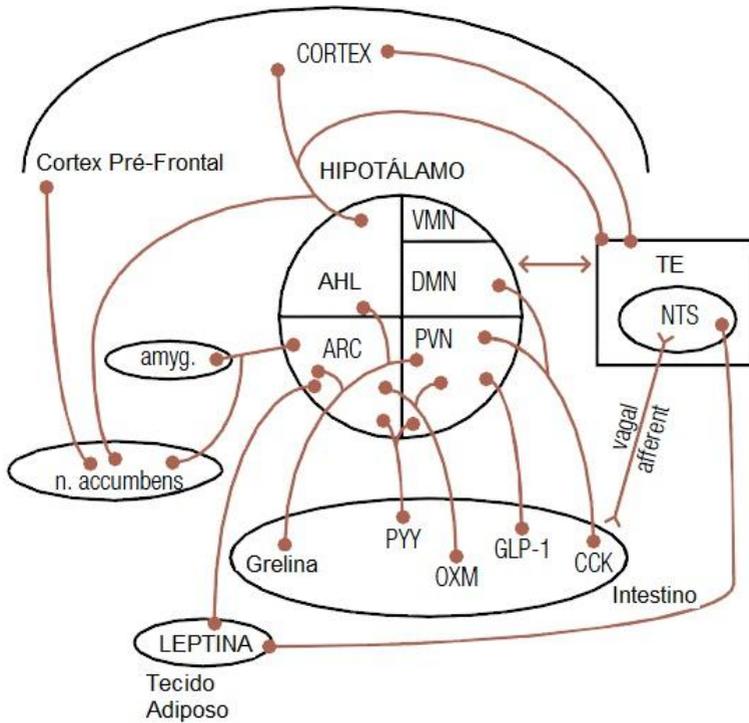


Figura 1: Conexões entre tronco encefálico, hipotálamo, áreas corticais e circuitaria de recompensa envolvidas com regulação do apetite. Estão representadas também projeções dos núcleos hipotalâmicos para o córtex pré-frontal, envolvidos na aversão condicionada ao sabor, assim como centros de recompensa tais como amígdala e núcleo accumbens. Hormônios intestinais, através de aferentes vagais agem em núcleos dentro do tronco encefálico que, por sua vez, sinalizam ao hipotálamo. Alguns hormônios intestinais podem também interagir diretamente em núcleos hipotalâmicos levados pela circulação e através de uma barreira hemato-encefálica incompleta. Adaptado de SIMPSON et al (2009).

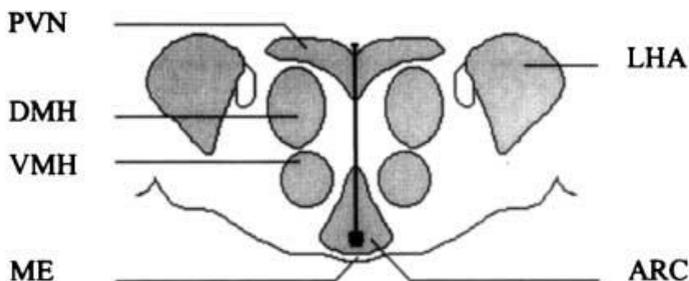


Figura 2: Anatomia do hipotálamo de rato. Secção coronal de hipotálamo mostrando as posições relativas do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), núcleo ventromedial (VMH), núcleo dorsomedial (DMH), núcleo paraventricular (PVN) e área hipotalâmica lateral (AHL). Adaptado de Williams et al, 2001.

Embora muitas outras áreas cerebrais envolvidas na regulação da ingestão de alimento sejam pesquisadas, o ARC recebe sinais da periferia por meio do tronco encefálico e barreira hemato-encefálica e, desta forma, desempenha um papel integrador na regulação homeostática da ingestão de alimento (BROADWELL, BRIGHTMAN 1976; NISWENDER, SCHWARTZ, 2003). NPY e AgRP estão co-localizados nos neurônios do ARC demonstrando que uma única célula neuronal pode conter múltiplas moléculas de efeito anabólico (HAHN et al., 1998; BROBERGER et al., 1998a); enquanto que POMC e CART estão co-localizados em um subconjunto distinto, porém adjacente de neurônios do ARC (ELIAS et al., 1998) indicando que circuitos originados nesta região cerebral possuem funções altamente especializadas na homeostase energética (SCHWARTZ et al., 2000) (Figura 3).

Alguns hormônios gastrintestinais, pancreáticos e do tecido adiposo tais como insulina (BANKS, 2004), leptina (BANKS et al., 1996), grelina, CCK, OXM e PYY (KASTIN et al., 2002; NONAKA et al., 2003), são transportados pela barreira hemato-encefálica e modulam a atividade dos neurônios do ARC que projeta eferências para outros núcleos hipotalâmicos, como o PVN, a AHL e o VMN. Nestes locais ocorre a liberação de mais peptídeos orexígenos ou anorexígenos para modular a ingestão de alimento e o balanço energético (Figura 1) (SCHWARTZ et al., 2000; STANLEY et al., 2005; BERTHOUD, 2007;

VALASSI et al., 2008; CHAPTINI, PEIKIN, 2008; SIMPSON et al., 2009).

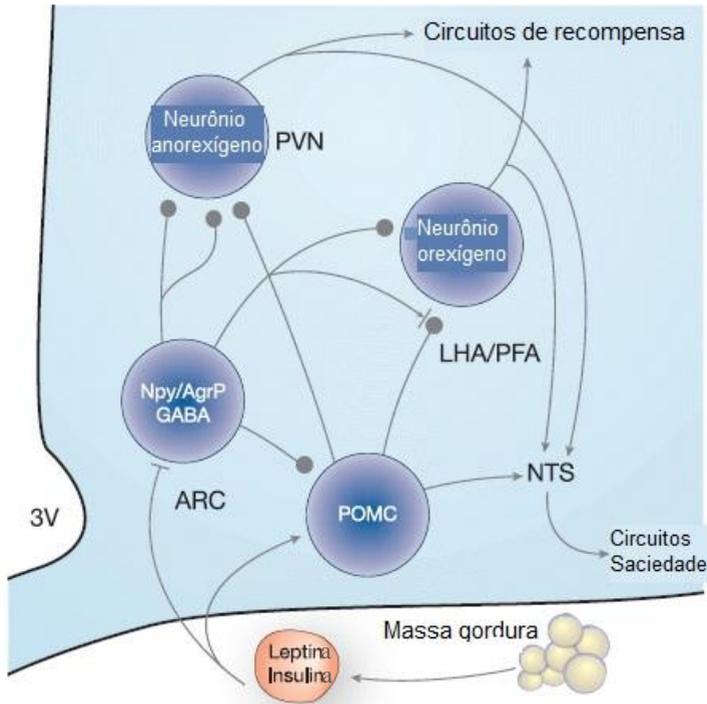


Figura 3: Neurocircuitos hipotalâmicos e mecanismo de transdução de sinal envolvidos na homeostase energética. (a) O núcleo arqueado (ARC) contém tanto os neurônios NPY/AgRP, que são inibidos pela insulina/leptina e quando ativados estimulam a ingestão de alimento; quanto neurônios POMC, que reduzem a ingestão e são estimulados também por insulina/leptina. Ambos grupos neuronais projetam-se para áreas hipotalâmicas adjacentes incluindo núcleo paraventricular (PVN), onde neurônios anorexígenos se concentram e a área hipotalâmica lateral (AHL), que contém neurônios orexígenos. Informações de cada um desses núcleos partem para áreas cerebrais envolvidas na percepção da saciedade (incluindo o núcleo do trato solitário, NTS) assim como na recompensa. NPY/AgRP também inibem neurônios POMC por meio da liberação sináptica do neurotransmissor inibitório GABA. Abreviaturas: PVN: Núcleo Paraventricular; AHL: Área Hipotalâmica Lateral /PFA: Área Perifornical; NTS: Núcleo do Trato Solitário; ARC: Núcleo Arqueado; POMC: Pró-ópiomelanocortina; NPY: Neuropeptídeo Y; AgRP: Proteína relacionada ao agouti; GABA: Ácido gama-aminobutírico. Adaptado de Morton et al., 2006.

Outras regiões hipotalâmicas envolvidas na regulação da ingestão de alimento são as AHL e APF. A AHL é vagamente definida e compreende uma população de neurônios grande e difusa, incluindo subpopulações definidas que expressam orexinas e hormônio concentrador de melanina (MCH). Terminais NPY são abundantes na AHL, em contato com células que expressam orexina e MCH, enquanto a APF contém alta densidade de receptores NPY-Y5 capazes de mediar os efeitos estimuladores do apetite do NPY (WILLIAMS et al., 2001). Na verdade, a APF compreende uma área mais sensível que o PVN para ação do NPY induzir a alimentação (STANLEY et al., 1993).

A AHL foi definida classicamente como o centro do apetite. Estimulação deste núcleo aumenta ingestão de alimento, enquanto que lesões atenuam a ingestão e causam perda de peso (WILLIAMS et al., 2001). A AHL recebe projeções neuronais do ARC e contém os neuropeptídeos orexigênicos MCH e orexinas. Terminais imunorreativos de NPY, AgRP e  $\alpha$ -MSH estão presentes em grande quantidade na AHL e fazem conexão com células que expressam MCH e orexinas (BROBERGER et al., 1998b). Fibras imunorreativas MCH também se projetam ao córtex, tronco encefálico e medula espinal. Em humanos, dois receptores MCH foram clonados, Mchr1 e Mchr2, sendo que em roedores somente o tipo 1 foi identificado. Camundongos *knockout* para Mchr1 possuem aumento no gasto energético, atividade locomotora e são resistentes à obesidade induzida pela dieta (CHEN et al., 2002). Em contraste, injeção de MCH no ventrículo lateral de ratos aumenta ingestão de alimento e jejum aumenta a expressão de RNAm de MCH (SIMPSON et al., 2009).

MCH consiste de um estimulante endógeno do comportamento ingestivo, e por isso camundongos com deficiência genética de MCH tem ingestão de alimento e reservas de gordura corporal diminuídas, o que sugere que MCH seja um determinante crítico da homeostase energética normal. Uma vez que neurônios MCH hipotalâmicos se projetam a diversas áreas do prosencéfalo e rombencéfalo, envolvidas na regulação da ingestão, eles podem fornecer uma conexão importante entre neurocircuitos hipotalâmicos que respondem a leptina e aqueles que estão envolvidos no controle de curto prazo da ingestão (WOODS et al., 2000). Injeções centrais de MCH aumentam a ingestão de alimento em ratos, e privação de alimento aumenta os níveis de RNAm para MCH. Em adição, camundongos *ob/ob* (deficiência de leptina) possuem níveis elevados de RNAm para MCH e esta superexpressão é normalizada pela administração de leptina. Portanto, MCH é um regulador da ingestão responsivo à leptina (ELMQUIST et al., 1998a).

Outra família de peptídeos desta região, as orexinas (também chamadas hipocretinas) (SAKURAI et al., 1998) são encontradas exclusivamente nos corpos celulares da AHL, e semelhantemente ao MCH, as suas fibras são distribuídas por todo o encéfalo. Orexinas A e B agem por meio de dois receptores, OX1R e OX2R e administração ICV destes peptídeos aumenta ingestão de alimento (SAKURAI, et al., 1998; SIMPSON et al., 2009). Injeções intracerebroventriculares de orexinas acentuam o comportamento ingestivo, e restrição alimentar aumenta o RNAm de orexina (SAKURAI et al., 1998; ELMQUIST et al., 1998a).

Os padrões de projeção dos neurônios da AHL sugerem que eles podem integrar a complexa fisiologia envolvida com o comportamento ingestivo, pois a AHL contém neurônios que potentemente estimulam ingestão de alimento e são abastecidos por fibras do estriado, córtex orbitofrontal, ARC e outras áreas hipotalâmicas cruciais na homeostase energética. Neurônios estimulatórios da ingestão de alimento da AHL parecem ser constrictos por uma inibição tônica que pode ser atenuada pela ativação de mecanismo de recompensa, assim iniciando programas motores que estimulam o comportamento ingestivo (KELLEY et al., 2005). Neurônios da AHL que se projetam ao NTS podem, adicionalmente, atenuar a resposta a sinais de saciedade, aumentando a quantidade de comida consumida durante uma refeição. Estas considerações suportam a visão da AHL como um nodo integrador para informações homeostáticas, de saciedade e relacionadas à recompensa que coletivamente governam os programas motores que ativam comportamento ingestivo (Figura 4) (MORTON et al, 2006).

Outras regiões hipotalâmicas também envolvidas com a ingestão de alimento incluem o PVN, DMN E VMN. O PVN é um local onde numerosos caminhos neuronais envolvidos no balanço energético convergem, incluindo projeções de neurônios NPY do ARC e outros contendo orexinas (ELMQUIST et al., 1998; WILLIAMS et al., 2000), o  $\alpha$ -MSH derivado da POMC e o peptídeo estimulador do apetite, galanina. Lesões deste núcleo produzem hiperfagia e obesidade, mas não é inteiramente claro se esses sintomas são devido aos danos causados nos próprios neurônios ou nas fibras passando através dessa região (WILLIAMS et al., 2000). Além disso, é rico em terminais contendo numerosos neurotransmissores e neuropeptídeos, incluindo NPY,  $\alpha$ -MSH, serotonina, galanina, noradrenalina e peptídeos opióides. O hormônio liberador de corticotropina (CRH) é expresso por neurônios no PVN que se projetam a eminência mediana (SARKAR, LECHAN, 2003) e podem inibir os neurônios que expressam NPY oriundos do

ARC. Além disso, o PVN desempenha um importante papel na integração de funções endócrinas, como por exemplo, a função tireoidiana (LEGRADI, LECHAN, 1999; FEKETE et al., 2000).

O DMN possui diversas conexões com outros núcleos hipotalâmicos mediais e com hipotálamo lateral, e serve como um integrador no processamento da informação das populações neuronais nestes sítios (ELMQUIST et al. 1998a; WILLIAMS et al, 2000). Lesões no DMN resultam em hiperfagia e obesidade (BERNARDIS, BELLINGER, 1987). Este núcleo contém um grande número de terminais NPY e  $\alpha$ -MSH originados no ARC. As fibras  $\alpha$ -MSH também se projetam do DMN ao PVN fazendo conexão com neurônios que contêm TRH (MIHALY et al, 2001; SIMPSON et al., 2009).

Estudos de neuroimagem em humanos mostraram uma sinalização aumentada na região do VMN após uma carga oral de glicose (MATSUDA et al., 1999). O VMN contém uma grande população de neurônios glicorresponsivos e recebe projeções neuronais NPY, AgRP e POMC do ARC. Recentemente, o VMN foi identificado como alvo chave para leptina, que age no hipotálamo inibindo a alimentação, estimulando gasto energético e causando perda de peso (WILLIAMS et al., 2000; SIMPSON et al., 2009).

Todas essas regiões hipotalâmicas sofrem influência de aproximadamente 25 substâncias participantes na regulação do comportamento ingestivo, que já foram identificadas. Dentre elas, podem ser citadas algumas aminas, como serotonina, noradrenalina, dopamina e histamina; e alguns aminoácidos como ácido glutâmico (glutamato) e GABA (KALRA et al., 1999).

A serotonina (5-HT) é implicada em muitas funções mediadas pelo SNC que incluem atividade motora, resposta ao estresse, sono e comportamento alimentar (DOURISH et al., 1985; BLUNDELL, 1986; SIMANSKY, 1996; RUETER et al., 1997; BICKERDIKE et al., 1999). Pesquisas realizadas nos últimos 30 anos sugerem que a serotonina desempenha um papel importante no controle do comportamento ingestivo (SIMANSKY, 1996; FEIJÓ et al, 2010). Desta forma, torna-se imprescindível o estudo dos mecanismos pelo qual o sistema serotoninérgico atua modulando a ingestão de alimento e este sistema será abordado mais detalhadamente a seguir.

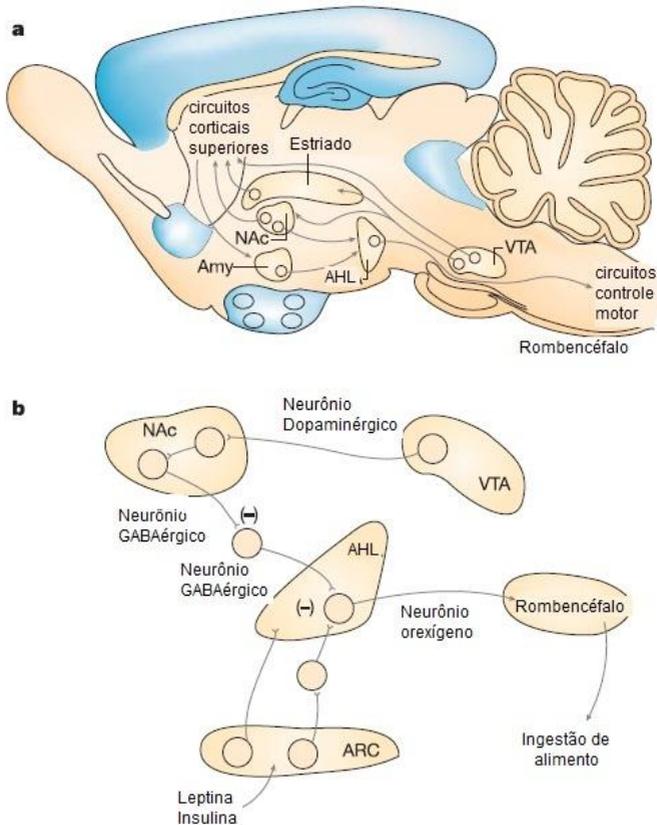


Figura 4: Modelo para integração de informações relacionadas à recompensa e adiposidade. (a) Neurônios na VTA do mesencéfalo projetam-se a áreas do prosencéfalo, incluindo NAcc, estriado e córtex, e designam valor de recompensa à comida palatável. (b) Percepção de prazer associado com consumo de comida palatável envolve ativação neuronal no NAcc e estriado, os quais desinibem a AHL e, assim estimulam a alimentação. Abreviações: Amy: amígdala; GP: globo pallidus; NAcc: núcleo accumbens; VTA: área tegmental ventral; AHL: área hipotalâmica lateral; ARC: núcleo arqueado. Adaptado de Morton et al, 2006.

## 1.2 O sistema serotoninérgico

Serotonina era o nome dado, no século passado, a uma substância vasoconstritora desconhecida, encontrada no soro após coagulação

sanguínea. Em 1948, foi identificada quimicamente como 5-hidroxitriptamina (5-HT) e demonstrou-se que se originava das plaquetas (RAPPORT et al., 1948). Em seguida, foi detectada no TGI e no SNC, tendo sido constatado que atua tanto como neurotransmissor quanto como hormônio local no sistema vascular periférico (TWAROG, 1953).

A serotonina é um importante neurotransmissor e está relacionada com a modulação de diversas funções importantes no sistema nervoso, como liberação de alguns hormônios, sono, temperatura corporal, regulação do apetite, humor, atividade motora e funções cognitivas (para revisão ver FEIJÓ et al., 2010) e tem sido associada a algumas patologias, como transtornos de ansiedade, fobia social, esquizofrenia, transtorno obsessivo-compulsivo, desordens do pânico, hipertensão e transtornos de alimentação (HOYER et al., 2002; GREEN, 2006; LAM, HEISLER, 2007; LAM et al., 2010).

### **1.2.1 Síntese e metabolismo de serotonina**

A serotonina (5HT) é sintetizada em duas etapas a partir do aminoácido essencial L-triptofano, o qual é adquirido a partir da dieta. Primeiramente, triptofano é hidroxilado na posição 5 do anel indol pela triptofano hidroxilase, gerando 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Este, por sua vez, é então descarboxilado pela enzima aminoácido L-aromático descarboxilase, resultando em serotonina. Uma vez sintetizada, serotonina é armazenada no interior de vesículas em preparação para exocitose sináptica e após liberada é metabolizada a ácido 5-hidroxiincolacético (5-HIAA) pela enzima mitocondrial monoamino oxidase A (MAO A) e aldeído desidrogenase (Figura 5) (GRAHAME-SMITH, 1967; LAM, HEISLER, 2007).

### **1.2.2 Subtipos e localização dos receptores**

No cérebro, corpos celulares serotoninérgicos estão localizados no núcleo da rafe do tronco encefálico, agrupados em nove grupos designados B1 a B9. Neurônios serotoninérgicos se projetam para virtualmente todas as áreas do cérebro e medula espinhal. Os grupos de células caudais, B1 a B4, originam a maioria das projeções descendentes, e o grupo rostral, B5 a B9, originam a maioria das fibras ascendentes. Fibras serotoninérgicas descendentes se projetam para a

substância cinzenta da maioria dos segmentos espinhais, e numerosas regiões bulbares, pontinas e mesencefálicas, assim como áreas do cerebelo. Fibras ascendentes congregam no fascículo prosencefálico medial antes de divergir para inervar diversos alvos do prosencéfalo, incluindo córtex, hipocampo, tálamo, hipotálamo, estriado, amígdala e núcleo accumbens. (TRULSON, JACOBS, 1979; LAM, HEISLER, 2007) (**Figura 6**).

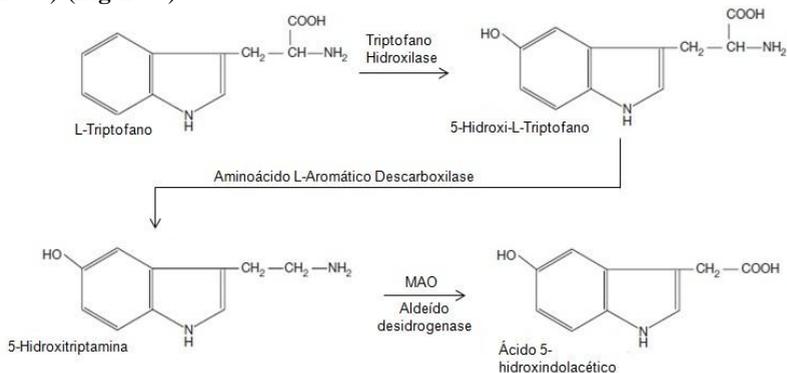


Figura 5: Síntese e metabolismo da serotonina. A serotonina é sintetizada a partir do L-triptofano. Este é hidroxilado na posição 5 no anel indol pela triptofano hidroxilase, gerando 5-hidroxitriptofano (5-HTP). 5-HTP é descarboxilada pela aminoácido L-aromático descarboxilase, fornecendo 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina). Serotonina é metabolizada por uma deaminação pela ação da monoamino oxidase (MAO) e desidrogenação pela aldeído desidrogenase, gerando como metabólito principal ácido 5-hidroxiindolacético. Adaptado de LAM, HEISLER, 2007.

A serotonina produz seus efeitos por meio de uma grande variedade de receptores acoplados à membrana. A 5-HT e seus receptores são encontrados tanto no SNC quanto no Sistema Nervoso periférico, assim como em alguns tecidos não neuronais no intestino, sistema cardiovascular e sangue (HOYER et al., 2002). Os subtipos de receptores serotoninérgicos tem sido agrupados em famílias de acordo com o sistema de segundos mensageiros à eles envolvidos assim como suas homologias sequenciais. Há 7 famílias de receptores serotoninérgicos, designados 5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>, sendo divididas em 16 subtipos diferentes: 5-HT<sub>1</sub> (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> e 5-HT<sub>1F</sub>); 5-HT<sub>2</sub> (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>); 5-HT<sub>3</sub> (5-HT<sub>3A</sub>, 5-HT<sub>3B</sub>, 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub> e 5-HT<sub>3E</sub>); 5-HT<sub>4</sub>; 5-HT<sub>5</sub> (5HT<sub>5A</sub> e 5-HT<sub>5B</sub>); 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> (LAM, HEISLER, 2007).

Com exceção do receptor 5-HT<sub>3</sub>, todos os receptores são acoplados a proteína G, que quando ativada por estímulos exteriores, leva a ativação ou inibição de enzimas amplificadoras no meio intracelular, desencadeando uma cascata de eventos, o que caracteriza o processo de transdução de sinal. Já o receptor 5-HT<sub>3</sub> está acoplado ao canal iônico, formado por proteínas transmembrana que permitem a passagem de íons pela camada lipídica da membrana plasmática. Dentre todos os subtipos de receptores, o 5-HT<sub>1A</sub> tem sido o mais estudado e caracterizado atualmente (KROEZE et al., 2002, MOURA, VIDAL, 2011).

O receptor 5-HT<sub>1A</sub> foi o primeiro receptor 5-HT a ser completamente sequenciado, consiste em um receptor acoplado à proteína G inibitória (Gi) que resulta em hiperpolarização quando ativado. Este receptor é dividido em duas diferentes classes, conforme sua localização: pré ou pós-sinápticos. Uma vez que os neurônios serotoninérgicos são originados nos núcleos da rafe, os receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados nos dendritos e corpos celulares de neurônios 5-HT que emergem do núcleo da rafe para inervar o cérebro e a medula espinal, são considerados pré-sinápticos. Por outro lado, os receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos estão localizados em diferentes regiões do cérebro, como hipocampo, córtex entorrinal e frontal, septum lateral, amígdala e várias regiões do hipotálamo e núcleos talâmicos que recebem terminações 5-HT (BARNES, SHARP, 1999). Apesar dos receptores pré e pós-sinápticos serem semelhantes geneticamente, eles apresentam diferentes perfis farmacológicos (BERMACK, DEBONNEL, 2007).

### **1.2.3 Regulação serotoninérgica da ingestão de alimento**

A 5-HT tem um importante papel em funções fisiológicas tais como sono, alimentação, comportamento sexual, regulação da temperatura, resposta ao estresse, memória, dor e cognição (POLTER, LI, 2010). Com relação ao comportamento ingestivo, a 5-HT é conhecida pelo seu papel como uma molécula anorexígena (CURZON, 1990), e é implicada tanto no processo de saciação quanto saciedade (BLUNDELL et al., 1986). O hipotálamo parece ser o local onde a 5-HT exerce seus efeitos anorexígenos no controle central da alimentação, talvez, pelo menos em parte, por meio da interação com os neurônios que produzem os peptídeos hipotalâmicos (DRYDEN et al., 1995; 1996; JAHNG et al., 1998; CURRIE et al., 2002; MOON et al., 2010).

O efeito hipofágico da 5-HT e de seus agonistas parece ser mediado por diversos subtipos de receptores pós-sinápticos localizados em circuitos hipotalâmicos (BOVETTO, RICHARD, 1995). Na literatura são descritos inúmeros relatos de estudos com drogas serotoninérgicas mostrando que a ativação de receptores 5-HT<sub>1B</sub> ou 5-HT<sub>2C</sub> reduz a ingestão alimentar (KENNETT, CURZON, 1988; SAMANIN et al., 1989; DOURISH, 1995; HALFORD, BLUNDELL, 1996; HEWITT et al., 2000; DALTON et al., 2006). Por outro lado, a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pode causar hiperfagia (DOURISH et al., 1985; 1988; GILBERT, DOURISH, 1987; EBENEZER, 1992a; CURRIE, COSCINA, 1993; COSCINA et al., 1994; PARKER, COSCINA, 2001; EBENEZER, SURUJBALLY, 2007) ou redução na ingestão de alimento (EBENEZER, 1992b; EBENEZER et al., 1999; ARKLE, EBENEZER, 2000; COSCINA et al., 2000; EBENEZER et al., 2001; EBENEZER, TITE, 2003; EBENEZER et al., 2007; LOPEZ-ALONSO et al., 2007).

Estudos revelam a participação dos receptores serotoninérgicos na modulação da ingestão de alimento. Segundo Heisler et al. (2002; 2006), os receptores 5-HT<sub>2C</sub> provocam estimulação de neurônios que expressam POMC, precursor do neuropeptídeo anorexígeno  $\alpha$ -MSH, o que levaria à uma hipofagia. Isto pode ser confirmado quando se observa que camundongos *knockout* para este receptor apresentaram-se hiperfágicos e obesos (NONOGAKI, 2008). Por outro lado, a ativação dos receptores 5HT<sub>1B</sub> inibe a atividade neuronal de neurônios que expressam AgRP (orexígeno) e reduz os sinais inibitórios pós-sinápticos sobre os neurônios que expressam POMC (HEISLER et al., 2006). Camundongos *knockout* para receptor 5HT<sub>1B</sub> exibiram aumento no peso corporal e hiperfagia proporcional, porém não apresentaram obesidade (BOUWKNECHT et al., 2001).

Agonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> aumentam a ingestão de alimento (DOURISH et al., 1985), o que pode ser atribuído à função deste receptor como um autorreceptor inibitório em neurônios da rafe. Especificamente, a ativação de autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> resulta em diminuição da liberação de serotonina no terminal, que pode consequentemente reduzir o envolvimento serotoninérgico em vias anorexígenas. Ainda neste contexto, injeção direta de um agonista do receptor 5HT<sub>1A</sub> no núcleo mediano ou dorsal da rafe já seria suficiente para induzir hipofagia (BENDOTTI, SAMANIN, 1986).



de 8-oh-dpat (EBENEZER, 1992b), gespirona (EBENEZER, TITE, 1995) e buspirona (EBENEZER, 1996), que aumentam ingestão em ratos não privados suprimem a ingestão em animais privados de alimento. Estudos neuroquímicos sugerem que o aumento na ingestão de alimento observado após a administração do agonista de receptor  $5HT_{1A}$  é mediado por uma ação em autorreceptores  $5HT_{1A}$  no núcleo da rafe (EBENEZER, 1992a). No entanto, não é claro se os efeitos hipofágicos desses agentes sejam mediados por uma ação em receptores  $5HT_{1A}$  pré ou pós-sinápticos (ARKLE, EBENEZER, 2000).

Um grande número de antagonistas de receptor  $5HT_{1A}$ , incluindo BMY7378, NAN-190, MDL73005 EF, SDZ 216525, (S)-UH-301, WAY 100135, WAY 100635 (HILLVER et al., 1990; BJORK et al., 1991; FLETCHER et al., 1993a,b, 1996) e NAD-299 (JOHANSSON et al., 1997) foram identificados em vários modelos que avaliaram funções do receptor  $5-HT_{1A}$  pós-sináptico. No entanto, estas drogas não são seletivas e também demonstraram propriedades de agonistas parciais (SHARP et al., 1990, 1993; FLETCHER et al., 1993a,b; HOYER, BODDEKE, 1993; SCHOEFFTER et al., 1997), o que dificulta seu uso como sondas para o receptor  $5HT_{1A}$ . Mais recentemente, foi desenvolvido o antagonista seletivo de receptor pós-sináptico  $5HT_{1A}$  1-(2-methoxyphenil)-4-(4-succinimidobutyl) piperazine (MM-77) (MOKROSZ et al., 1994), sendo que seus efeitos estão sendo estudados na ansiedade por meio da ativação de receptores  $5-HT_{1A}$  (GRIEBEL et al., 2000; WESOLOWSKA et al., 2003), mas seus efeitos na ingestão de alimento ainda não estão completamente elucidados.

Neste estudo, utilizaremos o antagonista seletivo pós-sináptico, MM-77, para avaliar se o efeito hipofágico gerado pela injeção central de 8-OH-DPAT na área hipotalâmica lateral é mediado por receptor pré ou pós-sináptico.

No que diz respeito à relação entre a serotonina e os hormônios sexuais, sabe-se que roedores machos e fêmeas diferem em inúmeros fatores na função serotoninérgica (FISHETTE et al., 1984; KENNETT et al., 1986). Múltiplos índices bioquímicos de função  $5-HT$  variam durante o ciclo estral feminino (BIEGON et al., 1980; FLUDDER, TONGE, 1975; UPHOUSE et al., 1986) e efeitos dos hormônios gonadais na função serotoninérgica são relativamente distribuídos e incluem influências na síntese, liberação, recaptção e catabolismo (BIEGON et al., 1980; BIEGON et al., 1983; DIPAOLO et al., 1983; LADISICH, 1974; REHAVI et al., 1987; MASWOOD et al., 1995). Estes efeitos, por sua vez, influenciam as diversas funções desempenhadas pela serotonina no SNC, como, por exemplo, a ingestão

de alimento e, desta forma, o estudo da influência dos hormônios gonadais sobre a ingestão alimentar torna-se de grande relevância e será abordada nos tópicos a seguir.

### **1.3 Influência do ciclo ovariano na ingestão alimentar**

#### **1.3.1 Características hormonais do ciclo estral**

A rata possui um ciclo estral que ocorre em intervalos de 4-5 dias durante toda sua vida reprodutiva, exceto durante a gravidez, pseudogravidez e lactação (LONG, EVANS, 1922; BLANDAU et al., 1941; FREEMAN, 1994). O  $17\beta$ -estradiol (E2) e a progesterona são os hormônios produzidos em maior quantidade pelos ovários. Durante o ciclo estral, estes hormônios agem no cérebro para estimular os eventos hormonais que resultam em ovulação e comportamentos sexuais (MCCARTHY, BECKER, 2002).

O ciclo ovariano da rata inicia com uma fase de duração de cerca de dois dias, sendo o primeiro dia, conhecido como diestro 1 ou metaestro, e o segundo dia conhecido como diestro 2 ou diestro. Esta fase começa com o desenvolvimento de folículos pelos oócitos, sendo que baixas concentrações de FSH (hormônio folículo estimulante) da hipófise estimulam o desenvolvimento folicular. Outro fenômeno observado é o aumento na esteroidogênese causada pela estimulação por LH (hormônio luteinizante). A secreção de E2 aumenta gradualmente durante esta fase (**Figura 7B**) (MCCARTHY, BECKER, 2002).

O momento antes e depois da ovulação é dinâmico. Concentração de E2 aumenta, agindo no cérebro para desencadear a liberação de GnRH, que induz um pico de LH da hipófise para resultar em ovulação. A progesterona aumenta algumas horas antes da ovulação e contribui para este processo. Na rata, esta fase é chamada proestro (MCCARTHY, BECKER, 2002). Liberação máxima de E2 do ovário começa 18 horas antes da ovulação (FREEMAN et al., 1974; FREEMAN, 1994). Um aumento significativo da progesterona ocorre 4-6 horas após o pico de E2, durante a tarde do proestro. Uma vez que LH e progesterona são liberadas na circulação, a ovulação ocorre após 10-12 horas (figura 7B) (BECKER et al., 2005).

A fase do estro é o período de receptividade sexual e o dia real da ovulação. A receptividade sexual ocorre imediatamente após o início da fase escura do ciclo claro/escuro e precede a ovulação em algumas horas

na maioria dos animais. Ovulação, induzida pelo pico de LH no proestro, ocorre 10-13 horas após o pico (FREEMAN et al., 1970) e a receptividade sexual persiste por 10-12 horas (BECKER et al., 2005).

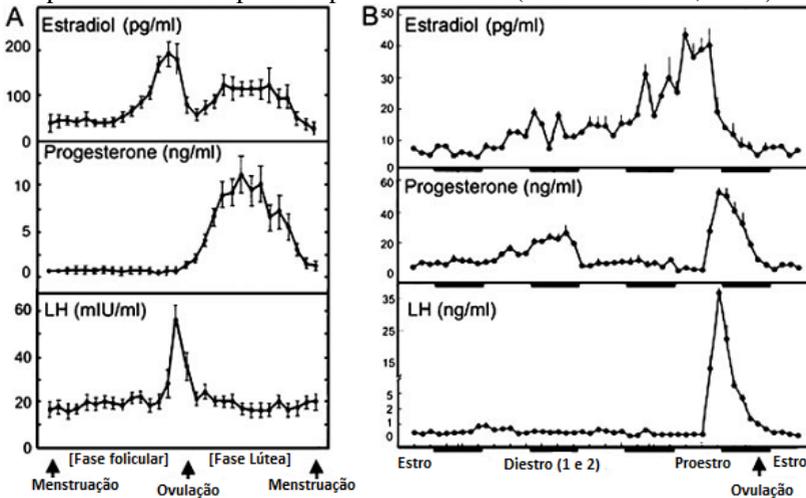


Figura 7: Padrões de estradiol, progesterona e LH em humanos (A) e ratos (B) durante o ciclo reprodutivo. Unidade de tempo no eixo x em A está representado em dias; em B está representado em horas. Barras escuras em B indicam período escuro do ciclo claro/escuro. Nota-se que durante a fase folicular em humanos e sua fase análoga no rato (diestro), secreção de  $17\beta$ -estradiol aumenta, mas de progesterona permanece baixa. Após o pico de LH, a progesterona se eleva em humanos e ratos. Em humanos, o corpo lúteo também secreta  $17\beta$ -estradiol, enquanto que no rato durante a breve fase lútea, a concentração de  $17\beta$ -estradiol diminui. Adaptado de Becker et al, 2005.

### 1.3.2 Ciclo ovariano e ingestão de alimento

Os hormônios sexuais estrogênio e progesterona estão envolvidos na complexa regulação do apetite, da ingestão e do metabolismo energético. Na maioria das espécies, ingestão de alimento e funções reprodutivas estão intimamente ligadas de forma que durante as diferentes fases hormonais do ciclo estral, a ingestão de alimento diária varia (RACINE et al., 2012). Desordens alimentares e obesidade estão se tornando cada vez mais preocupantes e estão acopladas a severas morbidades e mortalidades. Pesquisas recentes designadas a elucidar os mecanismos e fornecer estratégias para prevenção e tratamento destes

problemas de saúde têm revelado novos conhecimentos a respeito da regulação do apetite e comportamento ingestivo por hormônios sexuais (HIRSCHBERG, 2012).

Hormônios sexuais interagem com peptídeos gastrintestinais e neurotransmissores para alcançar o controle central do apetite e do gasto energético, enquanto também exercem ação periférica direta em adipócitos (ASARIAN, GEARY, 2006; HIRSCHBERG, 2012). Estes efeitos podem ser confirmados quando se verifica que ratas ooforectomizadas apresentam aumento na ingestão alimentar e, concomitantemente, no peso corporal e estes efeitos podem ser revertidos pela restauração dos níveis fisiológicos de estradiol (BUTERA, 2010).

Existe evidência que os efeitos do E2 na ingestão são mediados por receptores de estrogênio no hipotálamo e no núcleo do trato solitário. No entanto, o subtipo de receptor responsável pelos efeitos do E2 na ingestão de alimento (Receptor de Estrogênio ER $\alpha$  ou ER $\beta$ ) permanece incerto (LIANG et al., 2002; BUTERA, 2010; SANTOLLO et al., 2010). Além disso, estes efeitos parecem envolver diversos mecanismos diferentes. Por exemplo, estradiol potencializa o efeito de saciedade do peptídeo CCK (LINDÉN et al., 1990; GEARY, 2001), enquanto atenua a atividade orexígena da grelina (CLEGG et al., 2007). Outro efeito que foi verificado é a estimulação pelo estradiol da atividade anorexígena POMC/CART e inibição dos neurônios orexígenos NPY/AgRP no ARC (SOTONYI et al., 2010; OLOFSSON et al., 2009). Em contraste ao estrogênio, progesterona sozinha não influencia significativamente o comportamento ingestivo em ratas ooforectomizadas, exceto quanto administrada em doses farmacológicas, não-fisiológicas (BUTERA, 2010). No entanto, na presença de estrogênio, a progesterona estimula apetite e promove ganho de peso (WADE, SCHNEIDER, 1992).

Em fêmeas de numerosas espécies, comportamento ingestivo está intimamente ligado ao funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG). Por exemplo, tanto fêmeas roedoras quanto primatas ingerem menos durante a fase do ciclo estral que antecede e sucede a ovulação, quando elas estão sexualmente receptivas e ativas (ASARIAN, GEARY, 2006). Similarmente no caso de mulheres, ingestão de alimento varia durante as diferentes fases do ciclo menstrual. As variações cíclicas da ingestão de alimentos têm sido documentadas em diversos estudos (BUFFENSTEIN et al., 1995; DYE, BLUNDELL, 1997; CROSS et al., 2001; BRYANT et al., 2006).

Assim, uma meta-análise revelou que a média de ingestão de alimento é mais baixa durante a fase peri-ovulatória do ciclo menstrual, quando níveis de estradiol estão altos (BUFFENSTEIN et al., 1995). Em contraste, um pico na ingestão de alimento ocorre durante a fase pré-menstrual, quando progesterona está aumentada (BUFFENSTEIN et al., 1995; DYE, BLUNDELL, 1997; CROSS et al., 2001; BRYANT et al., 2006). Além disso, a compulsão alimentar pode ser mais pronunciada durante período pré-menstrual (KLUMP et al., 2008), um processo que pode envolver baixos níveis de serotonina cerebral (CROSS et al., 2001).

O estrogênio parece inibir ingestão de alimentos por meio dos ERs para aumentar sinalização anorexígena mediada por peptídeos tais como CRH (DAGNAULT et al., 1993), e para diminuir os sinais orexígenos, tais como NPY (BASKIN et al., 1995), no hipotálamo. Apesar de existir dois receptores nucleares, ER $\alpha$  e ER $\beta$ , os efeitos inibitórios de E2 na ingestão parecem ser mediados principalmente por ER $\alpha$ . Camundongos *knockout* para ER $\alpha$  têm aumento no peso corporal e na ingestão de alimento, quando comparados com controles selvagens (HEINE et al., 2000) e após ooforectomia, tratamento com E2 não diminui a ingestão (GEARY et al., 2001). Adicionalmente, estudos farmacológicos demonstraram que um agonista de ER $\alpha$ , mas não de ER $\beta$  diminuiu a ingestão de alimento em ratos e camundongos (ROESCH, 2006; SANTOLO et al., 2007; THAMMACHAROEN et al., 2009) e que o bloqueio de ER $\alpha$ , mas não de ER $\beta$  com antagonistas seletivos previne o efeito inibitório do E2 endógeno e exógeno na ingestão alimentar (SANTOLLO et al., 2010). E2 também age no hipotálamo como um importante regulador do pico do hormônio luteinizante (LH), exercendo ações de feedback positivo na liberação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), sendo que a secreção subsequente de LH da hipófise desencadeia ovulação (YOUNG, JAFFE, 1976). Isto parece ser mediado por receptores ER $\alpha$  (SANTOLLO et al., 2012).

Estudos conduzidos em nosso laboratório avaliaram os efeitos das injeções locais de metergolina (MET – antagonista de receptor 5-HT $_1$  e 5-HT $_2$ ) ou de 8-OH-DPAT na AHL sobre o comportamento ingestivo de ratas durante o período diurno do diestro e estro e adaptadas a comer uma ração enriquecida com 10% de sacarose. Os resultados mostraram que 8-OH-DPAT injetado na AHL reduziu significativamente a quantidade de alimento ingerido em ambos os estágios do ciclo, porém reduziu a duração da resposta de ingestão somente em estro. A ingestão de alimentos diminuiu após a injeção de MET na AHL de ratas durante

as fases de estro e diestro. Estes resultados indicam que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizado na AHL participam dos mecanismos serotoninérgicos de controle da ingestão de alimento. Estes circuitos encontrados no hipotálamo são, possivelmente, afetados por hormônios ovarianos que poderiam aumentar a sensibilidade dos neurônios da AHL para os efeitos hipofágicos de 8-OH-DPAT ou aumentar a eficácia de sinais de saciedade que terminam a alimentação. Além disso, este estudo indicou que circuitos serotoninérgicos localizados na AHL não exercem uma atividade inibitória tônica sobre circuitos neuronais relacionados com a ingestão de alimento (STEFFENS et al., 2008).

Investigações posteriores mostraram que o pré-tratamento da AHL com WAY100635 (antagonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>) suprimiu o efeito hipofágico provocado pelo 8-OH-DPAT durante as fases de estro e diestro. Esses resultados reforçam a participação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> da AHL em circuitos serotoninérgicos de controle da ingestão de alimento e que estes circuitos são afetados por secreção dos hormônios ovarianos (STEFFENS et al., 2010).

Desta forma, a proposta do presente estudo pretende estender a investigação sobre a participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da AHL no controle da ingestão de alimentos, avaliando a localização (pré ou pós-sináptica) do receptor 5-HT<sub>1A</sub> neste circuito.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Determinar a localização (pré ou pós-sináptica) dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> nos circuitos serotoninérgicos da Área Hipotalâmica Lateral que controlam a ingestão de alimento, bem como verificar a possível influência dos hormônios gonadais sobre os efeitos da injeção intrahipotalâmica de MM-77 sobre a resposta hipofágica induzida pelo 8-OH-DPAT em ratas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da injeção de uma dose de 6 nmol/200nL de 8-OH-DPAT na AHL sobre a ingestão de alimentos nas fases estro e diestro de ratas;
- Avaliar os efeitos da injeção de MM-77, em duas doses (0,37 e 0,74 nmol/200nL), na AHL sobre a ingestão de alimentos nas fases estro e diestro de ratas;
- Avaliar os efeitos da injeção de 8-OH-DPAT na AHL sobre a ingestão de alimentos nas fases de estro e diestro de ratas pré-tratadas com MM-77;
- Avaliar possíveis alterações na ingestão de água (latência, duração, frequência e quantidade), bem como nas durações dos comportamentos não ingestivos (exploração vertical, locomoção, auto-limpeza, exploração não locomotora e imobilidade).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos desse estudo foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e os protocolos de experimentação foram submetidos à apreciação do Comitê de Ética ao Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob n° PP00526.

#### 3.1 Animais

Foram operadas 251, porém foram utilizadas 107 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) adultas, com peso corporal variando entre 200 a 250 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram adaptados durante 7 dias às condições ambientais do biotério setorial, com temperatura controlada entre  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  e um ciclo claro/escuro de 12 horas (luz das 7-19 h). Foram mantidos em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm), forradas com maravalha, dispendo de água e alimento granulado (CR-1, Nuvilab – Nuvital Nutrientes, Brasil) *ad libitum*. Durante esse período os animais foram manipulados somente durante a limpeza das caixas, a cada dois dias. Dentre os animais excluídos do estudo estão aqueles que: ciclo estral difere de 4-5 dias, as injeções estavam fora do local de estudo, o capacete caiu após cirurgia, o vídeo ficou inutilizável por falhas técnicas, a droga não difundiu pelo PE10 por entupimento da cânula guia, permaneceram em temperatura diferente de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  por mais de 2 dias devido às condições precárias do biotério setorial.

#### 3.2 Procedimento cirúrgico

Previamente ao ato cirúrgico, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina/cloridrato de ketamina (13 mg/Kg de xilazina; 87 mg/Kg de cloridrato de ketamina – Laboratório König, S.A.) administrada intraperitonealmente. Em seguida, os animais foram adaptados ao aparelho estereotáxico (Insight, modelo Insight Instruments, Ribeirão Preto, SP, BRA) tendo a cabeça fixada por

intermédio de barras posicionadas nos condutos auditivos e incisivos superiores.

Uma incisão longitudinal foi realizada no escalpo, após antisepsia com álcool, com subsequente ressecção do periósteo para exposição da calota craniana e melhor visualização das estruturas de referência. Em seguida, uma cânula-guia (0,6 mm de diâmetro externo e 18 mm de comprimento), confeccionada a partir de agulha hipodérmica de 23G (Becton Dickinson Indústria Cirúrgica, Brasil), foi posicionada 2 mm acima da Área Hipotalâmica Lateral (AHL) para não lesionar o núcleo, sendo as coordenadas: plano frontal (posterior bregma) -3,6 mm, plano sagital (lateral a sutura sagital) 1,5 mm e plano horizontal (abaixo da calota craniana) -7,2 mm; conforme descrito por Paxinos e Watson (2007).

Após determinada a posição, realizou-se um orifício na calota craniana com uma broca esférica de uso odontológico. A cânula-guia foi introduzida e fixada à calota craniana por meio de 2 parafusos de aço inoxidável, acrílico polimerizável líquido (monômero de metil metacrilato – Laboratório Dencril, Brasil) e pó acrílico (co-polímero metil metacrilato - Laboratório Artigos Odontológicos Clássicos Ltda, Brasil). Um mandril de aço inoxidável foi posicionado no interior da cânula-guia para prevenir sua obstrução.

Ao final do procedimento cirúrgico os animais retornaram ao biotério setorial, onde foram mantidos individualmente em caixas de polipropileno com ração e água *ad libitum*. Após um período de 7 a 10 dias de recuperação iniciaram-se os procedimentos experimentais.

### **3.3 Determinação da fase do ciclo estral**

A identificação das diferentes fases do ciclo foi realizada por análise de esfregaço vaginal, coletado diariamente entre 12h00 e 13h00, a partir do sétimo dia após procedimento cirúrgico. As amostras foram coletadas com pipeta de plástico contendo 10 µl de solução salina (NaCl 0,9%) inserida no intróito vaginal da rata. O fluido vaginal contido no interior da pipeta foi depositado sobre lâminas de vidro, sendo utilizada uma lâmina por rata. Em seguida, a lâmina foi observada sob luz de microscópio ótico com lentes objetivas de 10X e 40X. As amostras do epitélio vaginal foram examinadas por dois observadores independentes para avaliação da fase do ciclo, que foi determinada utilizando-se os critérios-padrão adotados por Becker et al. (2005) ou Freeman (2006), descritos a seguir:

- Proestro: Predominância de células epiteliais nucleadas e grandes, com ausência de leucócitos e eventualmente, presença de pequenos nichos de células vaginais cornificadas;
- Estro: Consiste primariamente de células cornificadas anucleadas e células vaginais escamosas;
- Metaestro: Possui mesma proporção entre células epiteliais nucleadas, células cornificadas e leucócitos;
- Diestro: Grande predominância de leucócitos e, ocasionalmente, interpostos com células epiteliais nucleadas.

A caracterização de cada fase do ciclo estral foi realizada pelas proporções encontradas entre os três tipos celulares: células epiteliais nucleadas, células cornificadas anucleadas e leucócitos. Neste estudo, foram utilizadas somente ratas com ciclo estral regular de 4-5 dias.

### 3.4 Soluções e doses administradas

As doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios sobre efeitos da injeção central de 8-OH-DPAT (STEFFENS et al., 2008, 2010), efetiva em influenciar seletivamente o comportamento ingestivo; e de MM-77 (MOKROSZ et al., 1994; GRIEBEL et al., WESOLOWSKA et al., 2003), baseando-se nas doses de WAY 100635 efetivas em aumentar o comportamento de esQUIVA inibitória em estudos realizados no labirinto em cruz elevado (SANTOS et al, 2005).

As seguintes drogas e doses foram utilizadas:

- Solução de ácido ascórbico 5% (estéril, livre de pirógenos, pH 7,4) utilizada nos experimentos de controle (volume de 0,2 µl intra-hipotalâmica) e também como veículo das demais drogas;
- 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT; agonista seletivo de receptor 5-HT<sub>1A</sub>) na dose de 6 nmol;
- 1-(2-methoxyphenyl)-4-(4-succinimidobutyl) piperazine (MM-77; antagonista seletivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos), administrado 10 min antes do veículo ou da dose efetiva de 8-OH-DPAT, nas doses de 0,37 e 0,74 nmol.

### 3.5 Injeções intracerebrais

As soluções foram injetadas por meio de uma agulha injetora (0,3 mm de diâmetro e 20 mm de comprimento), confeccionada a partir de

agulha gengival 30G (Injecta Produtos Odontológicos, Brasil), que foi introduzida na cânula-guia e conectada por um tubo de polietileno (PE 10) a uma microseringa Hamilton de 1  $\mu$ l. A agulha injetora excedeu o tamanho da cânula-guia em 2 mm. Com o objetivo de minimizar variações na pressão intracerebral, as soluções foram administradas no período de 1 min, em animais despertos, seguido de 1 min de espera com a agulha no sítio de injeção para permitir melhor difusão da solução pelo parênquima e evitar refluxo da mesma. O volume injetado foi sempre de 0,2  $\mu$ l, independente da condição de tratamento.

### 3.6 Procedimento experimental

Sete dias após a implantação da cânula-guia os animais (saciados) foram habituados a ingerir uma dieta rica em carboidratos. Foram colocados dentro de uma caixa de registro comportamental, contendo em seu interior um recipiente de vidro (Placa de Petri, de 5 cm de diâmetro) com 20 g de ração enriquecida com sacarose 10% (Fletcher, 1988) e um bebedouro de vidro com 50 ml de água, durante 3 dias consecutivos; tempo suficiente para os animais atingirem a ingestão máxima e estável dessa dieta. A ração rica em sacarose foi disponibilizada diariamente durante 1 hora, após esse período, os animais retornaram à caixa de hospedagem onde tiveram livre acesso à água e à ração granulada.

Ao final do período de adaptação, ratas foram separadas em estro e diestro e receberam as seguintes injeções:

- veículo (ácido ascórbico 5%) e, depois de 7 min, receberam outra injeção de veículo (grupo controle) ou 8-OH-DPAT 6 nmol;
- MM-77, nas doses de 0,37 ou 0,74 nmol e, após 7 min, receberam outra injeção de veículo ou de 8-OH-DPAT 6 nmol.

Cada animal foi examinado em uma única fase do ciclo estral e, imediatamente após o tratamento, foi colocado na caixa de registro comportamental, onde por um período de 1 h, foi realizado o registro digital dos comportamentos ingestivos e não ingestivos. Ao término da sessão experimental, a ração restante na caixa de registro foi recolhida e pesada, sendo o consumo de alimento avaliado pela diferença entre a quantidade inicial e final de ração. O comportamento animal ao longo do experimento foi categorizado de acordo com Halford et al. (1998).

### 3.7 Registro comportamental

caixa experimental foi confeccionada em vidro transparente de 4 mm de espessura, possuindo medidas de comprimento (49 cm) e largura (34 cm) similares aos da caixa de hospedagem, porém com medida de altura (40 cm) maior a fim de evitar fugas. O chão da caixa e três paredes laterais foram cobertas com plástico adesivo preto. Uma das paredes laterais foi mantida com vidro transparente, onde posicionou-se um espelho em uma angulação que não permitisse ao animal visualizar sua imagem refletida durante o experimento, porém possibilitando ao observador a visualização lateral dos comportamentos do animal e o registro digitalizado dos mesmos. O registro foi realizado com a utilização de Webcam (Microsoft LifeCam VX1000, Microsoft Corporation) posicionada aproximadamente 60 cm acima do assoalho da caixa, permitindo a visualização completa de todos os ângulos da mesma. Posteriormente, o registro foi transcrito em computador, sendo as categorias comportamentais analisadas com utilização do programa Etholog 2.25 (OTTONI, 2000).

As variáveis avaliadas foram latência (tempo em segundos para realizar pela primeira vez uma resposta comportamental), frequência (número de vezes, durante os 60 minutos da sessão em que o animal exibiu determinada resposta) e duração (tempo, em segundos, de execução de determinada resposta) dos seguintes comportamentos, conforme descritos por Halford et al. (1998):

- **Ingestão do Alimento (comer):** quando o animal se aproxima do comedouro, e efetivamente ingere alimento sólido, com comportamentos característicos de deglutição;
- **Ingestão de Água (beber):** quando o animal se aproxima do bebedouro e lambe sua ponta;
- **Exploração do alimento:** quando o animal cheira ou manipula a ração, sem ingeri-la;
- **Exploração não locomotora:** quando o animal estiver ativamente explorando o ambiente com a cabeça, seja cheirando o ar ou o chão, sem tirar as quatro patas do local onde se encontra;
- **Exploração vertical:** quando o animal estiver explorando o ambiente apoiado somente nas patas traseiras, estando as patas dianteiras livres e não apoiadas no fundo da caixa (ereto);

- **Manutenção (autolimpeza):** quando o animal apresentar comportamentos típicos de auto limpeza, como: limpar a cabeça com as patas, limpar as unhas ou coçar o corpo com a boca;
- **Locomoção:** quando o animal estiver deambulando pela caixa, sem apresentar qualquer outro dos comportamentos já citado;
- **Imobilidade:** quando o animal permanecer imóvel, sem apresentar qualquer outro comportamento já citado.

### 3.8 Análise histológica

Após a finalização dos experimentos, os animais foram anestesiados com excesso de CO<sub>2</sub> e, posteriormente, foram perfundidos transcárdialmente com salina 0,9%, seguida de formol 10%. Após removidos, os cérebros permaneceram por cerca de três dias em solução de formol a 10% e em seguida foram colocados em solução de álcool etílico 70° INPM até serem cortados em fatias de 100 µm em vibratomo. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas onde permaneceram secando por 5 dias. Em seguida, foram corados pelo método de Nissl e permaneceram secando por igual período de tempo até serem analisados em microscópio óptico. A reprodução gráfica dos cortes e dos pontos de injeção foi realizada a partir do Atlas de Paxinos e Watson (2007).

### 3.9 Análise estatística

Os dados foram analisados por intermédio de uma análise de variância (ANOVA) de duas vias, tendo como fatores os tratamentos e as fases do ciclo estral (estro e diestro), seguida pelo teste (*post hoc*) de Duncan. O nível de significância adotado nesses procedimentos foi  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

A localização aproximada dos sítios de injeção dos tratamentos efetuados na AHL é mostrada a seguir por meio de microfotografia (figura 8) e representação esquemática (figura 9).

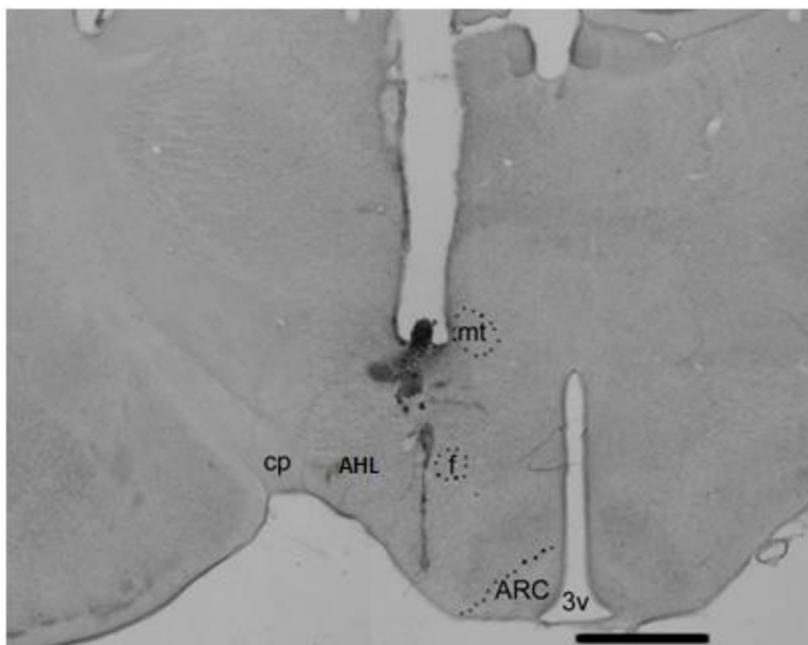


Figura 8: Microfotografia de um corte coronal (coloração pelo método de Nissl) do hipotálamo de rato, ilustrando o trajeto de uma cânula-guia e injetora na AHL. Abreviaturas: AHL: área hipotalâmica lateral; ARC: núcleo arqueado do hipotálamo; cp – pedúnculo cerebral; f – fórnix; mt - trato mamilotálamico. Escala da barra = 1 mm.

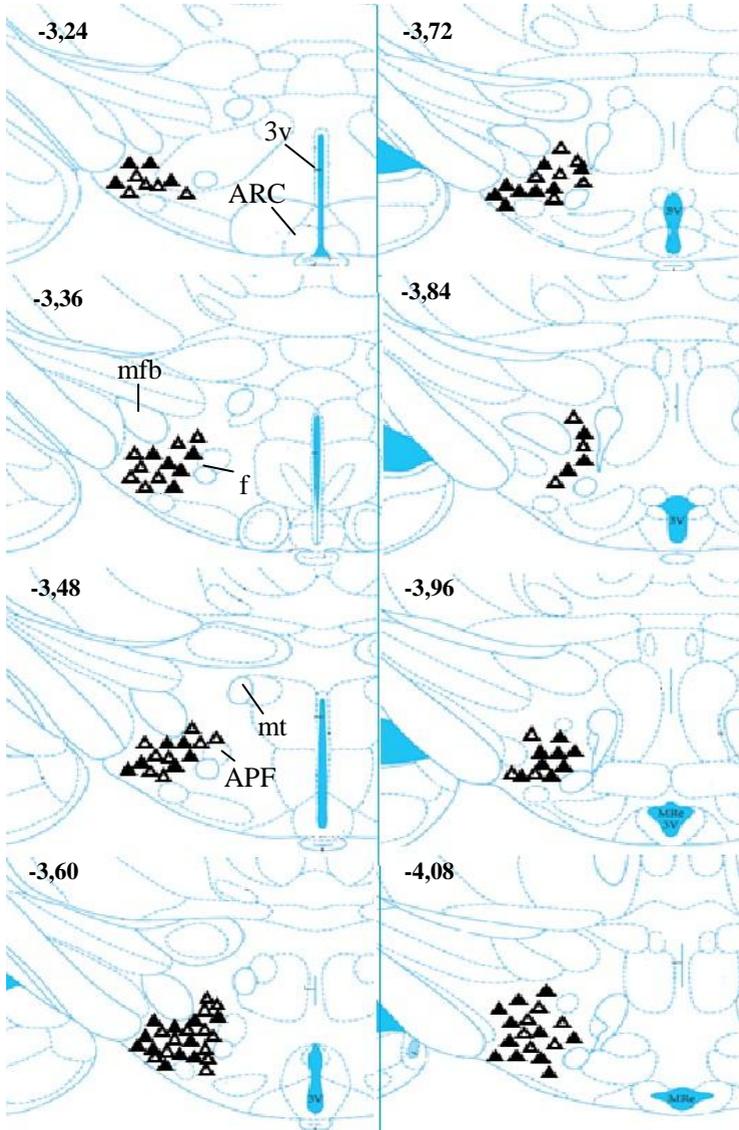


Figura 9: Representação esquemática de cortes coronais de cérebro de rato, demonstrando o sítio aproximado das microinjeções de Veic, 8-OH-DPAT (6 nmol) e MM-77 (0,37 e 0,74 nmol) nas fases de estro (▲) e diestro (△). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; mt, trato mamilotalâmico; cp, pedúnculo cerebral; ARC, núcleo arqueado do hipotálamo; f, fórnix; APF, área perifornical.

#### 4.1 Ingestão de alimento

A análise de variância (ANOVA) de duas vias indicou que a ingestão de alimentos foi afetada significativamente pelas drogas utilizadas [ $F(5,95)=10,12$ ;  $p=000000$ ]. A injeção de 8-OH-DPAT na AHL reduziu significativamente a ingestão de alimentos nas duas fases do ciclo estral avaliadas. O pré-tratamento com ambas as doses de MM-77 bloqueou o efeito hipofágico desencadeado pela administração de 8-OH-DPAT durante ambas as fases do ciclo estral (Figura 10).

A administração de MM-77 na AHL, seguido da injeção de veículo ou de 8-OH-DPAT não alterou o consumo de alimento em ambos os estágios do ciclo estral estudado. Por outro lado, o pré-tratamento com as duas doses de MM-77 bloqueou o efeito hipofágico desencadeado pela administração de 8-OH-DPAT durante as duas fases do ciclo estral.

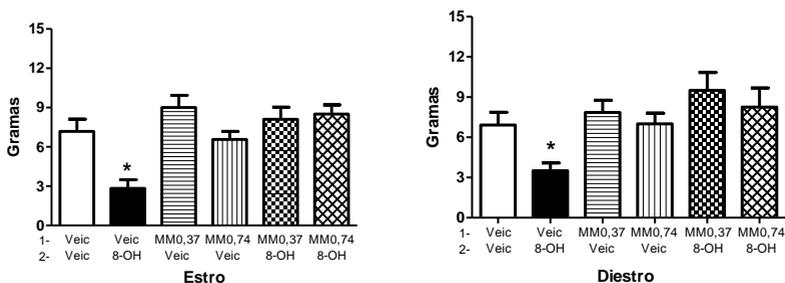


Figura 10: Efeito da injeção de 8-OH-DPAT sobre a ingestão de alimentos após o pré-tratamento da AHL com veículo (Veic – ácido ascórbico 5%) ou MM-77 (nas doses de 0,37 ou 0,74 nmol) em ratas em estro e diestro. Todos os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se nas tabelas 2,3,4,5. (\*)  $p<0,05$  em comparação ao seu respectivo controle.

A análise de variância mostrou que a duração total da ingestão de alimento foi afetada significativamente pelo tratamento realizado [ $F(5,95)=4,32$ ;  $p=0,001373$ ]. As alterações na duração da ingestão de alimento acompanharam, com algumas exceções, as modificações ocorridas no consumo de alimento. A redução da ingestão de alimento induzida pela administração de 8-OH-DPAT foi acompanhada por uma redução significativa na duração da ingestão na fase de estro quando comparada ao controle. O pré-tratamento com MM-77 em ambas as

doses bloqueou a redução na duração da ingestão de alimento desencadeada pela injeção de 8-OH-DPAT na fase de estro (Figura 11).

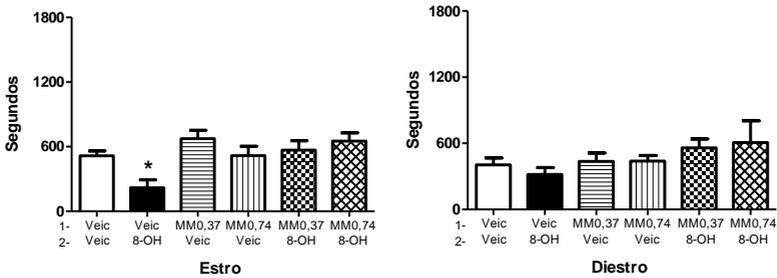


Figura 11: Efeito da injeção de 8-OH-DPAT sobre a duração da ingestão de alimentos após o pré-tratamento da AHL com veículo (Veic – ácido ascórbico 5%) ou MM-77 (nas doses de 0,37 ou 0,74 nmol) em ratas em estro e diestro. Todos os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se nas tabelas 2,3,4,5. (\*)  $p < 0,05$  em comparação ao seu respectivo controle.

A frequência da ingestão de alimento foi afetada significativamente pelas drogas utilizadas [ $F(5,94)=2,86$ ;  $p=0,018986$ ] e pelo ciclo estral analisado [ $F(1,94)=5,9830$ ;  $p=0,016305$ ]. Em estro, a administração de 8-OH-DPAT provocou redução na frequência de ingestão quando comparada ao controle, acompanhando a redução na quantidade e na duração da ingestão. Nesta fase do ciclo, o pré-tratamento com MM-77 seguida da administração de 8-OH-DPAT reverteu a redução na frequência de ingestão induzida pela injeção de 8-OH-DPAT isolado. Em diestro, observa-se que a frequência da ingestão de alimento no grupo controle é significativamente menor que a verificada no controle em estro. Embora a injeção de 8-OH-DPAT isolado tenha reduzido o consumo de alimento, o número de vezes que o animal ingeriu não diferiu do controle, na fase de diestro (Figura 12).

A latência para iniciar o consumo de alimento não foi afetada por qualquer tratamento efetuado na AHL em ambas as fases do ciclo estral (Figura 13).

## 4.2 Ingestão de água

A ingestão de água, assim como duração, latência e frequência não foram afetadas significativamente pelos tratamentos realizados na AHL em ambas as fases do ciclo estral estudadas (estro/diestro), conforme demonstrado nas tabelas 2 e 3.

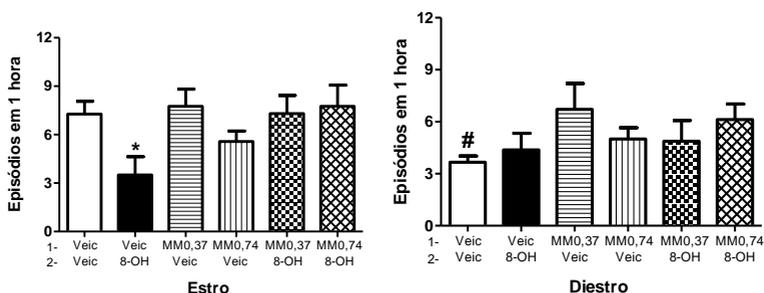


Figura 12: Efeito da injeção de 8-OH-DPAT sobre a frequência da ingestão de alimentos após o pré-tratamento da AHL com veículo (Veic – ácido ascórbico 5%) ou MM-77 (nas doses de 0,37 ou 0,74 nmol) em ratos em estro e diestro. Todos os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se nas tabelas 2,3,4,5. (\*)  $p < 0,05$  em comparação ao seu respectivo controle; (#)  $p < 0,05$  em comparação ao controle em estro.

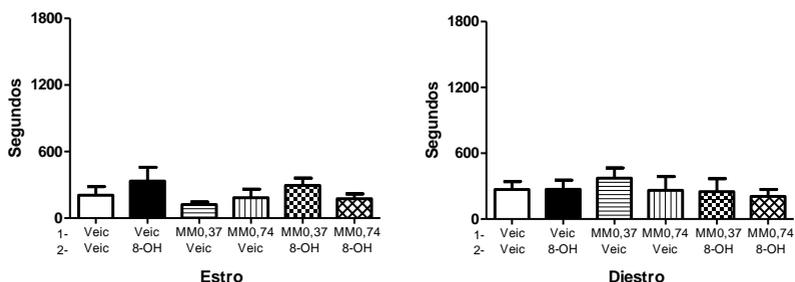


Figura 13: Efeito da injeção de 8-OH-DPAT sobre a latência da ingestão de alimentos após o pré-tratamento da AHL com veículo (Veic – ácido ascórbico 5%) ou MM-77 (nas doses de 0,37 ou 0,74 nmol) em ratos em estro e diestro. Todos os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se nas tabelas 2,3,4,5. (\*)  $p < 0,05$

em comparação ao seu respectivo controle; (#)  $p < 0,05$  em comparação ao controle em estro.

### 4.3 Comportamentos não ingestivos

A análise de variância de duas vias indicou que a exploração não locomotora foi afetada significativamente pelas drogas utilizadas [ $F(5,95)=3,580$ ;  $p=0,005211$ ]. Além disso, verificou-se que o comportamento de locomoção [ $F(5,95)=3,5900$ ;  $p=0,005114$ ], bem como o comportamento de autolimpeza [ $F(5,95)=5,2407$ ;  $p=0,000271$ ], também apresenta interação significante entre os tratamentos realizados.

Avaliando-se os comportamentos não ingestivos (tabelas 4) foi possível verificar que os animais em estro previamente tratados com a maior dose de MM-77 e posterior injeção de 8-OH-DPAT apresentaram uma redução significativa na duração da autolimpeza quando comparados ao controle; estes animais também apresentaram uma discreta redução na duração do comportamento locomotor, porém não estatisticamente significativa quando comparada ao controle.

A locomoção dos animais em estro foi afetada significativamente pelo pré-tratamento com MM-77 seguido da injeção de veículo (na menor dose) e da injeção de 8-OH-DPAT (nas duas doses), todos apresentaram um aumento significativo na duração deste comportamento quando comparados ao controle.

No que diz respeito aos animais em diestro (tabela 5), somente a duração da exploração não locomotora foi afetada pelo pré-tratamento com MM-77 0,37 nmol seguida da injeção de 8-OH-DPAT, apresentando-se significativamente menor que o controle.

Tabela 2: Resposta dos animais com relação ao consumo de água durante 1h após o pré-tratamento da AHL com o veículo (ácido ascórbico 5%) ou diferentes doses de MM-77 (0,37 ou 0,74 nmol) seguido 7 min após pela injeção de veículo ou de 8-OH-DPAT (6 nmol) em ratas na fase de estro.

Tratamentos	Estro					
	Veic + Veic (n=11)	Veic + 8-OH (n=12)	MM 0,37 + Veic (n=8)	MM 0,74 + Veic (n=7)	MM 0,37 + 8-OH (n=10)	MM 0,74 + 8-OH (n=8)
Ingestão água (mL)	0,48 ± 0,19	0,11 ± 0,06	0,60 ± 0,09	0,71 ± 0,31	0,61 ± 0,14	0,63 ± 0,25
Duração Ingestão Água (s)	14,67 ± 9,06	3,05 ± 1,72	17,50 ± 5,06	29,54 ± 15,27	25,25 ± 7,23	30,92 ± 13,06
Latência Ingestão Água (s)	561,99 ± 186,32	149,13 ± 86,67	895,58 ± 171,33	646,80 ± 290,94	553,81 ± 121,48	401,26 ± 165,16
Frequência Ingestão Água (episódios)	1,0 ± 0,4	0,3 ± 0,2	2,3 ± 0,6	2,9 ± 1,4	2,7 ± 0,7	2,4 ± 1,4

Os números entre parênteses representam o total de animais examinados em cada tratamento. Durante o tratamento os animais exibiram atividade locomotora imediatamente após serem colocados na caixa experimental.

Tabela 3: Resposta dos animais com relação ao consumo de água durante 1h após o pré-tratamento da AHL com o veículo (ácido ascórbico 5%) ou diferentes doses de MM-77 (0,37 ou 0,74 nmol) seguido 7 min após pela injeção de veículo ou de 8-OH-DPAT (6 nmol) em ratas na fase de diestro.

Tratamentos	Diestro					
	Veic + Veic (n=12)	Veic + 8-OH (n=8)	MM 0,37 + Veic (n=7)	MM 0,74 + Veic (n=8)	MM 0,37 + 8-OH (n=8)	MM 0,74 + 8-OH (n=8)
<b>Ingestão água (mL)</b>	0,75 ± 0,25	0,39 ± 0,11	0,70 ± 0,26	0,63 ± 0,18	0,75 ± 0,13	0,69 ± 0,21
<b>Duração Ingestão Água (s)</b>	33,65 ± 14,08	16,04 ± 7,76	34,42 ± 18,94	28,59 ± 10,21	28,41 ± 8,11	32,39 ± 10,58
<b>Latência Ingestão Água (s)</b>	406,00 ± 160,95	345,10 ± 120,09	486,82 ± 238,83	368,51 ± 138,81	1096,36 ± 363,35	618,13 ± 231,39
<b>Frequência Ingestão Água (episódios)</b>	2,1 ± 0,6	1,3 ± 0,3	1,9 ± 0,6	2,3 ± 0,6	1,5 ± 0,4	1,4 ± 0,5

Os números entre parênteses representam o total de animais examinados em cada tratamento. Durante o tratamento todos os animais exibiram atividade locomotora após serem colocados na caixa experimental.

Tabela 4: Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1h após o pré-tratamento da AHL com veículo (ácido ascórbico 5%) ou diferentes doses de MM-77 (0,37 ou 0,74 nmol) seguido 7 min após pela injeção de veículo ou de 8-OH-DPAT (6 nmol) em ratas em fase de estro.

Tratamentos	Estro					
	Veic + Veic (n=11)	Veic + 8-OH (n=12)	MM 0,37 + Veic (n=8)	MM 0,74 + Veic (n=7)	MM 0,37 + 8- OH (n=10)	MM 0,74 + 8- OH (n=8)
<b>Duração Exploração Alimento</b>	27,19 ± 4,76	34,38 ± 6,01	20,05 ± 3,18	13,97 ± 2,7	24,80 ± 3,16	23,82 ± 4,13
<b>Duração Exploração não Locomotora</b>	962,93 ± 82,91	1026,53 ± 82,87	947,55 ± 62,81	759,88 ± 121,56	949,67 ± 101,72	992,83 ± 111,38
<b>Duração Exploração Vertical</b>	239,28 ± 40,01	232,88 ± 41,46	365,26 ± 66,87	211,44 ± 50,64	341,78 ± 69,30	320,88 ± 49,62
<b>Duração Autolimpeza</b>	440,66 ± 50,26	453,83 ± 95,74	400,17 ± 69,86	376,78 ± 96,20	269,26 ± 45,52	232,88 ± 46,10*
<b>Duração Locomoção</b>	291,14 ± 55,10	415,07 ± 67,01	598,44 ± 86,64*	477,12 ± 82,04	599,93 ± 79,52*	615,39 ± 55,92*
<b>Duração Imobilidade</b>	1105,57 ± 148,54	1212,85 ± 208,77	575,51 ± 131,27	1213,70 ± 219,31	821,13 ± 207,45	747,02 ± 171,75

Todos os dados são expressos em segundos (média ± erro padrão da média). Os números entre parênteses se referem ao total de animais examinados em cada tratamento. Durante o tratamento todos os animais exibiram atividade locomotora imediatamente após serem colocados na caixa experimental. (\*) p<0,05 quando comparado ao veículo.

Tabela 5: Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1h após o pré-tratamento da AHL com veículo (ácido ascórbico 5%) ou diferentes doses de MM-77 (0,37 ou 0,74 nmol) seguido 7 min após pela injeção de veículo ou de 8-OH-DPAT (6 nmol) em ratas em fase de diestro.

Tratamentos	Diestro					
	Veic + Veic (n=12)	Veic + 8-OH (n=8)	MM 0,37 + Veic (n=7)	MM 0,74 + Veic (n=8)	MM 0,37 + 8- OH (n=8)	MM 0,74 + 8- OH (n=8)
<b>Duração Exploração Alimento</b>	29,72 ± 5,59	19,50 ± 4,03	28,48 ± 9,28	30,75 ± 7,38	23,58 ± 4,53	25,15 ± 4,22
<b>Duração Exploração não Locomotora</b>	969,56 ± 59,72	903,49 ± 92,11	995,40 ± 141,39	715,73 ± 53,79	464,37 ± 76,21*	721,90 ± 79,70
<b>Duração Exploração Vertical</b>	200,25 ± 19,37	371,03 ± 61,39	335,60 ± 70,63	339,51 ± 67,32	177,35 ± 45,97	319,14 ± 90,56
<b>Duração Autolimpeza</b>	317,94 ± 26,57	494,88 ± 55,20	341,21 ± 42,01	425,94 ± 52,95	169,10 ± 49,31	217,34 ± 64,63
<b>Duração Locomoção</b>	466,51 ± 70,31	542,50 ± 57,91	641,84 ± 101,49	456,13 ± 67,90	508,19 ± 78,27	733,84 ± 163,32
<b>Duração Imobilidade</b>	1147,38 ± 127,55	931,92 ± 202,37	786,00 ± 166,79	1163,86 ± 146,08	1669,79 ± 241,81	938,36 ± 219,13

Todos os dados são expressos em segundos (média ± erro padrão da média). Os números entre parênteses se referem ao total de animais examinados em cada tratamento. Durante o tratamento todos os animais exibiram atividade locomotora imediatamente após serem colocados na caixa experimental. (\*) p<0,05 quando comparado ao veículo.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelaram que a ingestão de alimentos diminuiu significativamente após a injeção de 8-OH-DPAT na área hipotalâmica lateral (AHL) em cerca de 60% durante a fase de estro e 49% durante o diestro. Este dado confirma a hipofagia induzida pelo 8-OH-DPAT encontrada em estudo prévio de nosso laboratório tanto para animais em estro quanto diestro (STEFFENS et al., 2008). Além disso, o pré-tratamento da AHL com diferentes doses de MM-77 foi capaz de promover uma reversão do efeito hipofágico induzido pela injeção de 8-OH-DPAT.

A resposta na ingestão de alimento desencadeada pela administração de 8-OH-DPAT (agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>7</sub>) nos animais difere de acordo com o estado nutricional. Um aumento na ingestão de alimento foi observado após o tratamento sistêmico com 8-OH-DPAT, em animais saciados. Por outro lado, nos animais que foram submetidos à restrição alimentar (modelo utilizado para incentivar o consumo de alimento) há uma redução da ingestão de alimento após injeção sistêmica de 8-OH-DPAT (DOURISH et al, 1985; EBENEZER et al, 1999; EBENEZER et al, 2001; EBENEZER, SURUJBALLY, 2007).

A hiperfagia desencadeada pela administração sistêmica de 8-OH-DPAT é atribuída à ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (autoreceptor somatodendrítico) encontrados no núcleo mediano da rafe (NMR) e núcleo dorsal da rafe (NDR), sendo que esta ativação desencadeia uma inibição da atividade neuronal serotoninérgica, provocando redução na liberação de 5-HT em áreas do prosencéfalo. Este mecanismo proposto sugere a presença de um tônus serotoninérgico inibitório, exercido por neurônios localizados nos núcleos da rafe sobre estruturas prosencefálicas, relacionadas com o controle da ingestão de alimento (FLETCHER, COSCINA, 1993; CURRIE, COSCINA, 1996; COSCINA et al., 2000). Já o envolvimento de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos na regulação da ingestão de alimento ainda é pouco claro.

Foram descritos dois mecanismos envolvidos na regulação da ingestão de alimentos por Blundell et al (1986): um que regula o término da refeição por meio da plenitude gástrica e a redução do tamanho das refeições (saciação); e o segundo que controla o início do consumo de alimento, definido por esse autor como estado de saciedade, que seria o resultado de mecanismos que inibem o ato de comer, determinando o intervalo entre as refeições (manutenção). Nossos

resultados apontam que a utilização de 8-OH-DPAT na AHL, de modo geral, mostrou aumentar a saciação das ratas em estro, por meio da redução na duração do ato de comer, porém sem afetar a saciedade, uma vez que não encontramos alterações significativas na latência para iniciar o comportamento ingestivo.

No presente estudo, a injeção de 8-OH-DPAT na AHL reduziu a quantidade de alimento ingerido tanto na fase de estro quanto diestro das ratas. Os comportamentos não ingestivos permaneceram inalterados após este tratamento na AHL, portanto, os efeitos hipofágicos desencadeados pela administração de 8-OH-DPAT não podem ser atribuídos às mudanças na atividade motora ou em outras categorias comportamentais (não ingestivas).

O estudo de microdiálise realizado por Voigt et al. (2000), descreve diferentes efeitos do 8-OH-DPAT na liberação de 5-HT na AHL, dependendo do estado alimentar: ratos alimentados *ad libitum* e mantidos com restrição alimentar durante 2h antes do experimento, apresentaram redução na liberação extracelular de 5-HT, após a administração periférica de 8-OH-DPAT. Quando o alimento estava disponível para ratos saciados durante a sessão experimental, a resposta alimentar desencadeada pela injeção de 8-OH-DPAT induziu um aumento na 5-HT extracelular quando comparado ao grupo com restrição alimentar. Por outro lado, a concentração de 5-HT extracelular não foi afetada pelo tratamento com 8-OH-DPAT em animais privados de alimento com ou sem restrição alimentar durante o período experimental. Em animais não saciados e que tiveram acesso ao alimento, após o tratamento com 8-OH-DPAT ocorreu uma redução na ingestão alimentar, a liberação de 5-HT extracelular permaneceu inalterada nesta condição, o que poderia ser atribuído ao baixo consumo de alimento observado neste experimento. Estes dados sugerem que diferentes estágios comportamentais relacionados à ingestão alimentar influenciam na liberação de 5-HT na AHL (VOIGT et al, 2000).

Na AHL, imunoreatividade ao receptor 5-HT<sub>1A</sub> foi observada em neurônios que expressam peptídeos orexígenos, como MCH e orexina A. Além disso, foram observadas fibras neuronais contendo transportador para a 5-HT próximas a corpos celulares contendo receptores 5-HT<sub>1A</sub> (COLLIN et al., 2002). Estes dados indicam que a resposta hipofágica induzida pelo tratamento com 8-OH-DPAT na AHL poderia ser mediada pela diminuição na liberação de MCH e/ou da orexina A. Porém, estudos posteriores envolvendo imunoreatividade se fazem necessários para confirmar esta suposição.

Outro resultado que se pode observar é a grande quantidade de alimento ingerido pelos animais neste estudo. Há duas explicações principais para ingestão excessiva de comida palatável: o primeiro é a ativação do sistema de recompensa, previamente mencionado no capítulo ‘introdução’ (ver figura 3); o segundo é o fenômeno de resistência, isto é, uma habilidade comprometida de responder à ingestão de alimento com uma cascata de sinalização que levaria à saciedade (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). Sabe-se que a AHL possui projeções neuronais para os circuitos que governam os mecanismos de recompensa relacionados à ingestão de alimento palatável (KELLEY et al, 2005) e, portanto, a intensa ingestão de alimento observada na fase clara no presente trabalho poderia ser devido a elevada palatabilidade da dieta para os animais.

A utilização de doses de agonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, que normalmente aumentam o consumo de ração normal granulada em ratos saciados, pode levar a uma redução na ingestão de alimento em animais habituados a ingerir alimento palatável (SWIERGIEL, DUNN, 2000). Concordando com estes resultados, o tratamento com 5-HT no PVN diminui a ingestão de carboidrato (MANCILLA-DIAZ et al., 2005; LOPEZ-ALONSO et al, 2007), mas não altera o consumo de proteína ou de gordura. Este efeito inibitório sobre o consumo de carboidratos é bloqueado pela administração de antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> ou 5-HT<sub>1B</sub> (MANCILLA-DIAZ et al., 2005). Deste modo, estas informações levam a acreditar que a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, encontrados no PVN (MANCILLA-DIAZ et al, 2005; LOPEZ-ALONSO et al, 2007) e na AHL (STEFFENS et al, 2008), reduz o consumo de carboidratos, confirmando que o efeito hipofágico mediado pelo 8-OH-DPAT parece estar presente em ratos nestas condições experimentais.

Embora vários estudos demonstrem uma redução na ingestão de alimentos durante a fase de estro relativo ao diestro em ratas com ciclo estral normal (ECKEL, GEARY, 1999; ECKEL et al., 2000; GEARY, 2001; ECKEL, MOORE, 2004; ECKEL et al., 2005; ASARIAN, GEARY, 2006), este efeito não foi observado neste estudo. A ingestão de alimento exibida por ratas tratadas com veículo durante a fase de estro foi similar àquela verificada no mesmo grupo em fase de diestro. Esta discrepância pode ser explicada pelo treinamento dos animais para comer dieta enriquecida com sacarose no meio da fase clara do ciclo claro-escuro. Tem sido demonstrado que animais testados durante o meio da fase clara exibem consumo de alimento similar em estro e diestro (PARKER et al., 2002). A típica redução na ingestão de alimento

durante a fase de estro foi observada em experimentos realizados durante o início da fase escura do ciclo claro/escuro (ECKEL, GEARY, 1999; ECKEL et al., 2000; 2005; ASARIAN, GEARY, 2006) quando a maioria do alimento diário é ingerida (LAVIANO et al., 1996).

A dose de 8-OH-DPAT (6 nmol/200 nl) aqui utilizada reduziu a duração e frequência da ingestão de alimento somente durante o estágio de estro. Outra alteração observada foi que a frequência da ingestão de alimento no grupo controle do diestro foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle em estro. Estes resultados indicam que o controle da ingestão de alimento por receptores 5-HT<sub>1A</sub> da AHL poderia ser influenciado por hormônios esteróides gonadais. O estradiol parece ser o hormônio ovariano envolvido nas alterações de respostas dos neurônios 5-HT da AHL ao 8-OH-DPAT, uma vez que estudos mostram que não há influência significativa no comportamento ingestivo de ratas ooforectomizadas quando progesterona é administrada sozinha, exceto quando administrada em doses não fisiológicas (BUTERA, 2010; HIRSCHBERG, 2012). Além disso, o tratamento com E2 em ratas ooforectomizadas atenua a hiperfagia induzida por agonista 5-HT<sub>1A</sub> injetado subcutaneamente (UPHOUSE et al., 1991; SALAMANCA, UPHOUSE, 1992).

De forma semelhante aos dados apresentados neste estudo, Steffens et al (2008) mostraram que após a injeção de 8-OH-DPAT na AHL houve aumento da saciação por meio da redução do tempo despendido para a ingestão de alimentos nas ratas em estro, mas não revelou diferenças significativas neste comportamento nos animais em diestro e nem alteração no que se refere a latência. Como já proposto em estudos anteriores do nosso laboratório, utilizando mesmo protocolo experimental do presente estudo, essa diferença na atuação dos circuitos serotoninérgicos em estro ou diestro poderia ser atribuída à influência dos hormônios ovarianos. Alguns estudos mostram que neurônios serotoninérgicos apresentam alterações decorrentes da ação de esteróides ovarianos (BETHEA et al, 1998). Ratas em fase de diestro exibiram hiperfagia mais significativa após a injeção sistêmica (subcutânea) de 8-OH-DPAT do que em estro (UPHOUSE et al, 1991), mostrando que a regulação do comportamento alimentar por circuitos serotoninérgicos em ratas parece ser mediada por alterações fisiológicas dos esteróides ovarianos que ocorrem durante o ciclo estral.

Durante a fase periovulatória (proestro) há uma maior liberação de estradiol, sendo que o pico é atingido de 6-12h antes da ovulação, e no estro estes valores caem (BECKER et al, 2005). Entretanto, a ativação de receptores de estrogênio estimula fatores de transcrição,

resultando na persistência dos efeitos do E2 por 12 horas ou mais e, portanto, a redução na ingestão de alimento observada em estro é causada por uma liberação prévia de E2 (BLAUSTEIN, WADE, 1976; ASARIAN, GEARY, 2002; 2006). Além disso, demonstrou-se que hormônios ovarianos exercem efeitos fásicos e tônicos inibitórios no consumo de alimento, ao reduzir a ingestão de alimentos por meio do tamanho da refeição (GEARY, 2001; ECKEL, GEARY, 1999; ECKEL, MOORE, 2004), dados estes semelhantes aos obtidos neste estudo.

Porém, deve-se levar em consideração que neste trabalho a fase de estro se refere a fase do ciclo ovariano definida pelo esfregaço vaginal, sendo que esta fase do ciclo foi definida na manhã seguinte após a ovulação noturna, e os experimentos foram realizados no mesmo dia, o que correspondeu de 15 a 16h após a ovulação. Este período pode não ser completamente representativo de mudanças comportamentais presentes em momentos iniciais dos comportamentos de fase de estro (BECKER et al., 2005).

Um estudo realizado em fêmeas adultas de macacos *rhesus* (*Macaca mulatta*) mostrou que o número de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos do hipotálamo (núcleos paraventricular, periventricular, dorsomedial, ventromedial) diminui após tratamento com estrogênio ou com estrogênio combinado com progesterona, porém permanece inalterado quando utilizado a progesterona isoladamente (cápsulas implantadas na área periescapular) (LU, BETHEA, 2002). Tem sido demonstrado que a progesterona aumenta ingestão de alimento, enquanto estrógeno diminui a ingestão alimentar (ASARIAN, GEARY 2006). Adicionalmente, um regime cíclico de tratamento com estrogênio em ratas ooforectomizadas aumenta o efeito anorético da fenfluramina (estimula a liberação sináptica de 5-HT e o bloqueio da recaptação de 5-HT nos terminais pré-sinápticos) (RIVERA, ECKEL, 2005). A resposta hiperfágica observada após a ooforectomia é atribuída ao declínio dos níveis circulantes de estradiol (não de progesterona), uma vez que somente a reposição com estradiol é capaz de reverter a ingestão de alimento em ratas ooforectomizadas (GEARY, ASARIAN, 1999).

Estudos relataram que a anorexia induzida pelo tratamento com fenfluramina é maior no estro que no diestro (ECKEL et al., 2005; RIVERA, ECKEL, 2005). Ao contrário, a hiperfagia induzida por tratamento com agonista 5-HT<sub>1A</sub> é mais evidente em ratas na fase de diestro que em proestro ou estro (UPHOUSE et al., 1991). Tendo em vista estas evidências, pode-se sugerir que o E2 afeta diferentemente os receptores pré-sinápticos (responsáveis por mediar a resposta

hiperfágica) e pós-sinápticos (responsáveis por mediar a resposta hipofágica).

Conseqüentemente, os baixos níveis de 5-HT no hipotálamo durante a fase de estro, evidenciados por estudos de microdiálise *in vivo* (GUNDLAH et al., 1998), poderiam levar ao aumento na expressão de receptores 5HT<sub>1A</sub> neste estágio do ciclo ovariano, assim aumentando o padrão de resposta dos neurônios localizados na AHL ao 8-OH-DPAT. Alternativamente, poderia ser possível somente um aumento nos sítios de ligação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (FLUGGE et al., 1999) na AHL sem alterar a liberação de 5-HT na fenda sináptica, o que poderia ser suficiente para o efeito hipofágico desencadeado pela administração de 8-OH-DPAT na fase de estro.

Nossos dados sugerem que os hormônios esteróides ovarianos poderiam aumentar a eficácia das influências sobre a saciação mediadas por ativação de receptores pós-sinápticos 5-HT<sub>1A</sub> localizados na AHL, uma vez que a redução na duração do consumo alimentar foi observada somente durante o estagio de estro. De acordo com esta hipótese, foi demonstrado que o estradiol diminui a quantidade e o tempo de consumo de alimento por aumentar o efeito desencadeado pelos compostos anorexígenos (CCK e/ou 5-HT), que sinalizam o término da refeição e diminui o efeito dos compostos orexígenos (MCH e a grelina) que sustentam uma refeição (GEARY et al., 1994; ECKEL, MOORE, 2004; MESSINA et al., 2006; CLEGG et al., 2007). O efeito orexígeno do MCH é mediado por um aumento seletivo do tamanho da refeição, que foi atenuado em ratas ooforectomizadas tratadas com estrógeno e durante a fase de estro, relativo ao diestro, em ratas com ciclo estral normal (SANTOLLO, ECKEL, 2008).

Os dados deste estudo não permitem avaliar se a resposta hipofágica mediada pela ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados na AHL é um resultado da mudança na sensibilidade destes receptores induzida pelo estrógeno ou, poderia ser atribuída aos efeitos do estrógeno, aumentando a eficácia dos sinais neurais que induzem saciação. Desta forma, estudos posteriores se fazem necessários para determinar com mais precisão qual o possível efeito dos hormônios ovarianos na atividade de receptores 5-HT<sub>1A</sub> envolvidos com a ingestão de alimento na AHL.

No que diz respeito à ingestão de água, um estudo realizado por Shearman et al. (2003) mostrou que MCH influencia ingestão de alimentos sem afetar a ingestão de água, enquanto que Clegg et al (2003) demonstrou que injeções centrais de MCH no terceiro ventrículo estimulou tanto ingestão de água quanto de alimento, porém em estudos

posteriores, quando o alimento não estava disponível, o MCH foi capaz de provocar comportamento dipsogênico independente da ingestão de alimento (CLEGG et al., 2003; MORENS et al., 2005). Os dados apresentados aqui excluem uma participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> dos neurônios da AHL no controle da ingestão de água; visto que não foram encontradas alterações neste comportamento após a administração de 8-OH-DPAT ou MM-77 isolada ou concomitantemente.

A administração do antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> considerado pós-sinápticos, MM-77 (MOKROSZ et al, 1994; GRIEBEL et al 2000; WESOLOWSKA et al, 2003) não provocou alteração no comportamento ingestivo quando administrado isoladamente. Porém, neste estudo, foram realizadas administrações unilaterais de antagonista e/ou agonista de receptor 5-HT<sub>1A</sub> e isto poderia influenciar o efeito dos antagonistas na ingestão de alimento. Desta forma, estudos posteriores com administrações bilaterais de antagonistas se fazem necessários para confirmar se os mesmos possuem efeitos na ingestão de alimentos quando administrados isoladamente.

Por outro lado, quando administrado previamente ao tratamento com 8-OH-DPAT, o MM-77 foi capaz de reverter a redução na ingestão de alimento induzida pela administração de 8-OH-DPAT em ambas as fases do ciclo estral. Como o MM-77 é considerado um potente e seletivo antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sináptico, os presentes dados reforçam a nossa sugestão de que receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos localizados na AHL participam de circuitos serotoninérgicos envolvidos no controle da ingestão alimentar. Além disso, a ativação de receptores 5-HT<sub>1B</sub> ou 5-HT<sub>2C</sub> na AHL não afeta a ingestão alimentar (HIKIJ et al., 2004), sugerindo que o efeito hipofágico da 5-HT na AHL possa ser mediado por outros subtipos de receptores 5-HT, como o 5-HT<sub>1A</sub>.

Quanto à alteração dos comportamentos não ingestivos verificou-se que a administração isolada de agonista (8-OH-DPAT) ou antagonista (MM-77) serotoninérgico não afetou significativamente as durações dos comportamentos não ingestivos nas duas fases do ciclo. Porém, nos animais que foram pré-tratados com a maior dose de MM-77, e posteriormente receberam injeção de 8-OH-DPAT houve um aumento na duração da locomoção quando comparados ao controle, na fase de estro. Além disso, os animais pré-tratados com a menor dose de MM-77 seguida de veículo ou 8-OH-DPAT também apresentaram aumento na duração da locomoção quando comparados ao controle, na fase de estro. Este aumento da atividade motora poderia afetar o comportamento alimentar, porém o consumo de alimento nos animais pré-tratados com

MM-77 que receberam injeção de 8-OH-DPAT foi similar ao grupo controle, indicando que a atenuação do efeito hipofágico induzido pelo 8-OH-DPAT poderia ser atribuído ao bloqueio dos receptores  $5HT_{1A}$  promovido pelo MM-77. Outras alterações isoladas foram verificadas, como a diminuição da autolimpeza nos animais pré-tratados com a maior dose de MM-77 seguida da injeção de 8-OH-DPAT em estro, além da diminuição da exploração não locomotora nos animais tratados com a menor dose de MM-77, seguida da administração de 8-OH-DPAT em diestro. Porém, os mecanismos pelos quais estas alterações acontecem ainda permanecem desconhecidos e requerem estudos mais aprofundados.

As mudanças no comportamento ingestivo observadas no presente estudo podem não ser significativas no contexto da ingestão de alimento como um todo, sendo, porém, válidas para situações quando um regime de alimentação programado de uma dieta mais palatável esteja presente, pois os efeitos de agentes serotoninérgicos na ingestão de alimentos foram mostrados em diferentes modelos experimentais e na dependência de inúmeros fatores, incluindo a palatabilidade da dieta (STALLONE, NICOLAIDIS, 1989; HALFORD, BLUNDELL, 1996), os macronutrientes oferecidos (LEIBOWITZ et al., 1993; GRIGNASCHI et al., 1999; JOURDAN et al., 2003), o regime alimentar dos animais e do período do ciclo claro/escuro estudado (EBENEZER et al., 2001; EBENEZER, SURUJBALLY, 2007) e tendem a variar conforme o modelo animal utilizado.

Diante das evidências anteriormente citadas sugere-se que o efeito hipofágico desencadeado pela administração local de 8-OH-DPAT seja mediado por receptor  $5-HT_{1A}$  pós-sináptico na AHL, uma vez que a administração de MM-77 isoladamente não alterou a ingestão de alimento, porém quando administrado previamente ao 8-OH-DPAT foi capaz de reverter a hipofagia induzida pela utilização deste agonista.

## 6 CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste estudo apontam que a utilização de 8-OH-DPAT na AHL mostrou aumentar a saciação (redução da duração de ingestão), porém sem afetar a saciedade (não alterou latência da ingestão) e que o padrão de resposta dos neurônios da AHL ao 8-OH-DPAT sofre influência dos hormônios esteróides gonadais.

As alterações nos comportamentos não ingestivos não foram capazes de alterar o comportamento alimentar (consumo semelhante ao controle nestes grupos), indicando que a reversão do efeito hipofágico induzido pelo 8-OH-DPAT poderia ser atribuído ao bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> promovido pelo MM-77 (antagonista pós-sináptico), sugerindo que o efeito hipofágico ocasionado pela injeção de 8-OH-DPAT na AHL seja mediado por uma ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos.



## 7 REFERÊNCIAS

ARKLE, M.; EBENEZER, I.S. Ipsapirone suppresses food intake in food-deprived rats by an action at 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *European Journal of Pharmacology*, v. 408, p. 273-276, 2000.

ASARIAN, L.; GEARY, N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav*, v. 42, p. 461-471, 2002.

ASARIAN, L.; GEARY, N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 361, p. 1251-1263, 2006.

BANKS, W.A.; KASTIN, A.J.; HUANG, W.; JASPAN, J.B.; MANESS, L.M. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*, v. 17, n. 2, p. 305-311, 1996.

BANKS, W.A. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol*, v. 490, n. 1-3, p. 5-12, 2004.

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

BASKIN, D.G.; NORWOOD, B.J.; SCHWARTZ, M.W.; KOERKER, D.J. Estradiol inhibits the increase of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression induced by weight loss in ovariectomized rats. *Endocrinology*, v. 136, p. 5547-54, 1995.

BECKER, J.B.; ARNOLD, A.P.; BERKLEY, K.J.; BLAUSTEIN, J.D.; ECKEL, L.A.; HAMPSON, E.; Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology*, v. 146, p. 1650-1673, 2005.

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

BERMACK, J.E.; DEBONNEL, G. Effects of OPC-14523, a combined

sigma and 5-HT<sub>1a</sub> ligand, on pre- and post-synaptic 5-HT<sub>1a</sub> receptors. *Journal of psychopharmacology*, v. 21, n. 1, p. 85-92, 2007.

BERNARDIS, L.L.; BELLINGER, L.L. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res*, v. 434, n. 3, p. 321-381, 1987.

BERTHOUD, HR. Interactions between the "cognitive" and "metabolic" brain in the control of food intake. *Physiol Behav*, v. 91, n. 5, p. 486-498, 2007.

BETHEA, C.L.; PECINS-THOMPSON, M.; SCHUTZER, W.E.; GUNDLAH, C.; LU, Z.N. Ovarian steroids and serotonin neural function. *Mol Neurobiol*, v. 18, n. 2, p. 87-123, 1998.

BICKERDIKE, M.J.; VICKERS, S.P.; DOURISH, C.T. 5-HT<sub>2C</sub> receptor modulation and the treatment of obesity. *Diabetes Obes Metab*, v. 1, n. 4, p. 207-214, 1999.

BIEGON, A.; BERCOVITZ, H.; SAMUEL, D. Serotonin receptor concentration during the estrous cycle of the rat. *Brain Res*, v. 187, p. 221-225, 1980.

BIEGON, A.; RECHES, A.; SNYDER, L.; MCEWEN, B. S. Serotonergic and noradrenergic receptors in the rat brain: Modulation by chronic exposure to ovarian hormones. *Life Sci*, v. 32, p. 2015-2021, 1983.

BJORK, L.; CORNFIELD, L.J.; NELSON, D.L; HILLVER, S.E.; ANDÉN, N.E.; LEWANDER, T.; HACKSELL, U. Pharmacology of the novel 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor antagonist (S)-5-fluoro-8-hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin: inhibition of (R)-8-hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin-induced effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, v. 258, p. 58-65, 1991.

BLANDAUI, R.; BOLING, J.; YOUNG, W. The length of heat in the albino rat as determined by the copulatory response. *Anat Rec*, v. 79, p. 453-463, 1941.

BLAUSTEIN, J.D.; WADE, G.N. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiol Behav*, v. 17, p. 201-208, 1976.

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

BLUNDELL, J.E. Serotonin manipulations and the structure of feeding behaviour. *Appetite*, v. 7, p. 39-56, 1986.

BOUWKNECHT, J.A.; GUGTEN, V.J.; HIJZEN, T.H.; MAES, R.A.; HEN, R.; OLIVIER, B. Male and female 5-HT(1B) receptor knockout mice have higher body weights than wildtypes. *Physiol Behav*, v. 74, p. 507-516, 2001.

BOVETTO, S.; RICHARD, D. Functional assessment of the 5-HT1A, 1B, 2A/2C, and 5-HT3 receptor subtypes on food intake and metabolic rate in rats. *Am J Physiol*, v. 268, p. 14-20, 1995.

BROADWELL, R.D.; BRIGHTMAN, M.W. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J Comp Neurol*, v. 166, n. 3, p. 257-283, 1976.

BROBERGER, C.; JOHANSEN, J.; JOHASSON, C.; SCHALLING, M.; HOKFELT, T. The neuropeptide Y/agouti gene related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc. Natl Acad. Sci*, v. 95, p. 15043-15048, 1998a.

BROBERGER, C.; DE, L.L.; SUTCLIFFE, J.G.; HOKFELT, T. Hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*, v. 402, n. 4, p. 460-474, 1998b.

BRYANT, M.; TRUESDALE, K.P.; DYE, L. Modest changes in dietary intake across the menstrual cycle: implications for food intake research. *Br J Nutr*, v. 96, p. 888-94, 2006.

BUFFENSTEIN, R.; POPPITT, S.D.; MCDEVITT, R.M.; PRENTICE, A.M. Food intake and the menstrual cycle: a retrospective analysis, with implications for appetite research. *Physiol & Behav*, v. 58, p. 1067-77, 1995.

BUTERA, P.C. Estradiol and the control of food intake. *Physiol Behav*, v. 99, p. 175-180, 2010.

CHAPTINI, L.; PEIKIN, S. Neuroendocrine regulation of food intake. *Nutrition*, v. 24, p. 223-229, 2008.

CHEN, Y.; HU, C.; HSU, C.K.; ZHANG, Q.; BI, C.; ASNICAR, M, et al. Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology*, v. 143, n. 7, p. 2469-2477, 2002.

CHAUDHRI, O.B.; PARKINSON, J.R.; KUO, Y.T.; DRUCE, M.R.; HERLIHY, A.H.; BELL, J.D.; DHILLO, W.S.; STANLEY, S.A.; GHATEI, M.A.; BLOOM, S.R. Differential hypothalamic neuronal activation following peripheral injection of GLP-1 and oxyntomodulin in mice detected by manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 350, p. 298-306, 2006.

CLEGG, D. J.; RIEDY, C. A.; BLAKE SMITH, K. A.; BENOIT, S. C.; WOODS, S. C. Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes*, v. 52, p. 682–687, 2003.

CLEGG, D.J.; BROWN, L.M.; ZIGMAN, J.M.; KEMP, C.J.; STRADER, A.D.; BENOIT, S.C.; WOODS, S.C.; MANGIARACINA, M.; GEARY, N.. Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes*, v. 56, p. 1051–8, 2007.

COHEN, I. R.; WISE, P. M. Effects of estradiol on the diurnal rhythm of serotonin activity in microdissected brain areas of ovariectomized rats. *Endocrinology*, v. 122, p. 2619-2625; 1988.

COLLIN, M.; BACKBERG, M.; ONNESTAM, K.; MEISTER, B. 5-HT1A receptor immunoreactivity in hypothalamic neurons involved in body weight control. *Neuroreport*, v. 13, p. 945-951, 2002.

COSCINA, D.V.; FEIFEL, D.; NOBREGA, J.N.; CURRIE, P.J. Intraventricular but not intraparaventricular nucleus metergoline elicits feeding in satiated rats. *Am J Physiol*, v. 266, p. 1562-1567, 1994.

COSCINA, D.V.; CURRIE, P.J.; BISHOP, C.; PARKER, G.C.; ROLLINS, B.L. KING, B.M. Posterodorsal amygdale lesions reduce feeding stimulated by 8-OH-DPAT. *Brain Res*, v. 883, p. 243-249, 2000.

CROSS, G.B.; MARLEY, J.; MILES, H.; WILLSON, K. Changes in nutrient intake during the menstrual cycle of overweight women with premenstrual syndrome. *Br J Nutr*, v. 85, p. 475-82, 2001.

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

CURRIE, P.J.; COSCINA, D.V. Metergoline potentiates natural feeding and antagonizes the anorectic action of medial hypothalamic 5-hydroxytryptamine. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 53, p. 1023-1028, 1996.

CURRIE, P.J.; COIRO, C.D.; NIYOMCHAI, T.; LIRA, A.; FARAHMAND, F. Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine: receptor-specific inhibition of NPY-stimulated eating and energy metabolism. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 71, p. 709-716, 2002

CURZON, G. Serotonin and appetite. *Ann N Y Acad Sci*, v. 600, p. 521-531, 1990.

DAGNAULT, A.; OUERGHI, D.; RICHARD, D. Treatment with alpha-helical-CRF(9-41) prevents the anorectic effect of 17-beta-estradiol. *Brain Research Bulletin*, v. 32, p. 689-92, 1993.

DALTON, G.L.; LEE, M.D.; KENNETT, G.A.; DOURISH, C.T.; CLIFTON, P.G. Serotonin 1B and 2C receptor interactions in the modulation of feeding behavior in the mouse. *Psychopharmacology*, v. 185, p. 45-57, 2006.

DEBONS, A.F.; KRIMSKY, I.; MAAYAN, M.L.; FANI, K.; JEMENEZ, F.A. Gold thioglucose obesity syndrome. *Federation Proc*, v. 36, p. 143-147, 1977.

DIETRICH, M.O.; HORVATH, T.L. Feeding signals and brain circuitry. *European Journal of Neuroscience*, v. 30, p. 1688-1696, 2009.

DIPAOLLO, T.; DAIGLE, M.; PICARD, V.; BARDEN, N. Effect of acute and chronic 17 $\beta$ -estradiol treatment on serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid content of discrete brain nuclei of ovariectomized rat. *Exp. Brain Res*, v. 51, p. 73-76, 1983.

DOURISH, C.T.; HUTSON, P.H.; CURZON, G. Low doses of the putative serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicit feeding in the rat. *Psychopharmacology* (Berl), v. 86, p. 197-204, 1985.

DOURISH, C.T.; COOPER, S.J.; GILBERT, F.; COUGHLAN, J.; IVERSEN, S.D. The 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-OH-DPAT increases consumption of palatable wet mash and liquid diets in the rat. *Psychopharmacology*, v. 94, p. 58-63, 1988.

DOURISH, C.T. Multiple serotonin receptors: opportunities for new treatments for obesity? *Obes. Res*, Suppl 4, p. 449-462, 1995.

DRYDEN, S.; WANG, Q.; FRANKISH, H.M.; PICKAVANCE, L.; WILLIAMS, G. The serotonin (5-HT) antagonist methysergide increases neuropeptide Y (NPY) synthesis and secretion in the hypothalamus of the rat. *Brain Res*, v. 699, p. 12-18, 1995.

DRYDEN, S.; FRANKISH, H.M.; WANG, Q.; WILLIAMS, G. Increased feeding and neuropeptide Y (NPY) but not NPY mRNA level in the hypothalamus of the rat following central administration of the serotonin synthesis inhibitor p-chlorophenylalanine. *Brain Res*, v. 724, p. 232-237, 1996.

DYE, L.; BLUNDELL, J.E. Menstrual cycle and appetite control: implications for weight regulation. *Hum Reprod*, v. 12, p. 1142-51, 1997.

EBENEZER, I.S. Effects of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist, 8-OH-DPAT, on operant food intake in non-deprived rats. *Neuroreport*, v. 3, p. 62-64, 1992a.

EBENEZER, I.S. Effects of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist, 8-OH-DPAT on food intake in food-deprived rats. *Neuroreport*, v. 3, p. 1019-1022, 1992b.

EBENEZER, I.S. Effects of gepirone and buspirone on operant food intake in non-deprived rats. *Br. J. Pharmacol*, v. 110, p. 98P, 1993.

EBENEZER, I.S.; TITE, R. The dose-related effects of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist gepirone on operant and non-operant food intake in food deprived rats. *Br. J. Pharmacol*, v. 116, p. 227P, 1995.

EBENEZER, I.S. Effects of buspirone on operant and non-operant food intake in food-deprived rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol*, v. 18, p. 475-480, 1996.

EBENEZER, I.S.; PARROTT, R.F.; VELLUCCI, S.V. Effects of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT on operant food intake in food-deprived pigs. *Physiol Behav*, v. 67, p. 213-217, 1999.

EBENEZER, I.S.; VELLUCCI, S.V.; PARROTT, R.F. The differential effects of intravenously administered 8-OH-DPAT on operant food intake in satiated and food-deprived pigs are mediated by central 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Physiol Behav*, v. 73, p. 223-227, 2001.

EBENEZER, I.S.; TITE, R.M. Differential effects of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist gepirone on food intake in rats may depend on their motivation to eat. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, v. 25, p. 727-731, 2003.

EBENEZER, I.S.; ARKLE, M.J.; TITE, R.M. 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin inhibits food intake in fasted rats by an action at 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, v. 29, p. 269-272, 2007.

EBENEZER, I.S.; SURUJBALLY, A. The effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin on food intake in non-deprived C57BL6 mice. *Eur J Pharmacol*, v. 559, n. 2-3, p. 184-188, 2007.

ECKEL, L.A.; GEARY, N. Endogenous cholecystokinin's satiating action increases during estrus in female rats. *Peptides*, v. 20, n. 4, p. 451-456, 1999.

ECKEL, L.A.; HOUP, T.A.; GEARY, N. Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. *Physiol Behav*, v. 70, p. 397-405, 2000.

ECKEL, L.A.; MOORE, S.R. Diet-induced hyperphagia in the rat is influenced by sex and exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 287, n. 5, p. 1080-1085, 2004.

ECKEL, L.A.; RIVERA, H.M.; ATCHLEY, D.P. The anorectic effect of fenfluramine is influenced by sex and stage of the estrous cycle in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 288, p. 1486-1491, 2005.

ELIAS, C.F.; LEE, C.; KELLY, J.; ASCHKENASI, C.; AHIMA, R.S.; COUCYRO, P.R.; KUHAR, M.J.; SAPER, C.B.; ELQUIST, J.K. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, v. 21, p. 1375-1385, 1998.

ELMQUIST, J.K.; MARATOS-FLIER, E.; SAPER, C.B.; FLIER, J.S. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nature neuroscience*, v. 1, n. 6, p. 445-450, 1998a.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 97, p. 61-73, 2005.

FEIJÓ, F.M.; BERTOLUCI, M.C.; REIS, C. Serotonin and hypothalamic control of hunger: a review. *Rev Assoc Med Bras*, v. 57, n. 1, p. 74-77, 2010.

FEKETE, C.; LEGRADI, G.; MIHALY, E.; HUANG, Q.H.; TATRO, J.B.; RAND, W.M.; EMERSON, C.C.H.; LECHAN, R.M. Alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci*, v. 20, p. 1550-1558, 2000.

FEKETE, C.; SARKAR, S.; RAND, W.M.; HARNEY, J.W.; EMERSON, C.H.; BIANCO, A.C.; LECHAN, R.M. Agouti-Related Protein (AgRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AgRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology*, v. 143, n. 10, p. 3846-3853, 2002.

FISHETTE, C. T.; BIEGON, A.; MCEWEN, B. S. Sex steroid modulation of the serotonin behavioral syndrome. *Life Sci*, v. 35, p. 1197-1206; 1984.

FLETCHER, P.J. Increased food intake in satiated rats induced by the 5-HT antagonists methysergide, metergoline and ritanserin. *Psychopharmacology*, v. 96, p. 237-42, 1988.

FLETCHER, P.J.; DAVIES, M. The involvement of 5-hydroxytryptaminergic and dopaminergic mechanisms in the eating induced by buspirone, gepirone and ipsapirone. *Br J Pharmacol*, v. 99, p. 519-25, 1990.

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

FLETCHER, A.; BILL, D.J.; BILL, S.J.; CLIFFE, I.A.; DOVER, G.M.; FORSTER, E.A.; HASKINS, J.T.; JONES, D.; MANSELL, H.L.; REILLY, Y. WAY 100135: a novel, selective antagonist at presynaptic and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol*, v. 237, p. 283-291, 1993a.

FLETCHER, A.; CLIFFE, I.A.; DOURISH, C.T. Silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists: utility as research tools and therapeutic agents. *Trends Pharmacol. Sci*, v. 14, p. 41-48, 1993b.

FLETCHER, A.; FORSTER, E.A.; BILL, D.J.; BROWN, G.; CLIFFE, I.A.; HARTLEY, J.E.; JONES, D.E.; MCLENACHAN, A.; STANHOPE, K.J.; CRITCHLEY, D.J.; CHILDS, K.J.; MIDDLEFELL, V.C.; LANFUMEY, L.; CORRADETTI, R.; LAPORTE, A.M.; GOZLAN, H.; HAMON, M.; DOURISH, C.T. Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY 100635, a potent, selective and silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist. *Behav. Brain Res*, v. 73, p. 337-353, 1996.

FLUDDER, J. M.; TONGE, S. R. Variations in the concentrations of monoamines and their metabolites in eight regions of rat brain during the estrous cycle: A basis for interactions between hormones and psychotropic drugs. *J. Pharm. Pharmacol*, v. 27, p. 39, 1975.

FLUGGE, G.; PFENDER, D.; RUDOLPH, S.; JARRY, H.; FUCHS, E. 5HT1A receptor binding in the brain of cyclic and ovariectomized female rats. *J Neuroendocrinol*, v. 11, p. 243-249, 1999.

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

FREEMAN, M.; BUTCHER, R.; FUGO, N. Alterations of oocytes and follicles by delayed ovulation. *Biol Reprod*, v. 2, p. 209–215, 1970.

FREEMAN M.; SMITH, M.; NAZIAN, S.; NEILL, J. Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology*, v. 94, p. 875–882, 1974.

FREEMAN, M.E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, Neill J, eds. *The physiology of reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press; 613–658, 1994.

FREEMAN, M.E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E; NEIL, JD, editors. *The physiology of reproduction*. San Diego (CA): Academic Press & Elsevier; Third edition. p.2327-88, 2006.

GARATTINI, S.; MENNINI, T.; BENDOTTI, C.; INVERNIZZI, R.; SAMANIN, R. (1986). Neurochemical mechanism of action of drugs which modify feeding via the serotonergic system. *Appetite Suppl*, v. 7, p. 15–38, 1986.

GEARY, N.; TRACE, D.; MCEWEN, B.; SMITH, G.P. Cyclic estradiol replacement increases the satiety effect of CCK-8 in ovariectomized rats. *Physiol Behav*, v. 56, p. 281-289, 1994.

GEARY, N.; ASARIAN, L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiol Behav*, v. 67, p. 141-147, 1999.

GEARY, N. Estradiol, CCK and satiation. *Peptides*, v. 22, n. 8, p. 1251-1263, 2001.

GEARY, N.; ASARIAN, L.; KORACH, K.S.; PFAFF, D.W.; OGAWA, S. Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and

cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice. *Endocrinology*, v. 142, p. 4751-7, 2001.

GILBERT, F.; DOURISH, C.T. Effects of the novel anxiolytics gepirone, buspirone and ipsapirone on free feeding and on feeding induced by 8-OH-DPAT. *Psychopharmacology*, v. 93, p. 349-352, 1987.

GOUDIE, A.J.; THORNTON, E.W.; WHEELER, T.J. Effects of Lilly 110140, a specific inhibitor of 5-hydroxytryptamine uptake, on food intake and on 5-hydroxytryptophan-induced anorexia. Evidence for serotonergic inhibition of feeding. *J. Pharm. Pharmacol*, v. 28, p. 318-320, 1976.

GRAHAME-SMITH, D.G. The biosynthesis of 5-hydroxytryptamine in brain. *Biochem J*, v. 105, p. 351-360, 1967.

GREEN, A.A. Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol*, v. 147, p. S145-S152, 2006.

GRIEBEL, G.; RODGERS, R.J.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J. The effects of compounds varying in selectivity as 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists in three rat models of anxiety. *Neuropharmacology*, v. 39, p. 1848-1857, 2000.

GRIGNASCHI, G.; FANELLI, E.; SCAGNOL, I.; SAMANIN, R. Studies on the role of serotonin receptor subtypes in the effect of sibutramine in various feeding paradigms in rats. *Br J Pharmacol*, v. 127, n. 5, p. 1190-1194, 1999.

GUNDLAH, C.; SIMON, L.D.; AUERBACH, S.B. Differences in hypothalamic serotonin between estrous phases and gender: an in vivo microdialysis study. *Brain Res*, v. 785, p. 911-916, 1998.

HAHN, T.; BREININGER, J.; BASKIN, D.; SCHWARTZ, M. Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neurosci.*, v. 1, p. 271-272, 1998.

HALFORD, J.C.; BLUNDELL, J.E. The 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence. *Physiol Behav*, v. 60, n. 3, p. 933-939, 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. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 61, n. 2, p. 159-168, 1998.

HEINE, P.A.; TAYLOR, J.A.; IWAMOTO, G.A.; LUBAHN, D.B.; COOKE, PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 12729–34, 2000.

HEISLER, L.K.; COWLEY, M.A.; TECOTT, L.H.; FAN, W.; LOW, M.J.; SMART, J.L.; RUBINSTEIN, M.; TATRO, J.B.; MARCUS, J.N.; HOLSTEGE, H.; LEE, C.E.; CONE, R.D.; ELMQUIST, J.K. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science*, v. 297, p. 609-611, 2002.

HEISLER, L.K.; JOBST, E.E.; SUTTON, G.M.; ZHOU, L.; BOROK, E.; THORNTON-JONES, Z.; LIU, H.Y.; ZIGMAN, J.M.; BALTHASAR, N.; KISHI, T.; LEE, C.E.; ASCHKENASI, C.J.; ZHANG, C.Y.; YU, J.; BOSS, O.; MOUNTJOY, K.G.; CLIFTON, P.G.; LOWELL, B.B.; FRIEDMAN, J.M.; HORVATH, T.; BUTLER, A.A.; ELMQUIST, J.K.; COWLEY, M.A. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron*, v. 51, p. 239-249, 2006.

HEWITT, K.N.; LEE, M.D.; DOURISH, C.T.; CLIFTON, P.G. Serotonin 2C receptor agonists and the behavioural satiety sequence in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 71, p. 691-700, 2000.

HIKJI, K.; INOUE, K.; IWASAKI, S.; ICHIHARA, K.; KIRIIKE, N. Local perfusion of mCPP into ventromedial hypothalamic nucleus, but not into lateral hypothalamic area and frontal cortex, inhibits food intake in rats. *Psychopharmacology*, v. 174, p. 190-196, 2004.

HILLVER, S.E.; BJÖRK, L.; LI, Y.L.; SVENSSON, B.; ROSS, S.; ANDÉN, N.E.; HACKSELL, U. (S)-5-fluoro-8-hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin: a putative 5-HT<sub>1A</sub>-receptor antagonist. *J. Med. Chem*, v. 33, p.1541–1544, 1990.

HIRSCHBERG, A.L. Sex hormones, appetite and eating behaviour in women. *Maturitas*, v. 71, p. 248– 256, 2012.

HOYER, D.; BODDEKE, H.W.G.M. Partial agonists, full agonists, antagonists: dilemmas of definition. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 14, p. 270–275, 1993.

HOYER, D.; HANNON, J.P.; MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 71, n. 4, p. 533-554, 2002.

JAHNG, J.W.; HOUP, T.A.; KIM, S.J.; JOH, T.H.; SON, J.H. Neuropeptide Y mRNA and serotonin innervation in the arcuate nucleus of anorexia mutant mice. *Brain Res.*, v. 790, p. 67-73, 1998.

JHANWAR, U.M.; MOORJANI, B.; KAHN, A. H. Indications of pre- and post-synaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor interactions in feeding behavior and neuroendocrine regulation. *Brain Res.*, v. 646, p. 247-257, 1994.

JOHANSSON, L.; SOHN, D.; THORBERG, S.O.; JACKSON, D.M.; KELDER, D.; LARSSON, L.G.; RÉNYI, L.; ROSS, S.B.; WALLSTEN, C.; ERIKSSON, H.; HU, P.S.; JERNING, E.; MOHELL, N.; WESTLIND-DANIELSSON, A. The pharmacological characterization of a novel selective 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor antagonist, NAD-299. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 283, p. 216–225, 1997.

JOURDAN, D.; PIEC, I.; GAULIER, J.M.; LACASSIE, E.; ALLIOT, J. Effect of fenfluramine on caloric intake and macronutrient selection in Lou/c rats during aging. *Neurobiol Aging*, v. 24, n. 1, p. 67-76, 2003.

KALRA, S.P.; DUBE, M.G.; PU, S.; XU, B.; HORVATH, T.L.; KALRA, P.S. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.*, v. 20, p. 68-100, 1999.

KASTIN, A.J.; AKERSTROM, V.; PAN, W. Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *J Mol Neurosci.*, v. 18, n. 1-2, p. 7-14, 2002.

KELLEY, A. E.; BALDO, B. A.; PRATT, W. E.; WILL, M. J. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol. Behav.*, v. 86, p. 773–795, 2005.

KENNETT, G. A.; CHAOULOFF, F.; MARCOU, M.; CURZON, G. Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression, the possible role of serotonin. *Brain Res*, v. 382, p. 416-421, 1986.

KENNETT, G.A.; CURZON, G. Evidence that hypophagia induced by mCPP and TFMPP requires 5-HT1C and 5-HT1B receptors; hypophagia induced by RU 24969 only requires 5-HT1B receptors. *Psychopharmacology*, v. 96, n. 1, p. 93-100, 1988.

KLUMP, K.L.; KEEL, P.K.; CULBERT, K.M.; EDLER, C. Ovarian hormones and binge eating: exploring associations in community samples. *Psychol Med*, v. 38, p. 1749-57, 2008.

KROEZE, W.K.; KRISTIANSEN, K.; ROTH, B.L. Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem*, n. 2, p. 507-528, 2002.

LADISICH, W. Effect of progesterone on regional 5-hydroxytryptamine metabolism in the rat brain. *Neuropharmacology*, v. 13, p. 877-883, 1974.

LAM, D.D.; GARFIELD, A.S. MARSTON, O.J.; SHAW, J.; HEISLER, L.K. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol Biochem Behav*, n. 97, p. 84-91, 2010.

LAM, D.D.; HEISLER, L.K. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 9, n. 5, p. 1-24, 2007.

LAVIANO, A.; MEGUID, M.M.; GLEASON, J.R.; YANG, Z.J.; RENVYLE, T. Comparison of long-term feeding pattern between male and female Fischer 344 rats: influence of estrous cycle. *Am J Physiol*, v. 270, p. 413-419, 1996.

LEGRADI, G.; LECHAN, R.M. Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, v. 140, p. 3643-3652, 1999.

LEIBOWITZ, S.F.; ALEXANDER, J.T.; CHEUNG, W.K.; WEISS, G.F. Effects of serotonin and the serotonin blocker metergoline on meal patterns and macronutrient selection. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 45, p. 185-194, 1993.

LIANG, Y.Q.; AKISHITA, M.; KIM, S.; AKO, J.; HASHIMOTO, M.; LIJIMA, K.; OHIKE, Y.; WATANABE, T.; SUDOH, N.; TOBA, K.; YOSHIKUNI, M.; OUCHI, Y. Estrogen receptor beta is involved in the anorectic action of estrogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, v. 26, p. 1103-1109, 2002.

LINDÉN, A.; UVNÄS-MOBERG, K.; FORSBERG, G.; BEDNAR, I.; SÖDERSTEN, P. Involvement of cholecystokinin in food intake: III. Oestradiol potentiates the inhibitory effect of cholecystokinin octapeptide on food intake in ovariectomized rats. *J Neuroendocrinol*, v. 2, p. 797-801, 1990.

LONG, J.; EVANS, H. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. In: Leuschner A, ed. *Memoirs of the University of California*. Berkeley, CA: University of California Press; p. 1-149, 1922.

LÓPEZ-ALONSO, V.E.; MANCILLA-DIAZ, J.M.; RITO-DOMINGO, M.; GONZALEZ-HERNANDEZ, B.; ESCARTIN-PEREZ, R.E. The effects of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists on behavioral satiety sequence in rats. *Neurosci Lett*, v. 416, p. 285-288, 2007.

LU, N.Z.; BETHEA, C.L. Ovarian steroid regulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding and G protein activation in female monkeys. *Neuropsychopharmacology*, v. 27, p. 12-24, 2002.

MANCILLA-DIAZ, J.M.; ESCARTIN-PEREZ, R.E.; LOPEZ-ALONSO, V.E.; FLORAN-GARDUNO, B.; ROMANO-CAMACHO, J. Role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the hypophagic effect of 5-HT on the structure of feeding behavior. *Med Sci Monit*, v. 11, p. 74-79, 2005.

MASWOOD, S.; STEWART, G.; UPHOUSE, L. Gender and estrous cycle effects of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-OH-DPAT on hypothalamic serotonin. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 51, p. 807-813, 1995.

MATSUDA, M.; LIU, Y.; MAHANKALI, S.; PU, Y.; MAHANKALI, A.; WANG, J.; DEFRONZO, R.A.; FOX, P.T.; GAO, J.H. Altered hypothalamic function in response to glucose ingestion in obese humans. *Diabetes*, v. 48, n. 9, 1801-1806, 1999.

MCCARTHY, M.M.; BECKER, J.B. Neuroendocrinology of sexual behavior in the female. In: Becker JB, Breedlove SM, Crews D, McCarthy MM, eds. *Behavioral endocrinology*. 2nd ed. Cambridge, MA: MIT Press/Bradford Books; 117–151, 2002.

MEISTER, B. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiology & Behavior*, v. 92, p. 263-271, 2007.

MESSINA, M.M.; BOERSMA, G.; OVERTON, J.M.; ECKEL, L.A. Estradiol decreases the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone in ovariectomized rats. *Physiol Behav*, v. 88, p. 523-528, 2006.

MIHALY, E.; FEKETE, C.; LEGRADI, G.; LECHAN, R.M. Hypothalamic dorsomedial nucleus neurons innervate thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res*, v. 891, n. 1, p. 20-31, 2001.

MOKROSZ, M.J.; CHOJNACKA-WOJCIK, E.; TATARCZYNSKA, E.; KLODZINSKA, A.; FILIP, M.; BOKSA, J.; CHARAKCHIEVA-MINOL, S.; MOKROSZ, J.L. 1-(2-Methoxyphenyl)-4-[(4-succinimido)butyl]-piperazine (MM 77): a new, potent, postsynaptic antagonist of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Medical and Chemical Research*, v. 4, p. 161–169, 1994.

MOON, Y.W.; CHOI, S.H.; YOO, S.B.; LEE, J.H.; JAHNG, J.W. 5-hydroxy-L-tryptophan suppressed food intake in rats despite an increase in the arcuate NPY expression. *Experimental Neurobiology*, v. 19, p. 132-139, 2010.

MORENS, C.; NORREGAARD, P.; RECEVEUR, J.M.; VAN DIJK, G.; SCHEURINK, A.J. Effects of MCH and a MCH<sub>1</sub>-receptor antagonist on (palatable) food and water intake. *Brain Res*, v. 1062, p. 32-38, 2005.

MORTON, G.J.; CUMMINGS, D.E.; BASKIN, D.G.; BARSH, G.S.; SCHWARTZ, M.W. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, v. 443, n. 21, p. 289-295, 2006.

MOURA, P.R.; VIDAL, F.A.P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. *Schientia Medica*, v. 21, p. 31-36, 2011.

MURPHY, K.G.; BLOOM, S.R. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*, v. 444, p. 854-859, 2006.

NISWENDER, K.D.; SCHWARTZ, M.W. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol*, v. 24, p. 1-10, 2003.

NONAKA, N.; SHIODA, S.; NIEHOFF, M.L.; BANKS, W.A. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 306, n. 3, p. 948-953, 2003.

NONOGAKI, K. 5-HT and NA reuptake inhibitors and appetite regulation: The role of central 5-HT network. *Immun Endoc & metabol Agents in Med Chem*, v. 8, p. 303-310, 2008.

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, v. 164, p. 719-721, 1969.

OLOFSSON, L.E.; PIERCE, A.A.; XU, A.W. Functional requirement of AgRP and NPY neurons in ovarian cycle-dependent regulation of food intake. *Proc Nat Acad Sci USA*, v. 106, p. 15932-7, 2009.

OTTONI, EB. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav Res Meth Instrum Comput*, v. 32, p. 446-449, 2000.

OWYANG, C.; HELDSINGER, A. Vagal control of satiety and hormonal regulation of appetite. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, v. 17, n. 4, p. 338-348, 2011.

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

PARKER, G.C.; COSCINA, D.V. Lesions of the posterior basolateral amygdala block feeding induced by systemic 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 68, p. 729-734, 2001.

PARKER, G.C.; BISHOP, C.; COSCINA, D.V. Estrous cycle and food availability affect feeding induced by amygdala 5-HT receptor blockade. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 71, p. 701-707, 2002.

POLTER, A.M.; LI, X. 5-HT<sub>1A</sub> receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cellular Signalling*, v. 22, p. 1406-1412, 2010.

RACINE, S.E.; CULBERT, K.M.; KEEL, P.K.; SISK, C.L.; BURT, S.A.; KLUMP, K.L. Differential Associations between Ovarian Hormones and Disordered Eating Symptoms across the Menstrual Cycle in Women. *Int J Eat Disord*, v. 45, p. 333-344, 2012.

RAPPORT, M.M.; GREEN, A.A.; PAGE, I.H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem*, n. 176, n. 3, p. 1243-1251, 1948.

REHAVI, M.; SEPCUTI, H.; WEIZMAN, A. Upregulation of imipramine binding and serotonin uptake by estradiol in female rat brain. *Brain Res*, v. 410, p. 135-139, 1987.

RIVERA, H.M.; ECKEL, L.A. The anorectic effect of fenfluramine is increased by estradiol treatment in ovariectomized rats. *Physiol Behav.*, v. 86, p. 331-337, 2005.

ROESCH, D.M. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiology & Behavior*, v. 87, p. 39-44, 2006.

RUETER, L.E.; FORNAL, C.A.; JACOBS, B.L. A critical review of 5-HT brain microdialysis and behavior. *Rev Neurosci*, v. 8, n. 2, p. 117-137, 1997.

SAKURAI, T.; AMEMIYA, A.; ISHII, M.; MATSUZAKI, I.; CHEMELLI, R.M.; TANAKA, H.; WILLIAMS, S.C.; RICHARDSON, J.A.; KOZLOWSKI, G.P.; WILSON, S.; ARCH, J.R.; BUCKINGHAM, R.E.; HAYNES, A.C.; CARR, S.A.; ANNAN, R.S.; MCNULTY, D.E.; LIU, W.S.; TERRETT, J.A.; ELSHOURBAGY, N.A.; BERGSMA,

D.J.; YANAGISAWA, M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, v. 92, n. 4, p. 573-585, 1998.

SALAMANCA, S.; UPHOUSE, L. Estradiol modulation of the hyperphagia induced by the 5-HT1A agonist, 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 43, p. 953-955, 1992.

SAMANIN, R.; MENNINI, T.; GARATTINI, S. Evidence that it is possible to cause anorexia by increasing release and/or directly stimulating postsynaptic serotonin receptors in the brain. *Prog. Neuropsychopharmacol*, v. 4, p. 363-369, 1980.

SAMANIN, R.; MENNINI, T.; BENDOTTI, C.; BARONE, D.; CACCIA, S.; GARATTINI, S. Evidence that central 5-HT2 receptors do not play an important role in the anorectic activity of Dfenfluramine in the rat. *Neuropharmacology*, v. 28, n. 5, p. 465-469, 1989.

SANTOLLO, J.; WILEY, M.D.; ECKEL, L.A. Acute activation of ER alpha decreases food intake, meal size, and body weight in ovariectomized rats. *American Journal of Physiology Regulatory, integrative and Comparative Physiology*, v. 293, p. R2194-201, 2007.

SANTOLLO, J.; ECKEL, L.A. The orexigenic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) is influenced by sex and stage of the estrous cycle. *Physiol Behav*, v. 93, n. 4-5, p. 842-850, 2008.

SANTOLLO, J.; TORREGROSSA, A.; ECKEL, L. Estradiol acts in the medial preoptic area, arcuate nucleus, and dorsal raphe nucleus to reduce food intake in ovariectomized rats. *Hormones and Behavior*, v. 60, p. 86-93, 2010.

SANTOLLO, J.; YAO, D.; NEAL-PERRY, G.; ETGEN, A.M. Middle-aged female rats retain sensitivity to the anorexigenic effect of exogenous estradiol. *Behavioural Brain Research*, v. 232, p. 159-164, 2012.

SANTOS, L.; DE ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI-JUNIOR, H. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the rat elevated T-maze test of anxiety. *Psychopharmacology*, v. 179, p. 733-741, 2005.

SARKAR, S.; LECHAN, R.M. Central administration of neuropeptide Y reduces  $\alpha$ melanocyte-stimulating hormone-induced cyclic adenosine 5-monophosphate response element binding protein (CREB) phosphorylation in pro-thyrotropin-releasing hormone 92 neurons and increases CREB phosphorylation in corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, v. 144, p. 281-291, 2003.

SCHOEFFTER, P.; BOBIRNAC, I.; BODDEKE, E.; HOYER, D. Inhibition of cAMP accumulation via recombinant human serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors: considerations on receptor effector coupling across systems. *Neuropharmacology*, v. 36, p. 429-437, 1997.

SCHWARTZ, M.W.; WOODS, S.C.; JUNIOR, D.P.; SEELEY, R.J.; BASKING, D.G. Central nervous system control of food intake. *Nature*, v. 404, p. 661-671, 2000.

SHARP, T.; BRAMWELL, S. R.; GRAHAME-SMITH, D. G. 5-HT<sub>1A</sub> agonists reduce 5-hydroxytryptamine release in rat hippocampus in vivo as determined by brain microdialysis. *Br. J. Pharmacol*, v. 96, p. 283-290; 1989.

SHARP, T.; BACKUS, L. I.; HJORTH, S.; BRAMWELL, S.R.; GRAHAME-SMITH, D.G. Further investigation of the in vivo pharmacological properties of the putative 5-HT<sub>1A</sub> antagonist, BMY 7378. *Eur. J. Pharmacol*, v. 176, p. 331-340, 1990.

SHARP, T.; MCQUADE, R.; FOZARD, J.R.; HOYER D. 1993. The novel 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, SDZ 216-525, decreases 5-HT release in rat hippocampus in vivo. *Br. J. Pharmacol*, v.109, p. 699-702, 1993.

SHEARMAN, L.P.; CAMACHO, R.E; STRIBLING, D.S.; ZHOU, D.; BEDNAREK, M.A; HRENIUK, D.L; FEIGHNER, S.D.; TAN, C.P.; HOWARD, A.D.; VAN DER PLOEG, L.H.T.; MCINTYRE, D.E.; HICKEY, G.J.; STRACK, A.M. Chronic MCH-1 receptor modulation alters appetite, body weight and adiposity in rats, *Eur. J. Pharmacol*, v. 475, p. 34-47, 2003.

SILVA, A.D.; BLOOM, S.R. Gut hormones and appetite control: a focus on PYY and GLP-1 as therapeutic targets in obesity. *Gut and liver*, v. 6, n. 1, p. 10-20, 2012.

SIMANSKY, K.J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res*, v. 73, n. 1-2, p. 37-42, 1996.

SIMPSON, K.A.; MARTIN, N.M.; BLOOM, S.R. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metab*, p. 53-62, 2009.

SOTONYI, P.; GAO, Q.; BECHMANN, I.; HORVATH, T.L. Estrogen promotes parvalbumin expression in arcuate nucleus POMC neurons. *Reprod Sci*, v.17, p.1077–80, 2010.

SPROUSE, H. S.; AGHAJANIAN, G. K. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2B</sub> agonists. *Synapse*, v. 1, p. 3-9; 1987.

STALLONE, D.; NICOLAIDIS, S. Increased food intake and carbohydrate preference in the rat following treatment with the serotonin antagonist metergoline. *Neurosci Lett*, v. 2, p. 319-324, 1989.

STANLEY, B.G.; MAGDALIN, W.; SEIRAFI, A.; THOMAS, W.J.; LEIBOWITZ, S.F. The perifornical area: the major focus of patchily distributed hypothalamic neuropeptide Y-sensitive feeding system(s). *Brain Res*, v. 104, p. 304-317, 1993.

STANLEY, S.; WYNNE, K.; MCGOWAN, B.; BLOOM, S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev*, v. 85, n. 4, p. 1131-1158, 2005.

STEFFENS, S.M.; CUNHA, I.C.; BECKMAN, D.; LOPES, A.P.F.; FARIA, M.S.; MARINO-NETO, J.; PASCHOALINI, M.A. The effects of metergoline and 8-OH-DPAT injections into arcuate nucleus and lateral hypothalamic area on feeding in female rats during the estrous cycle. *Physiology & Behavior*, v. 95, p. 484–491, 2008.

STEFFENS, S.M.; BECKMAN, D.; FARIA, M.S.; MARINO-NETO, J.; PASCHOALINI, M.A. WAY100635 blocks the hypophagia induced by 8-OH-DPAT in the hypothalamic nuclei. *Physiology and Behavior*, v. 99, p. 632-637, 2010.

STELLAR, E. The physiology of motivation. *Psychol Rev*, v. 61, p. 5-22, 1954.

SUZUKI, K.; JAYASENA, C.N.; BLOOM, S.R. The gut hormones in appetite regulation. *Journal of obesity*, v. 2011, p. 1-10, 2011.

SWIERGIEL, A.H.; DUNN, A.J. Lack of evidence for a role of serotonin in interleukin-1- induced hypophagia. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 65, n. 3, p. 531-537, 2000.

THAMMACHAROEN, S.; GEARY, N.; LUTZ, T.A.; OGAWA, S.; ASARIAN, L. Divergent effects of estradiol and the estrogen receptor-alpha agonist PPT on eating and activation of PVN CRH neurons in ovariectomized rats and mice. *Brain Research*, v. 1268, p. 88-96, 2009.

TRUJILLO, M.L.; SPUCH, C.; CARRO, E.; SEÑARIS, R. Hyperphagia and central mechanisms for leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology*, v. 152, n. 4, p. 1355-1365, 2011.

TRULSON, M.E.; JACOBS, B.L. Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res*, v. 163, p. 135-150, 1979.

TWAROG, B.M.; PAGE, I.H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol*, v. 175, p. 157-161, 1953.

UCHOA, E.T.; SILVA, L.E.C.M.; CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L.L.K. Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. *Neuropeptides*, p. 1-6, 2012.

UPHOUSE, L.; WILLIAMS, J.; ECKOLS, K.; SIERRA, V. Variations in binding of <sup>3</sup>H-5-HT to cortical membranes during the female estrous cycle. *Brain Res*, v. 381, p. 376-381, 1986.

UPHOUSE, L.; SALAMANCA, S.; CALDAROLA-PASTUSZKA, M. Estrous cycle differences in the response to the 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 40, p. 901-906, 1991.

VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, v. 18, n. 2, p. 158-168, 2008.

VOIGT, J.P.; KIENZLE, F.; SOHR, R.; REX, A.; FINK, H. Feeding and 8-OH-DPAT Related Release of Serotonin in the Rat Lateral Hypothalamus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 65, n. 1, p. 183-189, 2000.

WADE, G.N.; SCHNEIDER, J.E. Metabolic fuels and reproduction in female mammals. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 16, p. 235-72, 1992.

WESOŁOWSKA, A.; PLUCHOWSKA, M.; CHOJNACKA-WOJCIK, E. Involvement of presynaptic 5-HT<sub>1A</sub> and benzodiazepine receptors in the anticonflict activity of 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*, v. 471, p. 27-34, 2003.

WILLIAMS, G.; HARROLD, J.A.; CUTLER, D.J. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Nutrition Society*, v. 59, p. 385-396, 2000.

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. *Physiology & Behavior*, v. 74, p. 683-701, 2001.

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

WOODS, S.C.; SCHWARTZ, M.W.; BASKIN, D.G.; SEELEY, R.J. Food intake and the regulation of body weight. *Annu. Rev. Psychol.*, v. 51, p. 255-277, 2000.

YOUNG, J.R.; JAFFE, R.B. Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women II. Effects of varying concentrations of estradiol. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 42, p.432-42, 1976.

