

Natália Saretta Sulzbach

**PADRÕES DE ATIVAÇÃO DE NEURÔNIOS  
SEROTONÉRGICOS E CATECOLAMINÉRGICOS  
RELACIONADOS À INGESTÃO DE ALIMENTOS NO TRONCO  
ENCEFÁLICO DE POMBOS (*COLUMBA LIVIA*)**

Dissertação submetida ao Programa de pós-graduação multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto

Florianópolis  
2013

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

Sulzbach, Natália Saretta  
Padrões de ativação de neurônios serotoninérgicos e catecolaminérgicos relacionados à ingestão de alimentos no tronco encefálico de pombos (*Columba livia*) / Natália Saretta Sulzbach; orientador, José Marino Neto - Florianópolis, SC, 2013.  
122 p.

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

Inclui referências

1. Ciências Fisiológicas. 2. Ingestão de alimentos. I. Neto, José Marino. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

**“Padrões de ativação de neurônios serotoninérgicos e catecolaminérgicos relacionados à ingestão de alimentos no tronco encefálico de pombos (*Columba livia*)”**

por

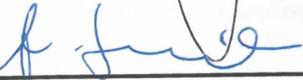
**Natália Saretta Sulzbach**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 02/PPGMCF/2013) do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

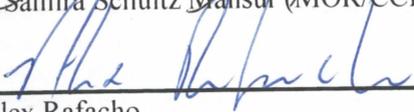
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Marino-Neto (Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Fernanda Barbosa Lima Christian (CFS/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion (ICBS/UFRGS) externo Nucleadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Samira Schultz Mansur (MOR/CCB/UFSC) (Externo)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alex Rafacho  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - UFSC

Florianópolis, **05 de julho de 2013.**



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, que com todo amor proporcionaram o convívio familiar, educação e apoio essenciais à minha formação. Sem eles eu não teria chegado até aqui...

Por ordem de contato pessoal com a UFSC gostaria primeiramente de agradecer à profa. Dra. Cilene Lino de Oliveira, coordenadora do curso quando ingressei. Tenho certeza que sua atenção e disponibilidade quando me interessei pelo programa foram o maior incentivo para que eu não desistisse.. Ao meu orientador prof. Dr. José Marino-Neto, que confiou em mim e me aceitou como orientanda mesmo “caindo de pára-quedas na pós-graduação”.. Agradeço muito por ter tido a oportunidade de ser sua “exceção à regra do estágio prévio” e por me fazer perceber que a neuroanatomia pode ser tanto quanto ou mais interessante que a fisiologia cardiorrespiratória. Agradeço também à todas as pessoas que conheci nesse período de mestrado, pelos colegas e também amigas que certamente levarei por toda a vida. Um muito obrigada mais do que especial ao Tiago Souza dos Santos, que me ensinou muito sobre esse mundo da pesquisa com tanta paciência.. Você é parte desse trabalho, que não existiria (pelo menos ainda) sem a sua importantíssima participação.. Um outro muito obrigada especial à Margel Cantarelli e Myla Bittencourt, que se dedicaram a esse trabalho de uma forma admirável. Vocês foram muito importantes pra mim e serei eternamente grata ao auxílio e amizade de vocês! Vai um agradecimento especial também aos colegas Fernanda Possamai, William Spudeit, Gabriela Huning, Ana Carolina, Fernando Melleu, Angeluz da Costa Canena, Luiz Tauffer, Michele Vaz e Carlos Crispim, que de alguma forma tiveram uma participação importante nesse trabalho, seja com algum “trabalho braçal”, científico ou alguma boa ideia. Vale até ajuda na “caça ao pombo fujão” ou uma conversa inspiradora ou consoladora, né Fernanda?? Ainda preciso agradecer à amigos que encontrei na UFSC e que não tiveram uma participação direta nesse trabalho, mas que mesmo assim foram de grande importância para que ele se concretizasse, pelos momentos de convívio e apoio: Lucas Debarba (meu grande amigo para sempre), Ana Paula Taschetto, Cristiane Lavado, Larissa Kochenborger, William Castañeda (mexicano) e Katia Motta (companheira de intermináveis dias de estudos da UFRGS). Por fim agradeço às pessoas que mesmo sem ter muita idéia do que eu fazia (com perguntas do tipo: você vai pra “aula” hoje? O que você faz todo dia na UFSC? Mas que sempre me apoiaram e fizeram os momentos de folga muito mais agradáveis: Thays Saretta Sulzbach, Joana de Rocco, Larissa Tagliari, Fernando Damiani e Otávio Peixer.



## RESUMO

A ingestão de alimentos fornece os nutrientes adequados e substratos energéticos para a ocorrência de reações bioquímicas que geram oscilações no metabolismo celular. Isto é acompanhado por flutuações hormonais que por sua vez regulam a alimentação e o metabolismo. Inúmeros estudos, com distintas técnicas e protocolos experimentais, nas últimas décadas, vêm investigando os mecanismos neurais envolvidos no comportamento ingestivo. A identificação de circuitos e substâncias envolvidas na modulação desse comportamento torna-se cada vez mais compreendido. Os circuitos centrais serotoninérgicos e catecolaminérgicos estão fortemente envolvidos no controle da ingestão de diversas substâncias e nutrientes, como alimentos sólidos, água, sódio e álcool. Neste trabalho descrevemos a distribuição da marcação da proteína Fos, além da dupla marcação Fos+/TPH+ e Fos+/TH+ em neurônios do tronco encefálico de pombos adultos após um evento ingestivo. Essa descrição foi acompanhada por uma análise dos comportamentos que se associam a tal ingestão. Dezoito pombos adultos foram divididos em 3 grupos experimentais: grupo Palatável (submetido a 1 hora de privação alimentar, seguida por ingestão intensa de ração palatável), grupo Privação (submetido a privação alimentar de 1 hora, com ausência da re-apresentação da comida após esse período) e grupo Controle (ração comum e água disponíveis *ad libitum*). Além disso, para investigação do trânsito e esvaziamento gástrico, além das condições de enchimento do trato gastrointestinal superior (TGIS) em períodos de jejum e saciedade destes animais, o conteúdo do TGIS foi separado em porções contidas no Inglúvio (papo), proventrículo (estômago glandular) e ventrículo (moela) e mensurado após diferentes regimes experimentais. O grupo experimental Palatável foi o único que exibiu um acentuado comportamento ingestivo, e, conseqüentemente, uma seqüência comportamental de saciedade (SCS) intensa e consistente. O tempo de distância entre os comportamentos ingestivos e os outros comportamentos que fazem parte dessa seqüência foi aceitável para afirmarmos que os resultados obtidos na análise da marcação da proteína Fos esteja especialmente ligada à ingestão, e não a outros comportamentos. A análise total da expressão da proteína Fos em todos os núcleos demonstrou que o grupo Controle mantém uma ativação neuronal consistentemente moderada e estável. Já no grupo Palatável observamos uma redução geral na atividade dos neurônios localizados nesses núcleos, e diferenças entre este e o grupo Controle aparecem em

quase todas as regiões analisadas. O grupo Privação foi o que menos apresentou diferenças em comparação ao grupo Controle. Isso indica que na maioria dos casos estudados, a privação alimentar por uma hora não afeta de forma importante a atividade dos núcleos do tronco cerebral investigados aqui. A intensa ingestão de alimentos também parece estar associada a uma redução geral da expressão de dupla marcação Fos+/TPH+. Já com relação à expressão de neurônios catecolaminérgicos ativos, a intensa ingestão alimentar parece reduzir o número dessas células em alguns núcleos, como o A8, o A6 e o Scd, aumentar em outros, como os núcleos LC e CS, e não afetar os núcleos An1 e Rp. Apesar de terem sido encontradas diferenças significantes entre os grupos experimentais nos casos de neurônios serotonérgicos e/ou catecolaminérgicos ativos, essas duplas marcações aparecem sempre em número bastante pequeno. Quando comparamos a população total existente de células serotonérgicas e/ou catecolaminérgicas nesses núcleos, os casos desses neurônios ativos em qualquer uma das três situações, parece ser pouco significativa. Ou seja, a grande maioria da população de neurônios serotonérgico e/ou catecolaminérgicos encontrada nessas regiões não é afetada pelo protocolos relacionados à ingestão aqui realizados. Apesar disso, em diversos desses núcleos a densidade de expressão Fos varia significativamente, em números proporcionalmente muito maiores. Isso sugere que na fase de pré-saciação em que se encontram os animais do grupo Palatável, outros grupos neuronais, que não serotonérgicos ou catecolaminérgicos, estejam fortemente envolvidos.

**Palavras-chave:** *Columba livia*, ingestão, serotonina, catecolaminas, tronco encefálico.

## ABSTRACT

Food intake provides the appropriate nutrients and energy substrates for the occurrence of biochemical reactions that generate oscillations in cellular metabolism. This is accompanied by hormone fluctuations which in turn regulate feeding and metabolism. Numerous studies with different techniques and experimental protocols have been investigating the neural mechanisms involved in feeding behavior. The identification of circuits and substances involved in the modulation of this behavior makes it increasingly understood. The central circuits catecholaminergic and serotonergic are involved in the ingestion control of various substances and nutrients such as solid foods, water, sodium and alcohol. Here we describe the distribution of Fos protein labeling, as well as double-labeling Fos + / TPH + and Fos + / TH + neurons in the brainstem of adult pigeons after an ingestive event. This description was accompanied by an analysis of the behaviors that are associated with food intake. Eighteen adult pigeons were divided into three experimental groups: Palatable (subjected to 1 hour of food deprivation, followed by intense palatable food intake) Deprivation group (subjected to food deprivation for 1 hour without refeeding after this period) and Control group (usual food and water available ad libitum). Furthermore, to investigate gastric transit and emptying, and filling conditions of superior gastrointestinal tract (SGIT) during periods of fasting and satiety, the contents of SGIT was separated into portions in the crop, proventriculus (glandular stomach) and ventriculus (gizzard) and measured after different experimental regimes. The Palatable group was the only one that exhibited a intense intake behavior, and, consequently, a behavioral satiety sequence (BSS) intense and consistent. The time distance between ingestive behaviors and others that are part of this sequence was acceptable for affirming that the results obtained for marking the Fos protein is particularly related to ingestion, and not other behaviors. The total analysis of Fos expression in all nuclei demonstrated that Control group consistently maintains a moderate and stable neuronal activation. In Palatable group was observed a general reduction in the activity of neurons located in these nuclei and differences between this group and the control appear in almost all regions analyzed. The deprivation group showed less differences compared to Control group. This indicates that in most cases studied, the food deprivation for an hour does not affect significantly the activity of brainstem nuclei investigated here. The intense food intake also

appears to be associated with a general reduction in the expression of Fos double labeling + / + TPH. As to the expression of catecholaminergic neurons active, intense food intake appears to reduce the number of these cells in some nuclei, such as the A8, A6 and Scd, increase in others, such as LC and CS, and not affect the Anl and Rp. Although significant differences were found between the experimental groups in cases of serotonergics and / or catecholaminergics active neurons, these markings appear always small in numbers. When comparing the total population of serotonergic and / or catecholaminergic cells, these active neurons in any of the three situations, seems to be little significant. In other words, the majority of the population of serotonergic and / or catecholaminergic neurons found in these regions is not affected by protocols performed here. Nevertheless, in several of these nuclei the density of Fos expression varies significantly, in larger numbers. This suggests that in the pré-satiation other neuronal groups that not catecholaminergic or serotonergic, are strongly involved.

**Keywords:** *Columba livia*, food intake, serotonin, catecholamines, brainstem.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Secções frontais do tronco encefálico do pombo mostrando as áreas de contagem. ....	43
<b>Figura 2:</b> Anatomia do trato gastrointestinal superior de aves. ....	45
<b>Figura 3:</b> Consumo, de ração e água. ....	47
<b>Figura 4:</b> Sequência comportamental de saciedade (SCS). ....	48
<b>Figura 5:</b> Duração dos comportamentos de comer, beber, auto-limpeza e repouso. ....	51
<b>Figura 6:</b> latência dos comportamentos de comer, beber, auto-limpeza e repouso. ....	52
<b>Figura 7:</b> Pico dos comportamentos de comer, beber, auto-limpeza e repouso. ....	54
<b>Figura 8:</b> Conteúdo do trato gastrointestinal superior (inglúvio, proventrículo e ventrículo). ....	55
<b>Figura 9:</b> Desenhos esquemáticos de secções frontais do tronco encefálico do pombo. ....	56
<b>Figura 10:</b> Fotomicrografias de secções do tronco encefálico marcadas por imunoistoquímica para a proteína FOS representando os núcleos: A8, Scd, LC, CS, Anl. ....	61
<b>Figura 11:</b> Fotomicrografias de secções do tronco encefálico marcadas por imunoistoquímica para a proteína FOS representando os núcleos: A6, Rp, PBdm e PBvl. ....	62
<b>Figura 12:</b> Fotomicrografias de secções do tronco encefálico marcadas por imunoistoquímica de dupla marcação para a proteína FOS e para TPH (núcleos: A8, Scd, LC, CS e Anl). ....	65
<b>Figura 13:</b> Fotomicrografias de secções do tronco encefálico marcadas por imunoistoquímica de dupla marcação para a proteína FOS e para TPH (núcleos A6 e Rp) ....	66
<b>Figura 14:</b> Fotomicrografias de secções do tronco encefálico marcadas por imunoistoquímica de dupla marcação para a proteína FOS e para TH (núcleos: A8, Scd, LC, CS e Anl). ....	69

<b>Figura 15:</b> Fotomicrografias de secções do tronco encefálico marcadas por imunistoquímica de dupla marcação para a proteína FOS e para TH (núcleos A6 e Rp). .....	70
<b>Figura 16:</b> Fotomicrografias de secções do tronco encefálico marcadas por imunistoquímica para TPH e para TH, demonstrando as diferenças de marcação. ....	73
<b>Figura 17:</b> Fotomicrografias de secções adjacentes do núcleo A8, marcadas por imunistoquímica de dupla marcação FOS+/TPH+ FOS+/TH+ .....	74
<b>Figura 18:</b> Fotomicrografias da região do AVT em diferentes magnificações, demonstrando as diferenças na marcação de células catecolaminérgicas e células serotonérgicas. ....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Catálogo com descrição comportamental.....	36
<b>Tabela 2:</b> Efeito dos diferentes protocolos experimentais sobre a duração, frequência e latência dos comportamentos de comer, beber, auto-limpeza e repouso.....	52
<b>Tabela 3:</b> Análise qualitativa do total de células FOS+ em todos os núcleos.....	58
<b>Tabela 4:</b> Efeitos dos diferentes protocolos de ingestão sobre a expressão Fos em neurônios serotoninérgicos.....	67
<b>Tabela 5:</b> Efeitos dos diferentes protocolos de ingestão sobre a expressão Fos em neurônios catecolaminérgicos. ....	70



## ABREVIATURAS

5-HT: 5- hidroxitriptamina (serotonina);

BSA: soro albumina bovina;

CCK: colecistoquinina;

DAB: 3.3'- diaminobenzidina;

ICV: intracerebroventricular;

IgG: imunoglobulina G;

MET: metergolina;

n: núcleo;

PBS: solução salina tamponada;

PHE: fenilefrina;

SCS: sequência comportamental de saciedade;

TGI: trato gastrointestinal;

TGIS: trato gastrointestinal superior;

TH: tirosina hidroxilase;

TPH: triptofano hidroxilase.



## LISTA DE ABREVIATURAS NEUROANATÔMICAS

Anl, *nucleus annularis*;

A6, (ou LoC, *nucleus locus ceruleus*, parte caudal);

A8, (ou LoC, *nucleus locus ceruleus*, parte rostral);

AVT, *área ventralis tegmenti*;

PBdm, núcleo parabraquial dorsomedial;

PBvl, núcleos parabraquial ventrolateral;

BC, *brachium conjunctivum*;

BCD, *brachium conjunctivum descendens*;

CS, *nucleus centralis superiores*;

flm, *fasciculus longitudinalis medialis*;

GCt, substância cinzenta central (*substantia grisea centralis*);

IcO, *nucleus intercollicularis*;

IP, *nucleus interpeduncularis*;

La, *nucleus laminaris*;

LC, *nucleus linearis caudalis* ;

LoC, *locus coeruleus*;

MLd, *nucleus mesencephalicus lateralis, pars ventralis*;

nIV, núcleo do nervo troclear;

NTS, núcleo do trato solitário;

PaM, *nucleus paramedianus*;

PL, *nucleus pontis lateralis*;

PM, *nucleus pontis medialis*;

PVN, núcleo paraventricular magnocelular;

RNM, núcleo mediano da rafe;

Rp, *nucleus raphe pontis*;

Rpc, *nucleus vestibularis parvocellularis*;

SCd, *nucleus subceruleus dorsalis*;

SLu, *nucleus semilunaris*;

TIO, trato istmo-óptico (*tractus isthmus-opticus*);

VeM, *nucleus vestibularis medialis*;

Zpflm, zona peri-fascículo longitudinal medial.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
1.1 OBJETIVOS.....	31
1.1.1 Objetivo geral .....	31
1.1.2 Objetivos específicos .....	31
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
2.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS .....	33
2.1.1 Animais e ambientação .....	33
2.2 ANÁLISE COMPORTAMENTAL E INGESTIVA .....	34
2.2.1 Grupo sem manipulação (Controle) .....	34
2.2.2 Grupo sem alimentação (Privação).....	35
2.2.3 Grupo experimental ingestão intensa (Ingestão) .....	35
2.3 REGISTROS COMPORTAMENTAIS .....	35
2.4 PREPARAÇÃO DO TECIDO .....	37
2.5 PROCEDIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS .....	38
2.5.1 Imunorreatividade à Fos.....	38
2.5.2 Imunorreatividade à Fos + TPH e Fos + TH .....	40
2.6 CONTEÚDO DO TRATO GASTROINTESTINAL SUPERIOR .....	44
2.7 ANÁLISE DOS DADOS .....	46
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
3.1 PERFIL DO COMPORTAMENTO INGESTIVO E PÓS-PRANDIAL.....	47
3.2 CONTEÚDO DO TRATO GASTROINTESTINAL SUPERIOR .....	55
3.3 DOS PROCEDIMENTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS .....	56
3.3.1 Distribuição da marcação Fos+.....	57

<b>3.3.2 Distribuição de marcação TPH+ e TH+.....</b>	<b>63</b>
<b>3.3.3 Distribuição de dupla marcação FOS+/TPH+.....</b>	<b>63</b>
<b>3.3.4 Distribuição de dupla marcação FOS+/ TH+ .....</b>	<b>68</b>
<b>3.3.5 Diferenças entre a marcação TPH+ e TH+.....</b>	<b>71</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A ingestão de alimentos fornece os nutrientes adequados e substratos energéticos para a ocorrência de reações bioquímicas que geram oscilações no metabolismo celular (DIETRICH e HORVATH, 2009; PARK *et al.*, 1995). Isto é acompanhado por flutuações hormonais que, por sua vez regulam a alimentação e o metabolismo (DIETRICH e HORVATH, 2009). Inúmeros estudos, com distintas técnicas e protocolos experimentais, têm investigado os mecanismos neurais envolvidos no comportamento ingestivo de mamíferos (STANLEY e LEIBOWITZ, 1984; ZHANG *et al.*, 1994; HORVATH e DIANO, 2004; FULTON *et al.*, 2006; HOMMEL *et al.*, 2006; DIETRICH e HORVATH, 2009). Assim, a identificação de circuitos e substâncias envolvidas na modulação desse comportamento torna-o cada vez mais compreendido. Conhecidas funções que compreendem as diversas fases do comportamento alimentar podem ser divididas em componentes motivacionais, endócrinos, somáticos e autonômicos (KROWICKI e HORNBY, 1995; PARK *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 2002). Tais componentes têm como resposta alterações das secreções pancreáticas endócrinas e exócrinas, alterações somáticas e viscerais (LEIBOWITZ e STANLEY, 1986), bem como mudanças nas secreções e motilidade gástrica (YANG *et al.*, 1990; 1993; KROWICKI e HORNBY, 1994) alterações respiratórias, e na regulação do ciclo circadiano (RICHERSON *et al.*, 2001, WANG *et al.*, 2001).

Os eventos envolvidos na regulação do comportamento alimentar são integrados principalmente no hipotálamo. Existem evidências de que áreas específicas do hipotálamo medial são importantes na regulação da ingestão de alimentos (ANAND e BROBECK, 1951; DIETRICH e HORVATH, 2009). Lesões realizadas em áreas mediais levam à hiperfagia e obesidade (BROBECK, 1946; ANAND e BROBECK, 1951; DIETRICH e HORVATH, 2009), enquanto que lesões bilaterais no hipotálamo lateral cessam o consumo de alimentos. Porém, outras estruturas também participam intensamente da regulação desse comportamento. Nos seres humanos, embora as áreas primárias (tais como o hipotálamo e mesencéfalo) estejam envolvidas na ingestão, as áreas mais superiores têm uma influência importante na homeostase da alimentação diária. O sabor, o cheiro e a aparência dos alimentos podem também estimular áreas sensoriais que se projetam para sítios mais inferiores, levando à alimentação. Além disso, os componentes

psicológicos podem conduzir à ingestão de alimentos, em parte devido às projeções do córtex. Mesmo que a sinalização de rede que controla o balanço energético diário seja altamente complexa, existem vários núcleos localizados no hipotálamo e no tronco encefálico, que desempenham um papel essencial no controle da alimentação. Além disso, diversas pesquisas têm identificado a participação de diferentes substâncias na regulação ingestiva: neuropeptídeos, como a colecistoquinina, a galanina, a grelina e o neuropeptídeo Y, hormônios como oxitocina e insulina, e neurotransmissores, como a serotonina, as catecolaminas e o glutamato.

Os circuitos centrais serotoninérgicos em mamíferos estão fortemente envolvidos no controle da ingestão de diversas substâncias e nutrientes, como alimentos sólidos, água, sódio e álcool. Manipulações farmacológicas que reduzem a neurotransmissão serotoninérgica central estimulam a ingestão de alimentos, enquanto aumentos na atividade de circuitos centrais que liberam serotonina inibem este comportamento (SIMANSKY, 1996). Estas respostas são mediadas por diversos subtipos de receptores (GLENNON e DUKAT, 1995; SAMANIN e GRIGNASCHI, 1996). A ação inibitória de circuitos serotoninérgicos centrais parece decorrer de atividades tônicas que mantêm baixa a probabilidade de um episódio ingestivo ser iniciado durante o estado de saciedade. Em apoio à existência desta função inibitória tônica, a injeção de metergolina (MET, um antagonista não-seletivo de receptores 5-HT<sub>1,2</sub>) ou a ativação de receptores 5-HT-1<sub>A</sub> (que diminui a atividade de neurônios serotoninérgicos) desencadeiam um aumento de ingestão de alimentos em animais saciados (COSCINA *et al.*, 1994; PARKER e COSCINA, 2001). A serotonina também cumpre um importante papel na fisiopatologia de distúrbios da ingestão de alimentos em humanos (BREWERTON, 1995; WELTZIN *et al.*, 1994).

Manipulações de circuitos serotoninérgicos periféricos e centrais afetam também o balanço entre a ingestão de água e cloreto de sódio. A ativação de receptores 5-HT periféricos interage com o sistema renina-angiotensina e provoca intenso efeito dipsogênico em roedores (SIMANSKY, 1996), e a ativação de receptores 5-HT<sub>2a/2c</sub> via intracerebroventricular (ICV) reduz a ingestão de água induzida por privação e também por injeções ICV de carbacol ou angiotensina II em ratos (REIS *et al.*, 1990 a; REIS *et al.*, 1990b). Além disso, lesões do núcleo dorsal da rafe ou depleção de 5-HT provocadas por injeções sistêmicas de PCPA aumentam a ingestão de água e de sódio em ratos

(REIS *et al.*, 1994; CAVALCANTE-LIMA *et al.*, 2005). Estes dados indicam que tais circuitos serotoninérgicos podem estar envolvidos de forma importante nos mecanismos de controle da osmolaridade e do volume do meio interno em mamíferos.

Assim como a serotonina, as catecolaminas também exercem um importante papel no controle ingestivo. A noradrenalina foi o primeiro neurotransmissor ligado a mudanças no comportamento alimentar (GROSSMAN, 1960). Muitos estudos demonstraram que a administração de noradrenalina no hipotálamo pode ter efeitos hiperfagiantes ou hipofagiantes, dependendo do local em que a droga é administrada (LEIBOWITZ, 1986). A estimulação da ingestão de alimentos parece estar relacionada com receptores alfa-2, e a inibição com receptores alfa-1 (LEIBOWITZ, 1988). A administração de noradrenalina em ratos mostra-se mais eficaz se administrada em momentos naturais de picos ingestivos, ou seja, no início do ciclo escuro do dia. As concentrações extracelulares de noradrenalina, detectadas por cânulas de microdiálise no PVN, aumentam com diversos tratamentos indutores da fome, e também no período do anoitecer (STANLEY *et al.*, 1989). LEIBOWITZ também sugeriu, com base em estudos tanto relacionados à seleção de alimentos espontânea quanto induzida por administração de noradrenalina, que a ação da noradrenalina no PVN pode não só aumentar a ingestão alimentar, mas também envolver seletivamente um apetite por carboidratos (LEIBOWITZ, 1986; LEIBOWITZ, 1988).

Evidências sugerem que as catecolaminas estejam envolvidas nos aspectos inespecíficos de comportamentos. Por exemplo, uma variedade de estímulos sensoriais têm mostrado aumentar a atividade nos sistemas centrais catecolaminérgicos medidos por meio de técnicas electrofisiológicas, bioquímicas e electroquímicas. Por outro lado, a destruição destes sistemas conduz a uma profunda diminuição na capacidade de resposta sensorial (STRICKER e ZIGMOND, 1984). Estudos relacionados ao papel de neurônios dopaminérgicos da substância nigroestriatal nos comportamentos motivados indicam que a liberação de dopamina está acentuadamente elevada em resposta a uma variedade de estímulos ambientais intensos. Por outro lado, as lesões desta via prejudicam a integração sensório-motora, e, assim, podem levar a acinesia, negligência sensorial e virtual, além da eliminação de atividades voluntárias. Além disso, embora haja uma recuperação

gradual da função nestes animais com danos cerebrais, eles permanecem menos sensíveis à estimulação do que os animais controle. Por exemplo, eles comem, mas mantêm o peso corporal em um nível consideravelmente mais baixo com relação aos controles. Estes e outros achados sugerem um papel importante das catecolaminas na excitação comportamental, que permite a esses animais permanecem alertas e responderem apropriadamente a estímulos sensoriais relevantes (STRICKER e ZIGMOND, 1984).

Nos últimos anos, nosso laboratório tem analisado o papel de circuitos monoaminérgicos (serotonina: BRUN *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2007; DOS SANTOS *et al.*, 2005 a e 2005 b; DOS SANTOS *et al.*, 2009; HACKL *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2004; MENEGHELLI *et al.*, 2009; STEFFENS *et al.*, 1997a; STEFFENS *et al.*, 1997b; STEFFENS *et al.*, 1999; Catecolaminas: CANELLO *et al.*, 1993; DARIO *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 1996; HAGEMANN *et al.*, 1998, MARINO-NETO e ARMENGOL, 2000; SABI *et al.*, 2002; MARINO-NETO *et al.*, 2004; RAVAZIO *et al.*, 1990; RAVAZIO E PASCHOALINI, 1991), colinérgicos (AZEVEDO *et al.*, 2002; DE MELLO *et al.*, 1996), glutamatérgicos (DA SILVA *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2006; ZENI *et al.*, 2000) e peptidérgicos (DA SILVA *et al.*, 2008) no controle da ingestão em aves.

Diversos estudos têm evidenciado a existência de sistemas serotoninérgicos no cérebro de aves anatomicamente comparáveis aos observados em mamíferos (ALESCI e BAGNOLI, 1988; COZZI *et al.*, 1991; HACKL *et al.*, 2005; HIRUNAGI *et al.*, 1992; MENEGHELLI *et al.*, 2009; METZGER *et al.*, 2002; YAMADA e SANO, 1985).

Algumas fibras serotoninérgicas são dirigidas a distritos diencefálicos e telencefálicos relevantes no controle ingestivo (COZZI *et al.*, 1991; METZGER *et al.*, 2002). De forma semelhante ao observado em mamíferos, injeções intracerebroventriculares (ICV) de 5-HT ou de DOI (um agonista de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>) em pombos privados de alimentos por 24 h provocam um intenso efeito hipofágico (STEFFENS *et al.*, 1997a; STEFFENS *et al.*, 1999). Um efeito hiperfágico foi observado nestes animais após a injeção ICV de GR46611 (um agonista de receptores 5-HT<sub>1D/1B</sub>; DA SILVA *et al.*, 2004), ou de metergolina (MET) em diversos núcleos hipotalâmicos (DA SILVA *et al.*, 2007). Já a administração ICV de 8-OH-DPAT provoca um efeito hiperfágico modesto em pombos privados de alimentos (STEFFENS *et al.*, 1997 a)

ou não afeta a ingestão de alimentos em animais com livre acesso à comida (DA SILVA *et al.*, 2004). A injeção intra-rafe desta droga em animais saciados provoca modesto efeito hiperfágico (HACKL *et al.*, 2005). Estes dados indicam que embora a existência de controles serotoninérgicos tonicamente ativos com ação inibitória sobre a ingestão de alimento possa ser uma propriedade filogeneticamente conservada nos amniotas, os mecanismos e circuitos cerebrais subjacentes a estes controles podem variar intensamente.

Outra resposta interessante dos nossos estudos foi o potente efeito dipsogênico de injeções ICV de 5-HT. O volume de água ingerido na primeira hora após a injeção ( $35.7 \pm 3.1$  ml) equivale a 10 % do peso corporal dos animais. Além disso, a administração ICV de 8-OH-DPAT reproduz os efeitos dipsogênicos do tratamento com 5-HT, enquanto o tratamento com DOI não afeta a ingestão de água nestes animais (DA SILVA *et al.*, 2004; STEFFENS *et al.*, 1999). Aumentos na ingestão de água não foram notados após tratamento similares com 5-HT em diferentes linhagens de galinhas (DENBOW *et al.*, 1983; DENBOW, 1984). Observamos assim, que circuitos serotoninérgicos centrais estão envolvidos no controle do balanço hidroeletrólítico em pombos.

Adicionalmente, ainda podemos mencionar a relação entre circuitos serotoninérgicos e a regulação dos estados de alerta e às mudanças gerais de atividade elétrica de diferentes regiões cerebrais durante as várias fases do ciclo vigília-sono. Injeções de 5-HT no ventrículo lateral de gatos provocam sinais de sonolência e sono profundo; efeitos similares foram observados após injeção intravenosa de 5-HT ( $5-30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) em gatos curarizados (KOELLA e CZICMAN, 1966). Neurônios serotoninérgicos mesencefálicos apresentam um padrão lento e regular de descarga durante a vigília que decai gradualmente ao longo das diferentes fases do sono de ondas lentas e que se torna virtualmente inativo durante o sono paradoxal (JACOBS e FORNAL, 1999). Antagonistas  $5\text{-HT}_2$ , como a ritanserina, promovem intenso aumento do sono de ondas lentas em roedores e humanos (KANTOR *et al.*, 2004). Em contraste, o antagonista  $5\text{-HT}_{2B}$  SB-215505 aumenta a atividade motora e vigília, diminuindo a atividade hipocampal durante a vigília e o sono paradoxal de ratos.

Nossos dados mostraram que, comparado ao observado em mamíferos, a indução de um potente efeito hipnogênico é uma consequência importante das injeções centrais de 5-HT em pombos. Sinais intensos de sono, detectados a partir da adoção de posturas típicas do sono noturno destas aves, foram observados de forma dose-dependente após injeções ICV de 5-HT em pombos saciados ou privados de comida (STEFFENS *et al.*, 1997a). Injeções de 8-OH-DPAT em pombos, por via sistêmica (DOS SANTOS *et al.*, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 2009) ou ICV (STEFFENS *et al.*, 2001) aumentaram o sono, enquanto que injeções ICV de DOI (um agonista de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>) ou quipazine (um agonista de receptores 5-HT<sub>3</sub>) não afetaram comportamentos de sono nestes animais (STEFFENS *et al.*, 2001). Além disso, a administração intramuscular de zimelidina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, é capaz de diminuir em até 30% o sono paradoxal de aves (FUCHS *et al.*, 2006). Estes dados sugerem que, tanto em mamíferos como em aves, o sistema serotoninérgico cumpre um papel importante e evolutivamente conservado na regulação dos estados de alerta.

Diversos estudos também vêm demonstrando a presença de sistemas catecolaminérgicos no encéfalo de pombos e outras espécies de aves (KNIGGE e PIEKUT, 1985; BERK *et al.*, 1993; RODMAN e KARTEN, 1995; MOONS *et al.*, 1994; MARINO-NETO e ARMENGOL, 2000). Estudos anteriores realizados em nosso laboratório analisaram os efeitos comportamentais da administração ICV de 1 microlitro de adrenalina e de noradrenalina (ambas na concentração de 30 nmol/microlitro) no ventrículo lateral de pombos adultos (RAVAZIO *et al.*, 1990). Nos animais com livre acesso à alimentação no período experimental, as injeções das catecolaminas provocaram um imediato e intenso efeito ingestivo, seguido por aumento na duração do sono (50-90% maior que a duração apresentada pelo animais controle tratados com veículo). Pombos tratadas com adrenalina ou apenas com veículo, e colocados em gaiolas individuais sem acesso à alimentação exibiram aumento na duração dos comportamentos exploratórios e menor duração de sono quando comparados aos animais controle (tratados com veículo e com ração e água *ad libitum*). Estes dados sugerem que o sono pós-prandial nesta situação pode representar uma consequência dos processos relacionados com a alimentação evocada por ambas as catecolaminas (RAVAZIO *et al.*, 1990). Em estudo realizado por RAVAZIO e PASCHOALINI (1992), foram analisados os efeitos de injeções de noradrenalina,

adrenalina e dopamina (80nmol/microlitro) no ventrículo lateral de pombos adultos, sobre o comportamento alimentar. Foi observado nesses experimentos um aumento significativo no consumo de alimentos na primeira hora após a administração de noradrenalina e adrenalina (RAVAZIO e PASCHOALINI, 1992). A noradrenalina também causou uma redução na ingestão alimentar durante a segunda hora após a administração, assim como a dopamina, que também levou à redução da ingestão alimentar na segunda e terceira hora pós-injeção (RAVAZIO e PASCHOALINI, 1992). A ingestão total de alimentos para o período de 6 horas foi semelhante entre os grupos experimentais e o grupo controle. Além disso, o consumo de água não foi afetado pela administração de nenhuma das catecolaminas durante algum período específico, mas a ingestão total aumentou com a injeção de noradrenalina. Estes resultados sugerem que as catecolaminas estejam envolvidas no controle neural do consumo de comida, mas não de água, nesses animais (RAVAZIO e PASCHOALINI, 1992).

Em outro trabalho, foram analisados os efeitos sobre o comportamento alimentar de injeções locais de adrenalina (6 nmol) ou noradrenalina (16 nmol) no núcleo paraventricular (PVN) e em outros distritos do hipotálamo anterior de pombos saciados (HAGEMANN *et al.*, 1998). Quando administradas no PVN, tanto a adrenalina quanto a noradrenalina induziram aumento da ingestão na primeira hora após a injeção. As respostas causadas pelas injeções de adrenalina foram significativamente maiores do que as observadas após injeções de noradrenalina (HAGEMANN *et al.*, 1998). Outras medidas comportamentais (sono, exploração e auto-limpeza) não foram afetadas pelos tratamentos. O pré-tratamento local com fentolamina (20 nmol), aboliu a resposta ingestiva induzida pela adrenalina, e o mesmo não foi observado com pré-tratamento com propranolol (HAGEMANN *et al.*, 1998). Sítios hipotalâmica laterais também responderam às injeções das catecolaminas, também com aumento da ingestão, seguida por aumentos na duração do sono. Juntamente com outras provas, os presentes resultados indicam que os circuitos catecolaminérgicos encontrados no hipotálamo dessas aves desempenham um papel importante nos mecanismos de controle da ingestão de alimentos, equivalente ao observado nas espécies de mamíferos (HAGEMANN *et al.*, 1998).

Além disso, DARIO *et al* (1996) demonstraram um intenso comportamento de sono pós-prandial em pombos após a alimentação tanto provocada pela administração ICV de adrenalina em animais saciados, quanto após a interrupção de jejum prolongado (96h). Estas semelhanças comportamentais foram tomadas como indicação de um papel fisiológico para os circuitos adrenérgicos centrais na regulação da ingestão de alimentos nessas aves (DARIO *et al.*, 1996). Ainda nesse estudo, os pesquisadores compararam os sinais eletrográficos relacionados ao sono que se desenvolve após a ingestão alimentar em ambas as condições experimentais. Com isso, chegaram à conclusão de que os comportamentos pós-prandiais no pombo incluem um aumento significativo na incidência de sono de ondas lentas e sono REM (DARIO *et al.*, 1996). A distribuição temporal, a duração total e a média da duração destes estados de sono, assim como a latência para o primeiro episódio de sono de ondas lentas, foi estatisticamente semelhante em ambas as situações de alimentação. Em estudos realizados por CANELLO *et al* (1993), foram investigadas as semelhanças entre a alimentação e o perfil comportamental pós-prandial após diferentes períodos de privação alimentar, e após administração ICV de adrenalina (30 nmol/microlitro) em pombos saciados.

Os resultados indicaram que o aumento pós-prandial do sono após tratamento com adrenalina, é semelhante apenas àquele observado depois de períodos prolongados de jejum. Estes efeitos comportamentais similares foram discutidos como representando o produto de níveis semelhantes de sinais de saciedade, obtido após a sinalização equivalentes de desafios para a homeostase de energia, tanto após jejum de 96h, quanto após administração da adrenalina. CANELLO *et al* (1993) sugerem que tais injeções ICV podem provocar um estado central comparável ao de jejum prolongado, e que este neurotransmissor pode participar como um mediador químico na regulação da ingestão de alimentos no pombo (CANELLO *et al.*, 1993). Esses dados indicam um acoplamento de componentes centrais catecolaminérgicos no controle da ingestão de alimentos, sugerindo assim que o sono pós-prandial pode representar um elemento importante nas alterações metabólicas relacionadas à alimentação, de forma semelhante ao observado em mamíferos (CANELLO *et al.*, 1993; DARIO *et al.*, 1996).

Relatando os aspectos neuroanatômicos e mecanismos funcionais da regulação alimentar, torna-se pertinente mencionar os

comportamentos pós-prandiais, muitas vezes referidos acima. Os fenômenos fisiológicos decorrentes da ingestão alimentar parecem estar articulados a modificações comportamentais peri e pós-prandiais que também são bastante complexas: durante ou após a ingestão de alimentos ocorrem mudanças na ingestão hídrica, em comportamentos de manutenção (por exemplo, auto-limpeza/ “grooming”), e na incidência de sono ou de posturas típicas de repouso, que já foram causalmente associadas ao ato de comer (SOMERVILLE e CLIFTON, 1996; KRALY, 1990). O sono é um dos mais notáveis sinais de saciedade, e integra as complexas estratégias de conservação de energia em mamíferos (DANGUIR, 1987; DANGUIR *et al.*, 1979, DANGUIR e NICOLAIDIS, 1980; DANGUIR e NICOLAIDIS, 1979, DANGUIR e NICOLAIDIS, 1985; LORENZ *et al.*, 1998). Esta associação foi usada para avaliar o papel de neuropeptídeos como sinalizadores fisiológicos de saciedade em mamíferos, comparando os perfis comportamentais provocados por estes peptídeos aos observados após a interrupção de um jejum prolongado (MANSBACH e LORENZ, 1983; DE SAINT HILAIRE-KAFI *et al.*, 1989; DE SAINT HILAIRE e NICOLAIDIS, 1992; DE SAINT HILAIRE *et al.*, 1995). Bastante estudada em roedores e primatas, a Sequência Comportamental de Saciedade (SCS), traduzido do inglês Behavioral Satiety Sequence, consiste no conjunto temporalmente organizado desses eventos comportamentais que sucedem a ingestão de alimentos (HALFORD *et al.*, 1998).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram a presença de uma SCS em aves (DOS SANTOS, *et al.*, 2011; SPUDEIT *et al.*, 2013). A interrupção de períodos prolongados de privação de alimento (de 48-96 h) em pombos provoca intensas manifestações de sono pós-prandial, que são acompanhados por sinais eletroencefalográficos de sono de ondas lentas e sono paradoxal similares aos do sono noturno (DARIO *et al.*, 1996). Estes sinais de sono são idênticos aos observados após a intensa ingestão de alimentos provocada por injeções centrais de adrenalina em pombos saciados e despertos, sugerindo uma função fisiológica de circuitos adrenérgicos centrais no controle da ingestão de alimentos nesta ave comparável ao observado em roedores (DARIO *et al.*, 1996; CANELLO *et al.*, 1993; RAVAZIO *et al.*, 1990).

Além de respostas adaptativas similares a eventos ingestivos, mamíferos e aves parecem partilhar aspectos similares da circuitaria

neural de controle da SCS. Os processos evolutivos que moldaram os vertebrados atuais parecem ter preservado, sem mudanças notáveis ao longo dos últimos 400 milhões de anos, uma série de características anatômicas e neuroquímicas dos circuitos serotoninérgicos centrais (PARENT, 1981; NORTON *et al.*, 2008). É bem menos claro se tal estabilidade evolutiva se estende aos aspectos funcionais destes circuitos. Embora pouco estudados em não mamíferos, mecanismos serotoninérgicos importantes para a regulação de comportamentos ingestivos, de sono e de defesa têm sido relatados em aves, a exemplo do observado principalmente em roedores e primatas. Tais semelhanças podem apontar tanto para uma conservação de funções (e, portanto, de verdadeiras homologies, sugestivas de um papel fundamental e evolutivamente preservado destes mecanismos) ou serem produto de convergência evolutiva (e, portanto, refletindo pressões seletivas comuns que produzem características similares, mas não relacionadas filogeneticamente).

É importante ressaltar, que em mamíferos, os métodos empregados para provocar uma intensa ingestão alimentar, e consequente SCS, lançam mão da privação prolongada de alimentos (24-48 h) ou restrição alimentar sistemática, seguida por reapresentação do alimento (HALFORD *et al.*, 1998). Porém, dados demonstram que tanto em aves quanto em mamíferos, a privação de alimentos modifica os padrões de sono (aumentando a vigília e reduzindo o tempo despendido em sono paradoxal) e mudanças súbitas de rotinas ingestivas contribuem para um substancial atraso nos ritmos circadianos em aves e mamíferos (BORBELY, 1977; DANGUIR e NICOLAIDIS, 1979; PHILLIPS *et al.*, 1991; RASHOTTE, *et al.*, 1997; RASHOTTE, *et al.*, 1998; RASHOTTE, *et al.*, 1999; SCHWARTZ e SEELEY, 1997; LAURILA *et al.*, 2003). Tais efeitos podem introduzir variáveis não controláveis na expressão da SCS, alterando o impacto do fenômeno ingestivo no sono pós-prandial. Além disso, a ingestão de alimentos é fonte importante de sinais que provocam a sede e a ingestão de água, e a privação de alimentos reduz a ingestão de água tanto em aves quanto em mamíferos: a reapresentação da comida desencadeia uma ingestão aumentada de água, quando esta está disponível (KRALY, 1990; KRALY *et al.*, 1995; ZEIGLER *et al.*, 1972; ZORRILLA *et al.*, 2005). Além dos aspectos acima citados, convém mencionar que o jejum alimentar é acompanhado por hipotermia e hipometabolismo, que são prontamente revertidos (normalizados ou mesmo elevados em relação

ao estado de repouso) pela reapresentação de alimentos (SCHWARTZ e SEELEY, 1997; SZÉKELY *et al.*, 1997; EMBER *et al.*, 2000).

Sendo assim, este trabalho questiona o que esperar da atividade de células serotoninérgicas e catecolaminérgicas no pico de ingestão alimentar, e pressupõe que essa fase esteja acompanhada por mudanças na ativação desses neurônios.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo investigar o padrão de ativação de neurônios serotoninérgicos e catecolaminérgicos relacionados à ingestão de alimentos no tronco encefálico de pombos adultos (*Columba Livia*).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- 1) Quantificar a ativação neuronal no tronco encefálico, associada a manipulações da disponibilidade de comida e água, por meio da expressão da proteína Fos.
- 2) Correlacionar as áreas de ativação neuronal com o regime experimental ao qual o animal foi submetido.
- 3) Descrever a distribuição de neurônios onde existe colocalização de imunorreatividade para Fos-TPH e Fos-TH no tronco encefálico.
- 4) Investigar o trânsito e esvaziamento do trato gastrointestinal superior em diferentes intervalos pós-ingestivos e de privação alimentar.



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

#### 2.1.1 Animais e ambientação

Os procedimentos abaixo descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina sob o protocolo 23080.0383262/2008-65. Foram utilizados um total de 34 pombos *Columba livia* (ambos os sexos, sendo 23 animais do sexo masculino e 11 do sexo feminino, 350-400 gramas de peso corporal inicial) provenientes do biotério central da UFSC, mantidos no biotério setorial do laboratório de Neurofisiologia Comparada do Departamento de Ciência Fisiológicas (CCB) para ambientação às condições do laboratório por 10 dias antes do início dos experimentos.

Neste biotério os animais permaneciam em gaiolas individuais, com água filtrada, areia com farinha de casca de ostra e alimento granulado para aves (formulação para aves em crescimento, da SUPRA Ltda, Itajaí, SC) *ad libitum*, com temperatura ambiente entre 22-24°C e um ciclo claro-escuro de 12 horas (luz das 7-19 h). Durante esse período de adaptação, foram realizadas trocas diárias de ração e água em horário fixo, com pesagem do conteúdo dos comedouros e bebedouros para controle de ingestão a cada 24 horas. A ração foi disponibilizada em comedouros feitos com garrafas plásticas (500 ml) com um orifício de 6,0 x 8,0 cm em seu terço médio, projetada pelo laboratório na tentativa de diminuir a quantidade desperdiçada de ração que cai do comedouro, e a água foi oferecida em bebedouro padrão para aves. Ao final do período de registro, os péletes de ração que eventualmente caíam do comedouro foram recuperados e pesados juntamente com a ração que restava no comedouro. Os registros de consumo foram analisados conforme peso corporal de cada animal, sendo registrados em volume ingerido/100gr de peso corporal. Os animais foram pesados uma vez por semana, e o peso utilizado para cálculo da ingestão foi o último antes da próxima pesagem.

No oitavo dia de ambientação, foi oferecido a cada animal, por período de duas horas, 60 gramas de uma mistura de semente de aveia comum (*Avena sativa*), painço branco (*Panicum millaceum*) e semente

de girassol (*Helianthus annuus*), para análise da aceitação dos animais à dieta diferenciada. Essa mistura de sementes geralmente é bastante apreciada por estes animais, e foi utilizada durante os experimentos como “ração palatável”. Diariamente, os animais foram inspecionados e observados para acompanhamento de qualquer alteração comportamental. Também foram analisados os animais que não se adaptaram ao ambiente e não atingiram um padrão considerado normal de consumo alimentar.

## 2.2 ANÁLISE COMPORTAMENTAL E INGESTIVA

O comportamento ingestivo dos animais foi observado a partir da oitava hora do ciclo claro (15 horas), período natural de maior ingestão alimentar nesses animais. Nos grupos submetidos à privação alimentar prévia, a ingestão foi induzida pela remoção da ração e da água por 1 hora precedente ao início do experimento e pela reapresentação da ração usual, água e acréscimo de um comedouro contendo ração palatável. Imediatamente após a retirada dos comedouros e bebedouros, para início da privação alimentar de uma hora, foi realizada a limpeza das gaiolas. No momento da reapresentação da comida e água, foi iniciado o registro em vídeo, com duração de 90 minutos. As quantidades ingeridas de ração usual, ração palatável e água foram registradas através da pesagem inicial dos comedouros e bebedouros e após 1 hora e 30 minutos da sua exposição.

Os animais (n=24) foram submetidos a este regime por duas vezes (com 7 dias de intervalo) antes dos experimentos, como protocolo de teste e adaptação, e divididos aleatoriamente em três grupos (n=6 por grupo):

### 2.2.1 Grupo sem manipulação (Controle)

Sem privação alimentar prévia, comida (ração usual) e água disponíveis *ad libitum*. Filmagem iniciada às 15 horas, com duração de 90 minutos. Esse grupo de animais não teve acesso à ração palatável, e a perfusão foi realizada 2 horas após o tempo previsto como pico de ingestão (que ocorre aproximadamente 15 minutos após o início do experimento, ver abaixo). Os dados coletados destes animais serviram como controles para eventuais mudanças na expressão da Fos associadas 1) às diferentes condições de amostragem e 2) ao estresse provocado pela privação alimentar e manipulação dos animais.

### **2.2.2 Grupo sem alimentação (Privação)**

Privação alimentar de 1 hora, sem re-apresentação de ração e água. Retirada da água e da ração 1 hora antes do início da filmagem. Filmagem iniciada às 15 horas, com duração de 90 minutos. Perfusão realizada no mesmo horário do grupo Controle.

### **2.2.3 Grupo experimental ingestão intensa (Ingestão)**

Privação alimentar prévia de 1 hora. Início da filmagem no momento da reapresentação de ração usual, ração palatável e água (15 horas), com duração de 90 minutos. Perfusão realizada 120 minutos após metade do tempo de duração total do período ingestivo (período descrito como pico de ingestão). Definição do período ingestivo: na observação do vídeo, em tempo real, foram cronometrados os tempos de ingestão de ração usual e/ou palatável, sendo considerado de intensa ingestão o período com intervalos menores de 1 minuto entre comportamentos ingestivos.

Os comportamentos dos animais foram registrados e também diretamente observados em tempo real por meio de uma câmera conectada a um monitor posicionado fora do ambiente experimental. Estes registros foram decodificados como descrito adiante e os dados comportamentais comparados aos dados anatômicos (contagem de pericários e núcleos marcados).

## **2.3 REGISTROS COMPORTAMENTAIS**

Os vídeos captados durante os experimentos foram posteriormente avaliados através de um software produzido em nosso laboratório (Ethowatcher®- CRISPIM et al., 2012. Disponível gratuitamente no site <<http://www.ethowatcher.ufsc.br>>) que permite o exame quadro a quadro do arquivo de vídeo e a inserção dos códigos relativos aos comportamentos, oferecendo um relatório (em arquivo texto) final da seqüência comportamental completa e da latência, frequência e duração (totais e segmentadas por unidade de tempo) de cada categoria.

Os dados comportamentais foram totalizados em segmentos de 4 minutos ao longo de todo o período de registro, visando aumentar a resolução temporal da descrição dos eventos. O catálogo comportamental utilizado inclui:

**Tabela 1:** Catálogo com descrição comportamental utilizado na leitura etográfica dos vídeos.

Comportamento	Sigla	Descrição
AUTO-LIMPEZA	A	O animal toca as próprias penas com a ajuda do bico e/ou com a pata, fazendo movimentos de puxar, separar ou bicar as penas. Após 3 segundos da parada dessa ação, considera-se o final do ato de auto-limpeza.
ARREPIAR PENAS	AP	O animal altera a configuração normal das penas em relação à pele, deixando-as longe do contato com o corpo, eriçando-as, podendo abrir as asas simultaneamente. Através desse comportamento, o corpo do animal
BEBER	B	O animal introduz o bico no frasco de água e a suga, podendo fazer bolhas, de ar, dentro do bebedouro. Observam-se movimentos da parte anterior do pescoço do animal. Após 3 segundos da parada dessa ação, considera-se
COMER (RAÇÃO COMUM)	CC	O animal segura a ração normal com a ajuda do bico e a deglute. Observam-se movimentos da parte anterior do pescoço do animal. Após 3 segundos da parada dessa ação, considera-se o final do ato de comer.
COMER (RAÇÃO PALATAVE L)	CP	O animal segura a ração palatável com a ajuda do bico e a deglute. Observam-se movimentos da parte anterior do pescoço do animal. Após 3 segundos da parada dessa ação, considera-se o final do ato de comer.

EXPLORAC AO	ET	O animal explora a gaiola, o comedouro ou o bebedouro com as patas, com o bico ou apenas visualmente, com ou sem locomoção, movimentando o constantemente a cabeça em várias direções; ou apenas se desloca pela	O animal fica com uma ou duas patas fixas ao assaolho, com a postura totalmente ereta, com os olhos abertos, podendo realizar movimentos suaves com a cabeça. Após 3 segundos da parada dessa ação, considera-se o final do estado parado	O animal faz movimentos repetitivos com a cabeça, faz a abertura do bico e expõe material através do bico.	O animal fica com uma ou duas patas fixas ao assaolho/poleiro. Neste comportamento as patas podem estar retraídas, a ponto de o corpo tocar o chão; pode apresentar a postura encurvada - geralmente com a cabeça bem inserida ao corpo -
PARADO ALERTA	PA				
REGURGITA R	R				
SONO	S				

## 2.4 PREPARAÇÃO DO TECIDO

Os pombos foram anestesiados profundamente com Uretano (im) e perfundidos transcárdialmente com uma solução de sacarose (9,25 % em tampão fosfato de sódio, 0,1 M pH 7,4 [TF], mantido a 37 °C, contendo heparina), seguida por uma solução de paraformaldeído (4 % em TF a 0,1M a 4°C). Os encéfalos foram removidos da caixa craniana, bloqueados, pós-fixados em paraformaldeído (4 % em TF, a 4 °C) por 12 h e transferidos para uma solução salina tamponada (PBS) 0,1M por pelo menos 12 horas (a 4 °C). Os blocos dos encéfalos foram incluídos em gelatina 10% e seccionados transversalmente em um vibrátomo (Vibratome 11500 Sectioning System), com espessura de 40µm, e coletados em PBS 0,1M em 5 compartimentos seriados. Compartimentos contendo secções a serem processadas imunohistoquimicamente após a microtomia, foram armazenados a -20 C em solução anticongelante (PB 0,02 M 18,23%; H2O destilada 21,87%; Propilenoglicol 34,9%; 25%) a -20 °C.

Os tempos de sacrifício foram estimados a partir das curvas e dos picos de imunoreatividade à Fos em núcleos hipotalâmicos após a injeção de salina hipertônica em ratos (SHARP *et al.*, 1991) obtidos em estudos utilizando desenho experimental semelhante. Nestes experimentos, a imunoreatividade à proteína Fos (usando anticorpos que não revelam antígenos relacionados à Fos) mostrou-se aumentada nas 3 horas subseqüentes ao tratamento, com pico na segunda hora. Isto sugere que a atividade Fos, devido a eventos separados entre si por um mínimo de 60 minutos, pode ser eventualmente discriminada por protocolos como o aqui proposto.

Observações anteriores do nosso laboratório (DOS SANTOS *et al.*, 2009; Dos Santos, 2010) indicam que o intervalo entre os eventos ingestivos e o pico de sono pós-prandial fica em torno de 60 minutos neste animal, numa situação em que esta seqüência parece ser acelerada pela administração de serotonina. Observações do nosso laboratório sugerem que este intervalo pode ser maior ainda em situações em que os animais não são tratados com drogas hipo- ou hiperfagiantes. Assim, este protocolo ajuda a revelar neurônios ativados diferencialmente nestas etapas de comportamentos. Os cortes seriados do tronco cerebral foram submetidos a procedimentos de marcação para Fos e dupla marcação, visando identificar os neurônios simultaneamente imunorreativos à proteína Fos e à triptofanohidroxilase (TPH, enzima de síntese da 5-HT), ou à proteína Fos e tirosina hidroxilase (TH, enzima de síntese de catecolaminas). O material foi submetido inicialmente a uma avaliação semi-quantitativa da distribuição de pericários imunorreativos à proteína Fos (Fos-ir), à TPH (TPH-ir), à Tirosina hidroxilase (TH-ir) e de pericários duplamente marcados (Fos-ir+TPH-ir e Fos-ir+TH-ir) ao longo do tronco cerebral. Em uma série completa de cortes, o número de células Fos-ir, TPH-ir, Fos-ir+TPH-ir, TH-ir, Fos-ir+TH-ir foi contado nos sítios de maior interesse (determinados a partir da análise semi-quantitativa). Estes dados foram submetidos a uma análise de variância multivariada (MANOVA).

## 2.5 PROCEDIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS

### 2.5.1 Imunorreatividade à Fos

Dois dos compartimentos foram processados para revelar apenas os neurônios imunorreativos à Fos (compartimentos 1 e 3), de acordo

com a seqüência de procedimentos abaixo (protocolo adaptado por DOS SANTOS, TS). As lavagens e incubações foram realizadas em tampão salina fosfato (PBS) 0,1M, com 0,25% de Triton X100 (PBST) sob suave agitação em temperatura ambiente (exceto as incubações com os anticorpos primários, que foram realizadas em câmara úmida a 4°C). Todas as lavagens consistem em quatro trocas em PBST (5' cada):

1. Os cortes foram lavados em PBST (4x5'), e posteriormente incubados durante 40 minutos em uma solução com 2% de soro albumina bovina (BSA) em PBST para o bloqueio de ligações inespecíficas;
2. Incubação no anticorpo primário (anti-Fos de coelho, K-25 Sc-253, Santa Cruz Biotechnology) a uma concentração de 1:2000 em PBST por 20h a 4 °C, sob agitação contínua e suave, seguida por lavagens em PBST;
3. Incubação na solução de bloqueio da peroxidase endógena (0,3% de peróxido de hidrogênio em 100% de metanol) por 30 min, seguida por lavagens em PBST;
4. Incubação em uma solução de anticorpo secundário (cabra anti-coelho, 1:1000, ABC Kit Elite, Vector Laboratories) por 2h a temperatura ambiente, seguida por lavagens em PBST;
5. Incubação em uma solução contendo o complexo avidina-biotina (ABC Elite Kit, Vector Laboratories) numa diluição de 1:1000, por 90 minutos, seguida por lavagens em PBST;
6. Para revelação do complexo antígeno-anticorpo, os corpos foram incubados em solução contendo 0,05% de DAB (3,3'-Diaminobenzidina, Sigma- Aldrich. St. Lois, MO, USA), 0,045% de peróxido de hidrogênio (30 volumes) e 0,05% de sulfato de níquel amônio, durante 5-9 minutos. A reação foi interrompida com uma lavagem em PBST a 4°C, resultando em uma marcação nuclear preta/cinza escuro.

## 2.5.2 Imunorreatividade à Fos + TPH e Fos + TH

Outros dois compartimentos foram então submetidos a procedimentos de dupla marcação, visando identificar os neurônios imunorreativos simultaneamente à Fos + TPH (compartimento 2) e à Fos + TH (compartimento 4), possivelmente afetados por tais manipulações. O protocolo utilizado para tais procedimentos foi realizado de acordo com a seqüência abaixo, após procedimentos realizados para revelação de imunorreatividade à Fos descritos acima:

1. Incubação no anticorpo primário (anti-TPH, policlonal, produzido em ovelha, a 1:2000, Biogenesis, Poole, UK para a revelação de neurônios imunorreativos à TPH; e anti-TH, policlonal, produzido em rato, a 1:2000, Biogenesis, Poole, UK para a revelação de neurônios imunorreativos à TH) em PBST por 24 h à 4 C, sob agitação contínua e suave, seguida por lavagem em PBST e por;
2. Incubação em uma solução de anticorpo secundário IgG de coelho anti-ovelha biotilado para TPH e anti-rato biotilado para TH (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 90 minutos a temperatura ambiente, seguida por;
3. Incubação em uma solução contendo o composto avidina-biotina-HRP (ABC Elite Kit, Vector Laboratories) numa diluição de 1:1500, por 1 hora e 30 minutos. Para a revelação do complexo antígeno-anticorpo, os cortes foram incubados em uma solução contendo diaminobenzidina (DAB, 0,05%) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,015%) em PBS, pH 7,4, por 5-10 minutos. Esta reação produz um precipitado de cor marrom clara, a contrastar com a cor negra da primeira reação imunohistoquímica (para revelar a Fos no núcleo neuronal). A reação foi interrompida por meio de um mínimo de 3 banhos em PBS a 4 °C.

Após os procedimentos imunohistoquímicos, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas com alúmen de cromo, secas ao ar livre por 48 h e então diafanizadas em uma série etanol-xilólica ascendente, antes de serem cobertas por lamínula com DPX (Sigma Chemical, St. Louis, MO). As secções foram analisadas em microscópio (Olympus, BH-2) com uma câmera acoplada (PixeLINK, Ontário,

Canadá), para identificação de corpos celulares e fibras positivas à TPH e TH, e de núcleos positivos à Fos. Fotomicrografias digitais de secções representativas foram realizadas utilizando o software PixelINK (edição de captura padrão). O nível de brilho e contraste foi ajustado com o software PhotoImpact SE.

As regiões encefálicas foram identificadas e nomeadas de acordo com o atlas estereotáxico para o encéfalo de pombo de KARTEN e HODOS (1967) e com a revisão da nomenclatura para o prosencéfalo realizado pelo Fórum de Nomenclatura para o Encéfalo de Aves (REINER et al., 2004).

Todas as secções foram qualitativamente analisadas para identificar as áreas do tronco encefálico que apresentaram marcação Fos, TPH, TH ou neurônios duplamente marcados. Um único pesquisador, cego às condições de tratamento, realizou a contagem das células imunorreativas. De acordo com a análise qualitativa preliminar, secções representativas de níveis rostrocaudais pré determinados, de cada animal dos diferentes grupos experimentais, foram selecionadas para a contagem. Células Fos+, TPH+, TH+ ou Fos+/TPH+, Fos+/TH+ foram computadas em nove áreas do tronco encefálico que estão esquematicamente ilustradas na Figura 1. Em cada área, o número de células Fos+, TPH+, TH+ ou Fos+/TPH+, Fos+/TH+ foi mensurado em 3 – 6 campos fotomicrográficos inteiros (objetiva 10x; largura, 0,37 mm; altura, 0,27 mm), tomados de maneira padronizada, baseada em marcos anatômicos pré-definidos nas secções (e.g., borda de ventrículo ou trato de fibras proeminente). O número de campos de contagem foi variável dependendo da área do núcleo, mas fixo para cada área através dos animais experimentais. A contagem das diferentes marcações foi feita manualmente com o software ImageJ ([www.rsweb.nih.gov/ij/](http://www.rsweb.nih.gov/ij/)).

As células Fos+, TPH+ e Fos+/TPH+ foram contadas nas seguintes áreas:

- Núcleo *raphe pontis* (Rp): dois campos de quantificação, em secções correspondentes aproximadamente ao nível A 1,00 do atlas para encéfalo de pombo (KARTEN E HODOS, 1967). O primeiro campo foi posicionado na linha média, na parte mais ventral do núcleo, e o outro seguindo alinhadamente para uma posição mais rostral, imediatamente acima do primeiro campo.

- A6 (correspondente ao *locus coeruleus*, formalmente referida como LoC caudal; REINER *et al.*, 2004): foi examinado e analisado no mesmo nível em que o Rp foi analisado. Três campos de quantificação foram posicionados entre a borda dorsolateral do fascículo longitudinal medial (flm), ascendendo até o BC, tendo como limite dorsal o assoalho do IV ventrículo. Os campos foram posicionados de maneira tal que o vértice superior direito do campo mais ventral coincidissem com o vértice esquerdo inferior do campo logo acima dele e assim por diante.

- Núcleo parabraquial dorso-medial (PBdm): os 2 núcleos parabraquiais analisados (PMdm e PBvl) correspondem ao nível A 1,75 do atlas para encéfalo de pombo (KARTEN E HODOS, 1967). No PBdm foram posicionados dois campos de quantificação paralelos, localizados dorsomedialmente ao *nucleus semilunaris (SLu)* e ventral *tractus isthmo-opticus (TIO)*.

- Núcleo parabraquial ventro-lateral (PBvl): Três campos de quantificação foram posicionados, sendo que o primeiro deles iniciava na extremidade ventrolateral do SLu, e os outros dois imediatamente ventrais ao primeiro, margeando a borda lateral da secção de nível pontino.

- Núcleo *linearis caudalis (LC)* e *centralis superioris (CS)*: neste e nos três núcleos a seguir, as secções analisadas correspondem ao nível A 2,25 do atlas para encéfalo de pombo (KARTEN E HODOS, 1967), onde o nervo troclear (nIV) atinge seu nível mais rostral. Quatro campos de quantificação foram posicionados verticalmente sobre as duas colunas de células na linha média que caracterizam o LC. Esta região compreende também o núcleo central superior (CS) que se localiza bilateralmente adjacente ao LC, e é delimitado bilateralmente pelas fibras do *brachium conjunctivum descendens (BCD)* e dorsalmente pelas fibras da *decussatio brachiorum conjunctivum (DBC)*. O primeiro campo de quantificação foi posicionado exatamente sobre as células mais ventrais do LC, e os outros quatro campos alinhados verticalmente acima do primeiro.

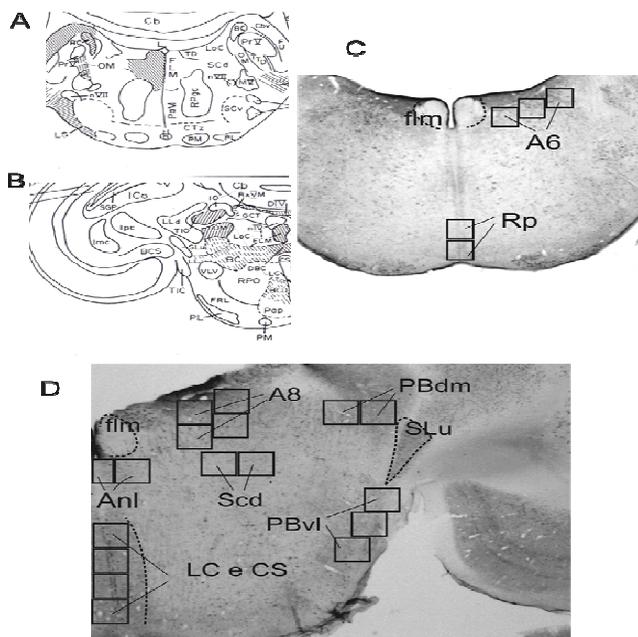
- Núcleo A8 (conhecida como *locus coeruleus* parte rostral, ou LoC rostral; REINER *et al.*, 2004): área localizada lateralmente adjacente ao flm, ventromedial ao trato istmo óptico (TIO) e

ventral à substância cinzenta central (GCt). Quatro campos de quantificação, justapostos, foram colocados nesta área; ventromediais ao TIO e ventrais à GCt, horizontalmente alinhados ao flm.

- Núcleo *annularis* (Anl): os campos de quantificação foram posicionados imediatamente ventrais ao flm ao longo de sua inteira extensão horizontal, e dorsalmente às fibras do DBC. Os três campos foram alinhados horizontalmente adjacentes um ao outro.

- Núcleo *Subceruleus dorsalis* (Scd): dois campos de quantificação foram posicionados imediatamente abaixo da região do núcleo A8, alinhados entre si horizontalmente.

**Figura 1:** A e B) desenhos esquemáticos de seções frontais do tronco encefálico do pombo ilustrando a configuração anatômica (nível A 1,00 e A 2,25, respectivamente). C e D) seções do tronco encefálico do pombo com representações esquemáticas das regiões de contagem da expressão da proteína Fos.



## 2.6 CONTEÚDO DO TRATO GASTROINTESTINAL SUPERIOR

Para investigação do trânsito e esvaziamento gástrico, além das condições de enchimento do trato gastrointestinal superior (TGIS) em períodos de jejum e saciedade destes animais, o conteúdo do TGIS foi separado em porções contidas no ingluvío (papo), proventrículo (estômago glandular) e ventrículo (moela). Este procedimento visa demonstrar o estado do TGIS em diferentes situações de alimentação, e a coleta do material presente nessas regiões foi realizada após quatro regimes experimentais diferentes (n=6/grupo, total de 24 animais), descritos a seguir:

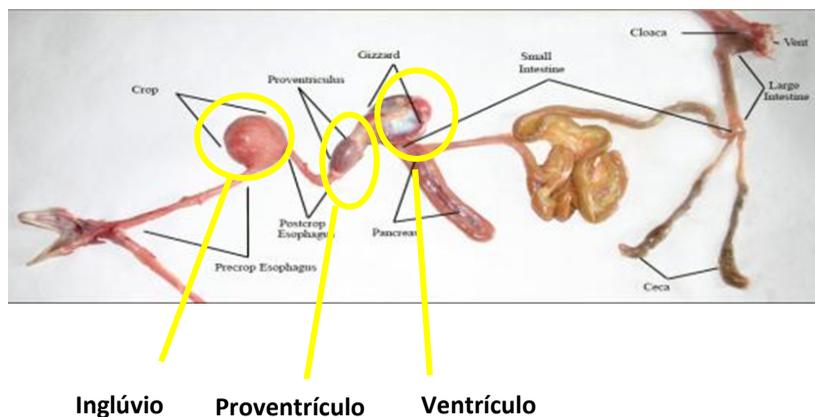
- 1- Protocolo controle, animal saciado, com água e ração comum *ad libitum*. Este protocolo serve como controle para as condições do TGI de um animal em um período natural provável de maior atividade ingestiva (aproximadamente às 15 horas), mas que não recebeu nenhum estímulo para aumentar esta atividade.
- 2- Após jejum de 3 horas (restrição total, sem água e ração). Este protocolo demonstra às condições do TGI de animais que permaneceram 3 horas sem nenhuma atividade ingestiva, e pode demonstrar como o esvaziamento do TGI ocorre em curto período de tempo, podendo justificar a não utilização de um tempo prolongado de jejum. O início da privação alimentar coincide com o período provável de intensa ingestão natural destes animais (15 horas), sendo o sacrifício realizado 3 horas após (18 horas).
- 3- Após jejum de 1 hora (restrição total, sem água e ração). Este protocolo demonstra as condições do TGIS destes animais após serem submetidos à apenas uma hora de restrição alimentar total, podendo explicar a escolha deste tempo de privação prévio ao oferecimento da ração palatável. O início da privação alimentar coincide com o período provável de intensa ingestão natural destes animais (15 horas), sendo o sacrifício realizado 1 hora após (16 horas).
- 4- Após jejum de 1 hora com restrição total (ração e água), seguido por 1 hora e 30 minutos com disponibilidade de ração comum, água e ração palatável com livre acesso. O início da

privação alimentar ocorreu às 14 horas (1 hora prévia ao momento natural de intensa ingestão natural destes animais). Este protocolo remete às condições do TGI de animais que foram estimulados à intensa atividade ingestiva, e pode orientar a respeito da origem dos sinais de saciedade observados nestes animais.

Os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos transcárdialmente, conforme protocolo de perfusão descrito anteriormente (procedimento 3.4).

O sacrifício foi realizado sempre no mesmo horário, para os diferentes grupos, já que estes animais apresentam períodos naturais de maior atividade ingestiva ao longo da fase clara do ciclo, evitando assim, fases diferentes das condições do TGI. A incisão das peças anatômicas utilizadas (inglúvio ou papo, ventrículo e proventrículo) foi realizada com lâmina de bisturi e tesoura cirúrgica. O conteúdo foi coletado com uso de espátula cirúrgica e imediatamente pesado, em balança semi-analítica. Foram consideradas as peças anatômicas demonstradas na figura a seguir:

**Figura 2:** Anatomia do trato gastrointestinal superior de aves.



**Fonte:** Imagens retiradas do site: [www.uky.edu](http://www.uky.edu). *University of Kentucky-College of agriculture* (com autorização).

## 2.7 ANÁLISE DOS DADOS

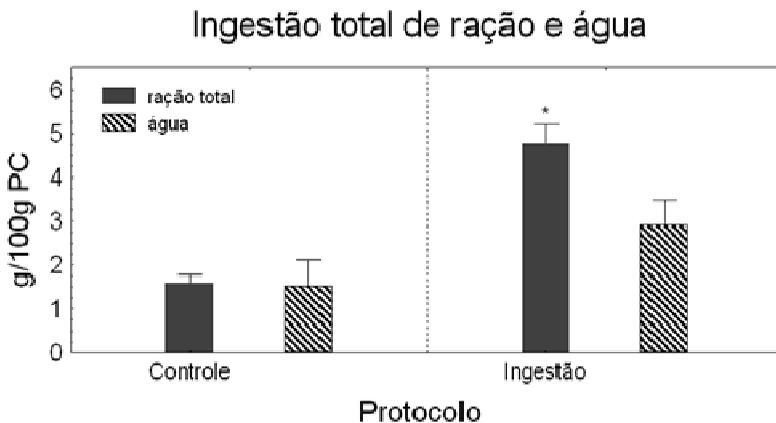
Os dados comportamentais (ingestivos e não ingestivos) dos primeiros 90 minutos após o início dos experimentos foram analisados estatisticamente por intermédio de uma análise de variância (ANOVA de uma ou duas vias com replicações, de acordo com o desenho experimental), seguidas pelo teste (post hoc) de Duncan. Dados que demonstraram distribuição significativamente diferente da distribuição normal foram analisados por meio de procedimentos não-paramétricos (ANOVA não-paramétrica de uma via de Kruskal-Wallis seguida por comparações entre grupos pelo teste da Mann-Whitney). O nível de significância adotado nesses procedimentos foi  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 PERFIL DO COMPORTAMENTO INGESTIVO E PÓS-PRANDIAL

Em experimentos anteriormente realizados pelo laboratório, foi observado que a disponibilização de ração palatável (mix de sementes de aveia, girassol e painço branco) para pombos, mesmo saciados, com água e ração comum *ad libitum*, é um intenso estímulo ingestivo. A quantidade de ração ingerida por esses animais, quando a ração palatável está presente, pode triplicar em relação à linha de base ingestiva, e até mesmo quadruplicar se os animais forem submetidos à privação alimentar prévia ao oferecimento desta ração. Nos experimentos aqui realizados, como mostra a figura 3, a ingestão total (que soma as quantidades ingeridas de ração comum e ração palatável, quando esta está presente) foi significativamente maior no grupo que recebeu a ração palatável (grupo Ingestão) em relação à linha de base (grupo Controle), que recebeu apenas a ração comum ( $F(1,10) = 48,23$ ,  $p < 0,0002$ ). Com relação à ingestão de água, não houve diferença significativa entre os grupos (figura 3).

**Figura 3:** Consumo, de ração total (palatável+comum) e água, entre os grupos Controle e Ingestão. (\*) para  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Controle.



No grupo em que os animais tiveram acesso à ração palatável, além de ração comum e água (Ingestão), foi observada uma sequência

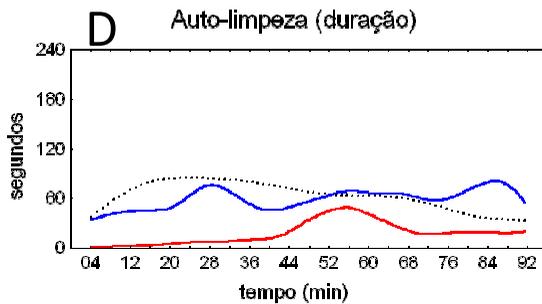
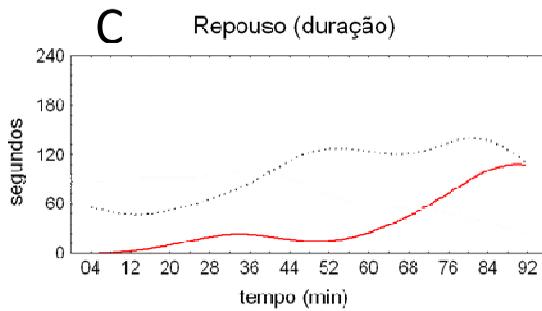
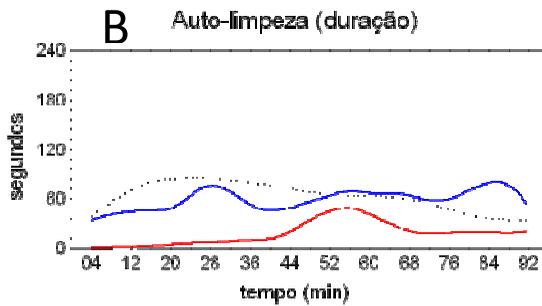
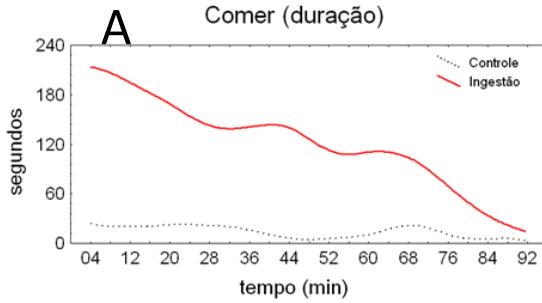
comportamental de saciedade (SCS) consistente, onde o comportamento de comer é sucedido pelo comportamento de beber, que por sua vez é sucedido por comportamentos de manutenção (auto-limpeza), e então por posturas típicas de sono (repouso).

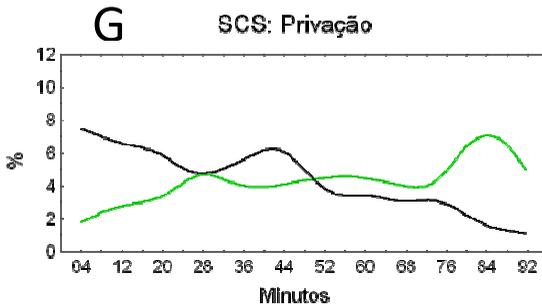
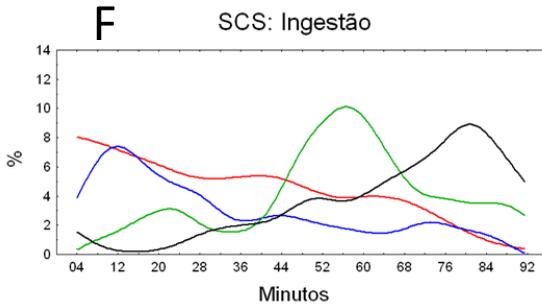
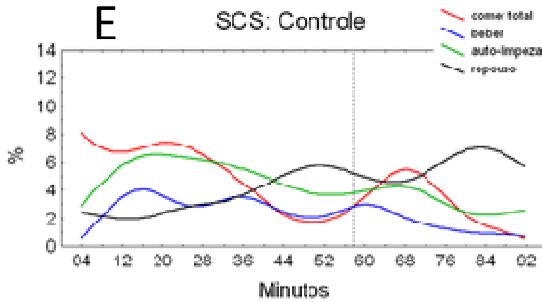
Observa-se também que no grupo Ingestão, que apresentou comportamento ingestivo intenso e de grande duração, este e todos os comportamentos posteriores são bastante acentuados, prolongados e espaçados entre si por grande período de tempo (figura 4A e 4F).

No grupo Controle, todos os comportamentos que fariam parte de uma sequência comportamental de saciedade estão presentes, porém, a sequência dos eventos não é evidente e os picos dos comportamentos não são intensos e claramente separados entre si (figura 4E).

Ao observar os comportamentos comparados entre os grupos individualmente, nota-se que o grupo Privação, que não teve acesso à ingestão alimentar no período do experimento, apresenta os comportamentos relacionados ao repouso (sono, sonolência e parado alerta) principalmente nos primeiros quarenta minutos do experimento, seguindo com comportamentos ativos após esse período (figura 4D e 4G). Essa característica comportamental desse grupo segue um padrão completamente oposto ao observado nos animais que têm acesso à ingestão, que apresentam comportamentos relacionados ao sono ao final do período experimental (figura 4E e 4F).

**Figura 4:** A, B, C e D: duração dos comportamentos de comer, beber, auto-limpeza e repouso, respectivamente, em segundos. E, F e G: Sequência comportamental de saciedade (SCS) nos diferentes protocolos experimentais: Controle, Privação e Ingestão, demonstrados em porcentagem do tempo real.

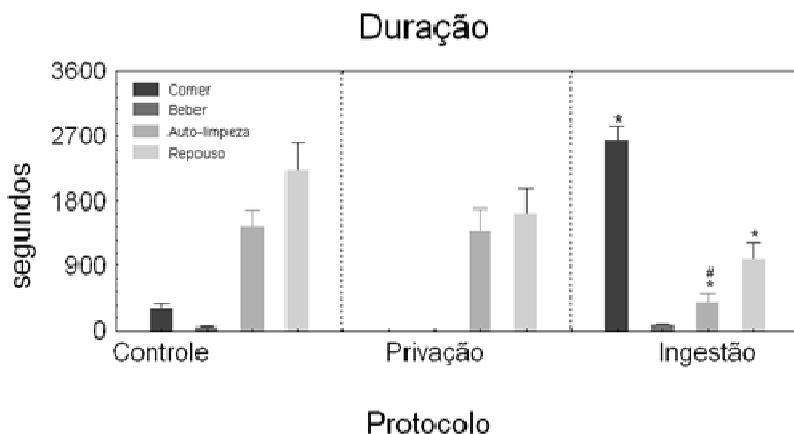




Com relação à duração do comportamento de comer, foi observada diferença significativa ( $F(1,3) = 66,86, p < 0,00018$ ) entre os grupos que tiveram acesso à comida e água. O grupo Controle apresentou uma duração desse comportamento inferior ao observado no grupo Ingestão. A duração de beber não apresentou diferença entre os grupos. O comportamento de auto-limpeza apresentou diferença significativa entre os grupos Controle e Ingestão ( $F(2, 18) = 7,73, p < 0,005$ ), sendo que o grupo Ingestão despendeu menor tempo realizando esse comportamento. Também houve um aumento significativo deste comportamento no grupo Privação com relação ao grupo Ingestão ( $p <$

0,006). Com relação ao comportamento de repouso, observou-se um aumento significativo deste comportamento no grupo Controle com relação ao Ingestão ( $F(2,18) = 4,00, p < 0,018$ ). As análises relacionadas à duração dos comportamentos investigados demonstram que o grupo Ingestão, que tem um grande estímulo ingestivo, despense maior tempo durante o experimento comendo do que realizando qualquer outro comportamento. (Figura 05).

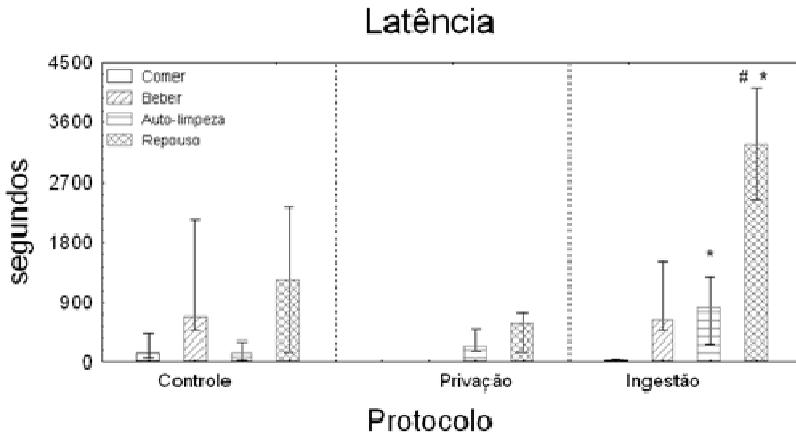
**Figura 5:** Duração total, em segundos, dos seguintes comportamentos: comer, beber, auto-limpeza e repouso, nos diferentes protocolos experimentais (Controle, Privação, Ingestão). (\*) para  $p < 0,05$  com relação ao grupo Controle. (#) para  $p < 0,05$  em relação ao grupo Controle. (#) para  $p < 0,05$  em relação ao grupo Ingestão.



Com relação à latência para a ocorrência dos comportamentos ingestivos (comer e beber), houve diferença significativa entre os grupos que tiveram disponibilidade à alimentação (Controle e Ingestão) apenas para o comportamento de comer ( $H(1, n=15) = 7,34, p < 0,006$ ). A latência para o comportamento de auto-limpeza não apresentou diferenças entre os três grupos. Assim como a latência para o comportamento de repouso não apresentou diferença significativa entre os grupos Controle e Privação. Porém, esse comportamento ocorreu mais tardiamente no grupo Ingestão em relação ao grupo Controle ( $H(2, N=20) = 10,96, p < 0,02$ ), e também mais tardiamente no grupo Ingestão em relação ao grupo Privação ( $p < 0,0006$ ). No grupo Ingestão, onde os comportamentos relacionados à sequência comportamental de

saciedade aparecem com intervalos mais esparsos entre si, observa-se uma progressão na latência para os comportamentos de comer, beber, auto-limpeza e repouso, respectivamente. A duração, frequência e latência dos comportamentos estão representados na tabela 2, expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

**Figura 6:** Latência, em segundos, para os comportamentos relacionados à sequência comportamental de saciedade: comer, beber, auto-limpeza e repouso. (\*) para  $p < 0,05$  com relação ao grupo Controle. (#) para  $p < 0,05$  em relação ao grupo Ingestão.



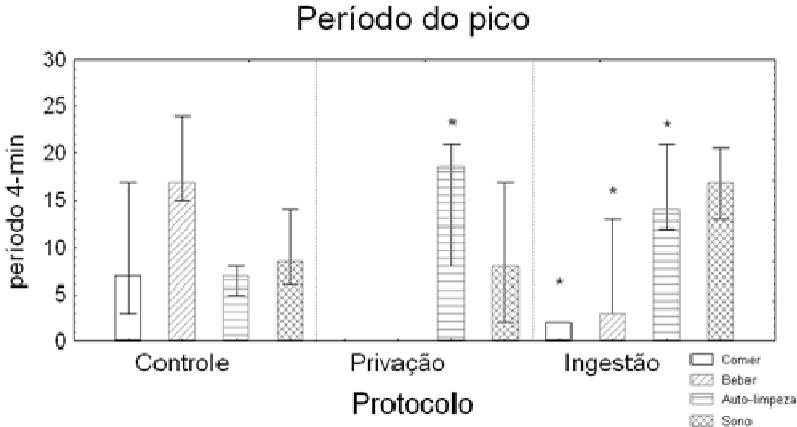
**Tabela 2:** Efeito dos diferentes protocolos experimentais sobre a duração, frequência e latência dos comportamentos de comer, beber, auto-limpeza e repouso durante os primeiros 90 minutos após o estímulo. Os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

	Controle	Ingestão	Privação
<b>Comer</b>			
Duração	317,7 $\pm$ 71,08	2621,2 $\pm$ 222,4 *	-
Frequência	0,65 $\pm$ 0,08	3,59 $\pm$ 0,22 *	-
Latência (s)	330,67 $\pm$ 174,61	40,91 $\pm$ 18,51 *	-
<b>Beber</b>			
Duração	39,11 $\pm$ 15,52	66,36 $\pm$ 14,2	-
Frequência	0,17 $\pm$ 0,04	0,35 $\pm$ 0,54	-

Latência (s)	1311,35±751,03	1086,51±290,86	-
<b>Auto-limpeza</b>			
Duração	1434,93±247,93	394,7 ± 108,6*#	1363,16±334,81
Frequência	1,76 ± 0,14	0,69 ± 0,07 * #	1,64 ± 0,13
Latência (s)	185 ± 75,23	928,53 ± 291,70	309,96 ± 102,04
<b>Repouso</b>			
Duração	2210,14±390,63	991,06±231,87*	1626,22 ±355,74
Frequência	1,12 ± 0,09	0,69 ± 0,1 * #	1,21 ± 0,11
Latência (s)	1244,25±481,25	3206±384,8 * #	541,61 ± 155,62

Para representação dos comportamentos, o tempo total do experimento (90 minutos) foi dividido em períodos. Cada período representa um total de 4 minutos, ou 240 segundos, chegando ao valor máximo de 23 períodos ao final do experimento ( $90' \div 4' = 22,5$  períodos). Como a duração de cada comportamento analisado é somada, em segundos, a cada período, o valor total de cada comportamento a cada período de 240 segundos pode apresentar uma duração que varia entre 0, quando o animal não apresentou determinado comportamento naquele período, e 240 segundos, quando o animal realizou o comportamento durante tempo integral do período. O período do pico refere-se ao momento, entre os 23 períodos, em que determinado comportamento atinge seu valor máximo de duração pela primeira vez. Entre os comportamentos ingestivos (comer e beber) apenas o comportamento de beber apresentou diferença significativa no período do pico entre os grupos Controle e Ingestão, sendo que esse pico ocorre antecipadamente no grupo Ingestão ( $H(1, N=15) = 4,10, p < 0,04$ ). Além disso, podemos perceber que o grupo Ingestão atinge o pico do comportamento de auto-limpeza em período superior ao grupo Controle ( $H(2, N=21) = 6,49, p < 0,007$ ). Com relação ao repouso, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Observa-se também, que no grupo Ingestão, o pico dos comportamentos que compõem a sequência comportamental de saciedade aparece realmente em forma de um conjunto sequencial, ordenados de forma crescente entre os comportamentos de comer, beber, auto-limpeza e repouso (figura 7).

**Figura 7:** Pico, em período (4- min cada) para os comportamentos de comer, beber, auto-limpeza e repouso, nos diferentes protocolos (Controle, Privação e Ingestão). Valores expressos em - 25%/+ 75% da mediana. (\*) para  $p < 0,05$  relacionado ao grupo Controle.

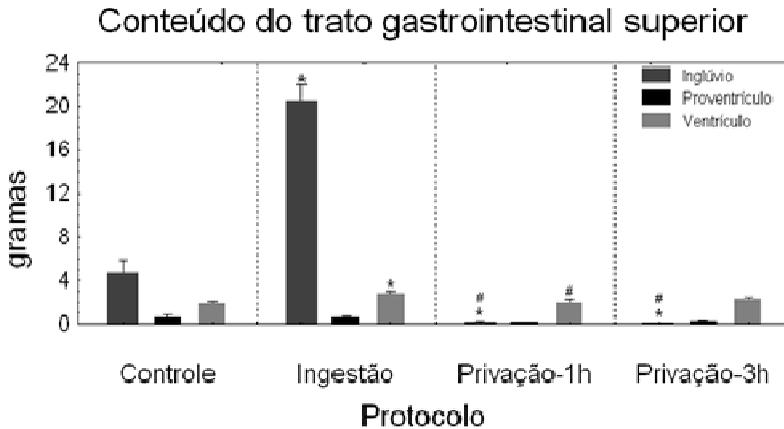


Em resumo, o grupo experimental Ingestão é o único que exhibe um acentuado comportamento ingestivo, e, conseqüentemente, uma seqüência comportamental de saciedade intensa e consistente. Além disso, esse grupo apresenta uma distância temporal entre os comportamentos suficiente para que possam ser avaliados separadamente, ou seja, o tempo de distância entre os comportamentos ingestivos e os outros que fazem parte dessa seqüência é suficiente para afirmarmos que os resultados obtidos na análise da marcação da proteína FOS estão especialmente ligados à ingestão, e não a outros comportamentos. Também é observado que no grupo Controle, que tem disponível ração comum e água, todos os comportamentos que compõem a SCS estão presentes, porém, não claramente organizados em seqüência. No grupo que é privado de ingestão, grupo Privação, observamos comportamentos relacionados ao sono no início do período experimental e comportamentos ativos ao final, ou seja, em disposição oposta ao que ocorre nos grupos com acesso à alimentação, apesar de a duração total deste comportamento não ter diferença com o grupo Controle.

### 3.2 CONTEÚDO DO TRATO GASTROINTESTINAL SUPERIOR

As condições de enchimento e esvaziamento do trato gastrointestinal superior (TGIS) podem variar conforme o volume de alimento ingerido, e também conforme o tempo em que os animais permanecem em privação alimentar. O conteúdo do TGIS nesses animais teve maiores variações na medida do conteúdo do inglúvio (papo). Os dados de conteúdo do inglúvio apresentaram distribuição não-normal, e foram então ranqueados para que pudessem ser aplicados os testes para valores paramétricos. Nesta porção, o grupo Ingestão foi o que apresentou maior volume contido, e o aumento foi significativo com relação a todos os outros grupos ( $F(3, 30) = 79,72$ ): grupo Controle ( $p < 0,0001$ ), grupo Privação-1h ( $p < 0,00006$ ), e grupo Privação-3h ( $p < 0,00005$ ). Entre o grupo Controle e os dois grupos submetidos à privação alimentar, o aumento do conteúdo do inglúvio foi significativo para o grupo Controle ( $p < 0,008$  em relação as outras duas situações). Entre os dois grupos submetidos à privação alimentar, não houve diferença significativa no conteúdo dessa porção. Com relação ao ventrículo (moela), houve diferença significativa entre os grupos Controle e Ingestão ( $F(3, 30) = 3,51, p < 0,015$ ), e entre o grupo Ingestão e o grupo Privação-1h. Entre o grupo Ingestão e o grupo Privação-3h não houve variação significativa no conteúdo do ventrículo. Na porção intermediária do TGIS, o proventrículo, não houve diferença entre os grupos, e o conteúdo existente nessa porção foi sempre muito pequeno (Figura 8).

**Figura 8:** Conteúdo do trato gastrointestinal superior (inglúvio, proventrículo e ventrículo), nos diferentes protocolos experimentais: Controle (ração comum e água ad libitum), Privação-3h (privação alimentar total por 3 horas), Privação-1h (privação alimentar total por 1 hora), e Ingestão (privação de 1 hora seguida por disponibilização de ração comum, água e ração palatável, por 90 minutos). (\*) para  $p < 0,05$  com relação ao grupo Controle; (#) para  $p < 0,05$  com relação ao grupo Ingestão.



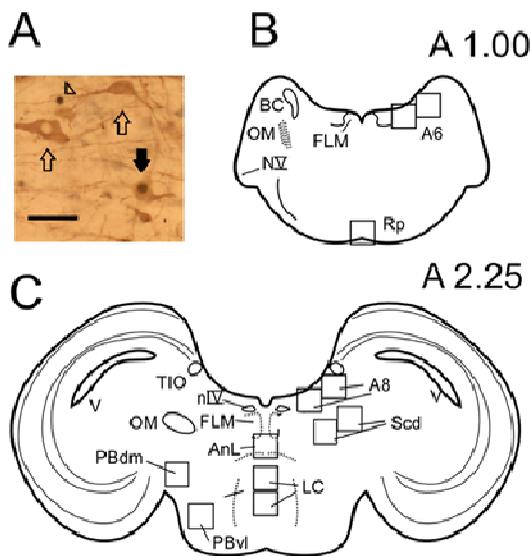
Em resumo, as variações de conteúdo no trato gastrointestinal superior desses animais apresentaram diferenças significantes principalmente em relação ao inglúvio. Nessa porção do TGIS, nos grupos privados de alimentação por 1 ou 3 horas, a quantidade de comida encontrada foi zero ou muito próxima a esse valor em todos os animais. No grupo Controle, condição em que os animais tinham livre acesso à ração comum e água, o conteúdo encontrado foi bastante variado, já que durante o período experimental, que antecede o sacrifício, a quantidade de alimento possivelmente ingerida, quando ocorre, é bastante instável. Já no grupo Ingestão, invariavelmente, a quantidade de alimento encontrada nessa porção do TGIS foi grande, e o inglúvio encontrava-se sempre dilatado por armazenar esse grande conteúdo.

### 3.3 DOS PROCEDIMENTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

A Figura 9 mostra as possibilidades de marcações encontradas (9A), a localização das áreas de contagem (9B) e o padrão geral de distribuição das células marcadas com Fos, TPH, TH ou duplamente marcadas (FOS+ / TPH+ ou FOS+ / TH+) no tronco encefálico do pombo. A densidade de marcação TPH+ e/ou TH+ foram similares entre os três grupos experimentais nos diferentes núcleos analisados. Por outro lado, as densidades das marcações Fos+, Fos+/TPH+ ou FOS+/TH+ foram afetadas pelos diferentes tratamentos.

**Figura 9:** A) fotomicrografia em um campo de contagem representativo (o núcleo AnI), indicando células com marcação nuclear Fos+ (cabeça

da seta), marcação citoplasmática (nesse caso TPH+, seta vazia), e dupla marcação Fos+/TPH+ (seta preenchida). Barra de escala = 50µm (DOS SANTOS et al., 2011). B e C) desenhos esquemáticos de secções frontais do tronco encefálico do pombo mostrando a localização dos campos de contagem. Níveis rostrocaudais do atlas do encéfalo do pombo de Karten e Hodos, 1967, são indicados no canto superior direito de cada desenho.



### 3.3.1 Distribuição da marcação Fos+

Foram realizadas análises qualitativas de todas as regiões no mesencéfalo e da ponte onde houve ocorrência de células marcadas pela proteína FOS. Após esta avaliação foram selecionadas para contagens as regiões que aparentemente demonstravam diferenças na quantidade de marcação entre os grupos experimentais. As secções entre as regiões mesencefálicas e pontinas dos pombos do grupo com livre acesso à ração usual e água (Controle), demonstraram bastante semelhança entre si na marcação Fos+ nos núcleos celulares das diferentes regiões analisadas. O mesmo ocorreu com os grupos Ingestão e Privação, demonstrando um padrão de marcação semelhante para cada grupo, entre os diferentes animais. A marcação FOS+ apresentou diferença significativa entre os três grupos comparados, em diversos núcleos

analisados. Em outros, entretanto, mesmo conhecidamente relacionados à ingestão alimentar, a expressão da marcação foi bastante semelhante (tabela 3 e figuras 10 e 11). A nomenclatura utilizada baseia-se no atlas para encéfalo de pombo (KARTEN E HODOS, 1967), e na revisão de nomenclatura para encéfalo de aves (REINER et al., 2004).

**Tabela 3:** Análise qualitativa do total de células FOS+ em todos os núcleos onde houve a presença dessa marcação. A qualificação foi realizada de acordo com sinais, que correspondem a: ++++: muito intenso; +++: intenso; ++: médio; +: pouco.

Regiões analisadas	Controle	Palatável	Privação
AVT	+	+	+
Gct	++	++	++
ICo	+++	+++	+++
IP	+	+	+
MLd	++	++	++
A8	++++	++	++++
Scd	++	++	++
ZpFLM	+	+	+
LC	+	+	+
CS	+++	++	++
Anl	++	+	++
A6	++	++	+++
Rp	+	+	++
PBdm	++++	+++	++++
PBvl	++	++	++

Em secções de níveis mesencefálicos rostrais de A 4,50 a A 4,00, encontramos ventromedialmente a *area ventralis tegmenti* (AVT), com marcação FOS+ esparsa e em pequena quantidade, semelhante nos três grupos experimentais (Controle, Ingestão e Privação). Dorsal a esta área, também numa posição medial, encontra-se a *substantia grisea centralis* (Gct), que circunda o aqueduto cerebral ventrolateralmente e aparece desde o mesmo nível da AVT, percorrendo o mesencéfalo caudalmente (até aproximadamente o nível A 2,00). Nesta região observa-se marcação Fos+ em quantidade moderada e esparsa, também sem apresentar diferenças entre os grupos experimentais.

A partir do nível A 4,00, quando a *substantia grisea et fibrosa periventricularis* (SGP) passa a ser menos evidente, surge o *nucleus intercollicularis* (ICo), que segue medial e dorsalmente ao encontro da GCt, formando uma estrutura única contínua, dividida apenas esquematicamente. No ICo, a marcação Fos é intensa e consistente, predominando nas porções dorsomediais desse núcleo. A marcação é mais evidente em secções mais caudais do mesencéfalo, circundando o *nucleus mesencephalicus lateralis, pars ventralis* (MLd), região que apresenta pequena quantidade de células Fos+. Aproximadamente ao nível A 3,75 do mesencéfalo, surge, ventromedialmente, o *nucleus interpeduncularis* (IP), que aparece com marcação Fos+ moderada e esparsa. Nessas três regiões, ICo, MLd e IP, a marcação FOS também não apresenta diferença entre os grupos.

Nas porções mais caudais do mesencéfalo, e adentrando a ponte em suas porções mais rostrais, encontra-se a região A8, conhecida na literatura também como *locus ceruleus rostral part* (LoC). No grupo Controle, esta região apresenta marcação Fos+ intensa e consistente em toda a sua extensão, semelhante ao que ocorre no grupo Privação. A marcação FOS+ encontra-se reduzida no grupo Ingestão, em relação ao grupo Controle ( $F(2, 13) = 14,337, p < 0,0038$ ), e também em relação ao grupo Privação ( $F(2, 13) = 14,337, p < 0,00035$ ). A marcação FOS+ permanece, porém com menor intensidade, na região imediatamente ventral ao núcleo A8, chamada de núcleo *subceruleus dorsalis* (SCd). Nessa região não foram encontradas diferenças na densidade de marcação FOS+ entre os três grupos, que aparece em média quantidade e distribuição esparsa. Em porções mais caudais, quando a ponte já se encontra desconectada do colículo óptico, o *locus ceruleus*, localizado agora mais lateralmente, é denominado A6 (*locus ceruleus caudalis*), pelas últimas revisões de nomenclatura (REINER et al., 2004), e apresenta intensa e semelhante marcação Fos+ em toda a sua extensão nos grupos Controle e Privação. O grupo Ingestão, com relação ao grupo Privação, apresenta marcação FOS+ reduzida neste núcleo ( $F(2, 11) = 9,277, p < 0,0022$ ).

No mesmo nível onde encontramos o núcleo A8 (aproximadamente A 2,75), observa-se também o início do *nucleus centralis superior* (CS), localizado dorsalmente ao IP, também numa posição medial. Esse núcleo é delimitado bilateralmente pelas fibras do *brachium conjunctivum descendens* (BCD) e dorsalmente pelas fibras

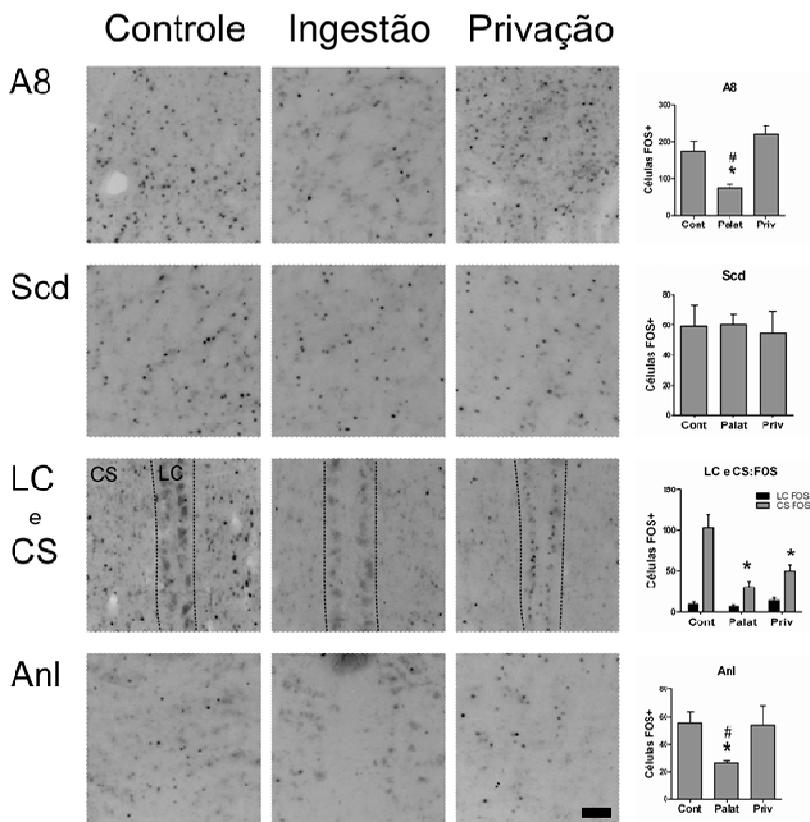
da *decussation brachiorum conjunctivorum* (DBC). O grupo Controle é o grupo que apresenta maior consistência de marcação Fos+ nesse núcleo, em todos os níveis em que ele aparece ( $F(2, 14) = 11,88, p < 0,0009$ ). A quantidade de marcação aparece progressivamente reduzida nos grupos Privação ( $p < 0,003$ ) e Ingestão ( $p < 0,0004$ ).

Em porções mais caudais, onde o núcleo IP já não é mais visto, surge o núcleo *linearis caudalis* (LC), que encontra-se medialmente adjacente ao CS, formado por duas colunas de células. Este núcleo apresenta uma quantidade muito pequena de marcação Fos+ em todos os grupos, podendo até mesmo ser inexistente em alguns animais dos grupos Controle e Ingestão. Nesse mesmo nível (aproximadamente A 2,25), encontra-se também um breve núcleo chamado de *nucleus annularis* (Anl), que aparece nos grupos Controle e Privação com marcação Fos+ em quantidade moderada. Já no grupo Ingestão, a marcação FOS+ encontra-se reduzida com relação aos outros dois grupos ( $F(2, 11) = 4,313, p < 0,41$ ).

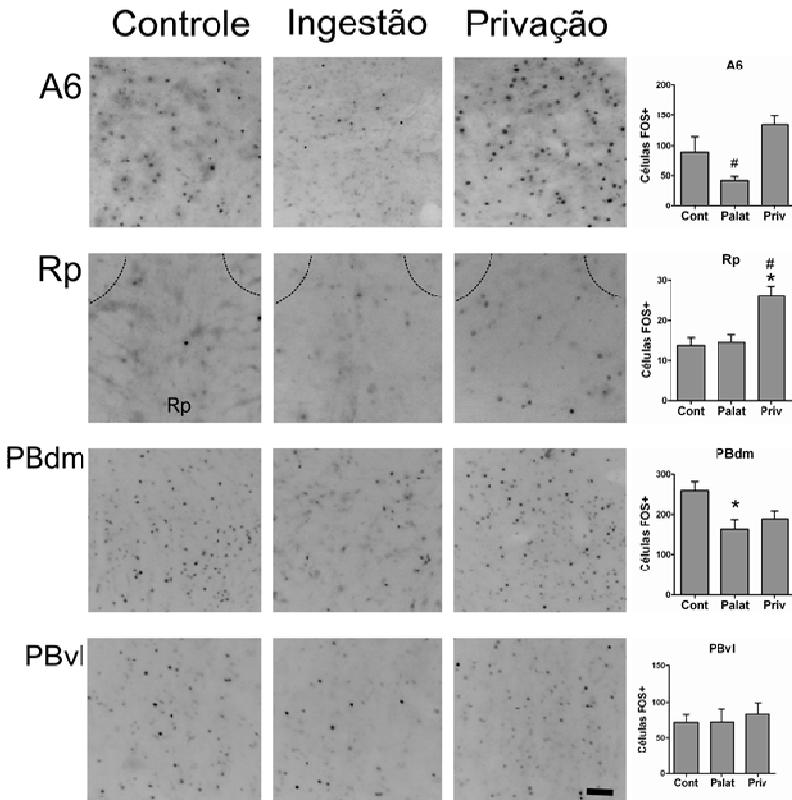
Aproximadamente ao nível A 1,75, nas porções caudais finais do mesencéfalo, quando não se observa mais o núcleo CS, surge, na porção ventromedial, o núcleo *raphe pontis* (Rp), que segue seu trajeto caudalmente, passando pela ponte e pelo bulbo, até o início da medula espinhal. A marcação Fos+ neste local varia entre pequena e moderada quantidade, porém, nunca ausente, ocorrendo com intensidade maior no grupo Privação, com relação aos outros dois grupos ( $F(2,14) = 9,949, p < 0,002$ ). Nas primeiras porções da ponte rostral, quando não encontramos mais o núcleo LC, aparece, numa posição semelhante, o *nucleus paramedianus* (PaM). Igualmente ao Rp, este núcleo apresenta marcação Fos+ fraca e/ou moderada, porém, sem apresentar diferenças significantes entre os grupos. Ainda nas porções mais rostrais da ponte, e seguindo para suas porções caudais, encontram-se três núcleos de interesse: o *nucleus vestibularis medialis* (VeM), localizado dorsolateralmente ao *fasciculus longitudinalis medialis* (FLM), o *nucleus laminaris* (La), lateral ao núcleo VeM, e o *nucleus reticularis parvocellularis* (Rpc), localizado lateralmente ao *nucleus reticularis pontis caudalis* (RPgc) e medialmente ao *nucleus et tractus descendens nervi trigemini* (TTD). O primeiro deles (VeM) encontrado sempre com intensa marcação Fos+, e os dois últimos (La e Rpc) com marcação constantemente moderada, também sem apresentar diferença significativa na densidade de marcação nessas regiões. Nas margens ventrais da ponte, lateral à Rp e medial ao *nucleus pontis lateralis* (PL),

encontra-se o *nucleus pontis medialis* (PM), que apresenta marcação Fos+ intensa e localmente concentrada, também sem exibir diferença significativa entre os grupos.

**Figura 10:** Amostras de fotomicrografias de secções do tronco encefálico, marcadas por imunistoquímica para a proteína FOS, representando os seguintes núcleos: A8, Scd, LC, CS, Anl. O gráfico ao lado de cada conjunto de fotomicrografia demonstra a densidade de marcação FOS+ para cada núcleo analisado, nas 3 diferentes condições experimentais. \* para  $p < 0,05$  em comparação com o grupo SCS- controle. # para  $p < 0,05$  em comparação com o grupo SCS- privação. Barra de escala 5 $\mu$ m.



**Figura 11:** amostras de fotomicrografias de secções do tronco encefálico, marcadas por imunistoquímica para a proteína FOS, representando os seguintes núcleos: A6, Rp, PBdm e PBvl. O gráfico ao lado de cada conjunto de fotomicrografia demonstra a densidade de marcação FOS+ para cada núcleo analisado, nas 3 diferentes condições experimentais. \* para  $p < 0,05$  em comparação com o grupo SCS- controle. # para  $p < 0,05$  em comparação com o grupo SCS- palatável ou SCS- privação. Barra de escala 5 $\mu$ m.



Em resumo, comparando os três grupos experimentais entre si, o grupo Ingestão foi o que apresentou menor número de células ativas (células imunorreativas à FOS) no período experimental, nos núcleos analisados. No núcleo A8, local onde os grupos Controle e Privação

apresentam intensa quantidade de células FOS+, o grupo Ingestão apresenta uma quantidade bastante inferior. O mesmo ocorre no núcleo Anl, ou seja, a densidade de marcação FOS+ nesse núcleo é inferior no grupo Ingestão, com relação aos outros dois grupos. No núcleo PBdm a densidade de células FOS+ é inferior no grupo Ingestão, porém, nesse caso, somente em relação ao grupo Controle, e no núcleo A6 a densidade de células FOS+ é inferior no grupo Ingestão somente em relação ao grupo Privação. No núcleo CS o grupo Controle apresenta densidade de células FOS+ superior ao observado no grupo Ingestão e também no grupo Privação. No núcleo Rp a densidade de marcação FOS+ foi superior no grupo Privação, em relação aos outros dois grupos. Nos núcleos Scd, LC e PBvl não foram observadas diferenças na densidade de células FOS+ entre os grupos.

### **3.3.2 Distribuição de marcação TPH+ e TH+**

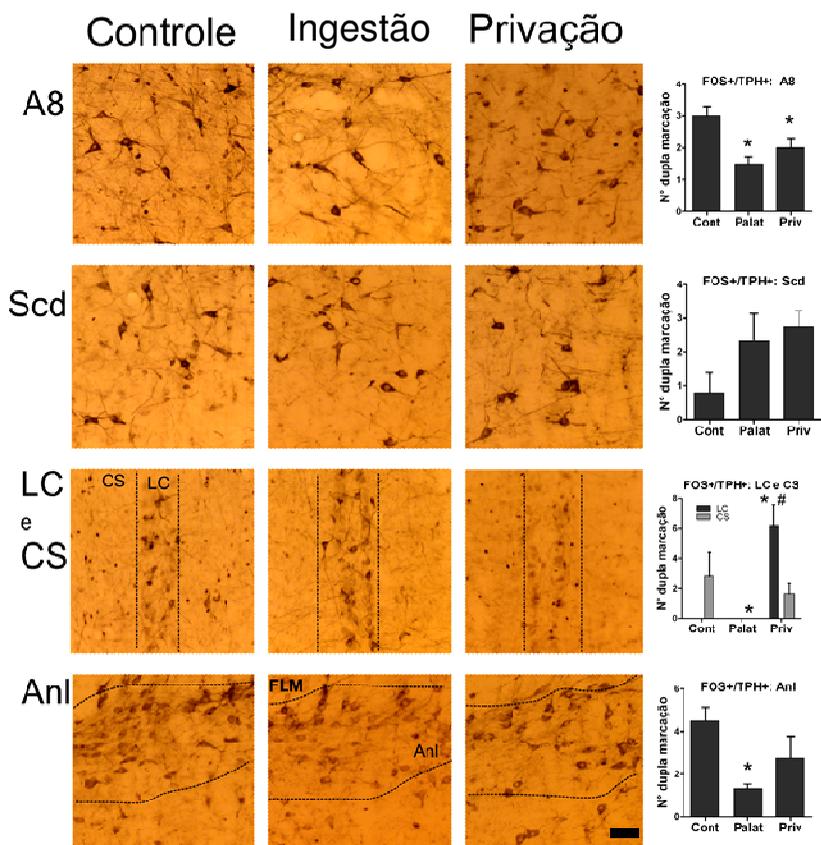
Nos núcleos onde houve a presença de células imunorreativas à TPH não foram observadas diferenças na densidade média de marcação entre os grupos Controle, Ingestão e Privação. O mesmo ocorreu nos núcleos onde foram encontradas células imunorreativas à TH. Isso sugere que a amostragem destas células foi estável, eliminando qualquer possível diferença tendenciosa para alguma situação experimental específica. Foram encontrados grupos celulares TPH+ nos seguintes núcleos mesencefálicos e pontinos: A8, Scd, LC, CS, Anl, A6 e Rp. Nas mesmas regiões foram encontradas células TH+, além do núcleo AVT, no mesencéfalo. Também foram observadas algumas células TPH+ difusamente distribuídas nos núcleos PBdm, PBvl e Rpc, além de células TH+ no núcleo Rpc.

### **3.3.3 Distribuição de dupla marcação FOS+/TPH+**

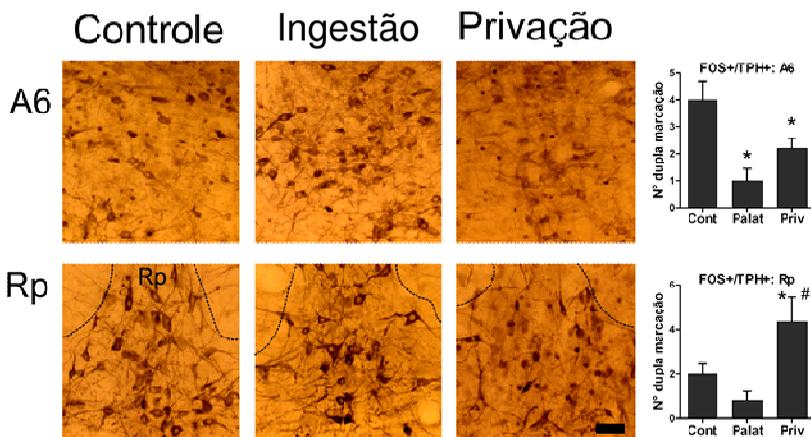
As figuras 12 e 13 apresentam amostras da distribuição de células marcadas com FOS (células FOS+), TPH (células TPH+) ou duplamente marcadas com FOS e TPH (células FOS+/TPH+), nos diferentes núcleos analisados. Essa técnica permite, além da análise de células FOS+ e TPH+ separadamente, a quantificação de neurônios serotoninérgicos ativos ou inibidos nas três diferentes condições experimentais. No núcleo A8 observamos uma maior quantidade de células FOS+/TPH+ no grupo Controle em relação ao grupo Ingestão ( $F(2,13) = 7,38, p < 0,003$ ) e também em relação ao grupo Privação ( $p <$

0,02). O mesmo ocorre no núcleo A6, ou seja, foi observado um maior número de células FOS+/TPH+ nesse núcleo no grupo Controle, em relação ao grupo Ingestão ( $F(2,11) = 8,61, p < 0,001$ ) e também ao grupo Privação ( $p < 0,027$ ). No núcleo LC não foram observadas diferenças significantes entre os grupos Controle e Ingestão. Houve, porém, um aumento significativo de células FOS+/TPH+ no grupo Privação em comparação aos outros dois grupos nessa região ( $H(2, n = 17) = 15,06, p < 0,004$  e  $p < 0,002$ , respectivamente). O mesmo foi observado no núcleo Rp, onde o número de células FOS+/TPH+ foi significativamente maior no grupo Privação do que nos grupos Controle ( $F(2, 11) = 5,75, p < 0,04$ ) e Ingestão ( $F(2, 11) = 5,75, p < 0,007$ ). Em duas regiões o grupo Ingestão apresenta um menor número de células FOS+/TPH+ em relação ao grupo Controle: CS ( $H(2, n = 17) = 8,94, p < 0,01$ ) e Anl ( $F(2, 11) = 6,95, p < 0,005$ ). No núcleo Scd não foram observadas diferenças significantes na dupla marcação FOS+/TPH+ entre os três grupos experimentais. Nos núcleos PBdm e PBvl, que apresentam pequena quantidade de células TPH+ esparsamente distribuídas, não foram encontrados casos de dupla marcação FOS+/TPH+ em nenhuma situação experimental. A tabela 4 mostra as médias  $\pm$  erro padrão da média das células marcadas com FOS+, TPH+ e FOS+/TPH+.

**Figura 12:** Amostras de fotomicrografias de secções do tronco encefálico, marcadas por imunistoquímica de dupla marcação para a proteína FOS e para TPH, representando os seguintes núcleos: A8, Scd, LC, CS e Anl. O gráfico ao lado de cada conjunto de fotomicrografias demonstra a densidade de dupla marcação FOS+/TPH+ para cada núcleo analisado, nas 3 diferentes condições experimentais. \* para  $p < 0,05$  em comparação com o grupo Controle. # para  $p < 0,05$  em comparação com o grupo Ingestão. Barra de escala 5 $\mu$ m.



**Figura 13:** Amostras de fotomicrografias de secções do tronco encefálico, marcadas por imunistoquímica de dupla marcação para a proteína FOS e para TPH, representando os núcleos A6 e Rp. O gráfico ao lado de cada conjunto de fotomicrografias demonstra a densidade de dupla marcação FOS+/TPH+ para cada núcleo analisado, nas três diferentes condições experimentais. \* para  $p < 0,05$  em comparação com o grupo Ingestão. Barra de escala 5 $\mu$ m.



Em resumo, nos núcleos A8 e A6 os grupos Ingestão e Privação apresentaram um número inferior de células duplamente marcadas por FOS e TPH (células FOS+/TPH+), em comparação ao grupo Controle. Já nos núcleos CS e Anl, o grupo Ingestão apresentou um número reduzido de células FOS+/TPH+, em relação apenas ao grupo Controle. No núcleo Rp, o grupo Privação foi o que apresentou maior número de células FOS+/TPH+, assim como no núcleo LC, onde não foram encontradas células FOS+/TPH+ nos grupos Controle e Ingestão. Nos núcleos Scd, PBdm e PBvl não foram observadas diferenças entre os grupos.

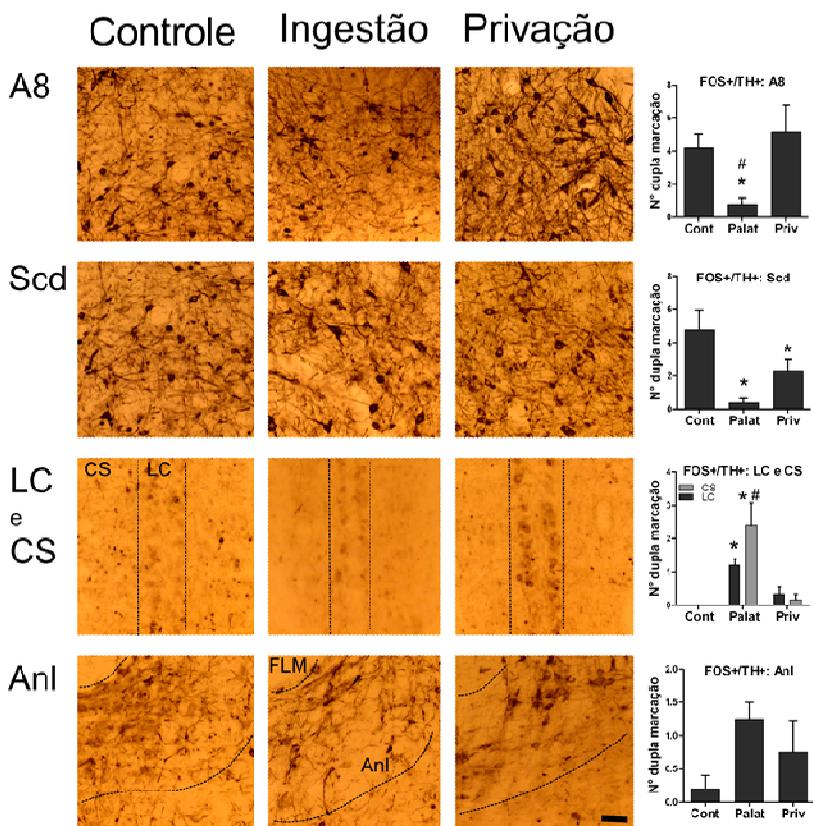
**Tabela 4:** Efeitos dos diferentes protocolos de ingestão sobre a expressão Fos em neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos de distintos núcleos pontinos e mesencefálicos em pombos. Todos os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*) para  $p < 0,05$  em comparação ao grupo SCS- controle e (#) para  $p < 0,05$  em comparação ao grupo Ingestão ou Privação.

	<b>Controle</b>	<b>Ingestão</b>	<b>Privação</b>
<b>A8</b>			
FOS+	175,40 $\pm$ 26,18	75,66 $\pm$ 9,22 * #	219,8 $\pm$ 23,7
TPH+	77 $\pm$ 3,97	90,66 $\pm$ 2,51	88 $\pm$ 8,06
FOS+/ TPH+	3 $\pm$ 0,31	1,5 $\pm$ 0,22 *	2 $\pm$ 0,31 *
<b>Scd</b>			
FOS+	59 $\pm$ 14,39	60 $\pm$ 7,45	54,5 $\pm$ 14,93
TPH+	41,4 $\pm$ 5,67	39,16 $\pm$ 2,34	48,75 $\pm$ 3,96
FOS+/ TPH+	0,8 $\pm$ 0,58	2,33 $\pm$ 0,80	2,75 $\pm$ 0,47
<b><i>Linearis Caudalis</i></b>			
FOS+	9,8 $\pm$ 2,8	6,66 $\pm$ 2,23	13,66 $\pm$ 3,22
TPH+	31 $\pm$ 6,37	36 $\pm$ 2,65	29,33 $\pm$ 1,70
FOS+/ TPH+	0	0	6,16 $\pm$ 1,4 *
<b>Central Superior</b>			
FOS+	103,2 $\pm$ 17,02	30,50 $\pm$ 6,72*	49,8 $\pm$ 7,68*
PH+	27,6 $\pm$ 9,23	19 $\pm$ 6,86	11,5 $\pm$ 2,74
FOS+/ TPH+	2,8 $\pm$ 1,59	0 *	1,66 $\pm$ 0,66
<b><i>Annularis</i></b>			
FOS+	55 $\pm$ 8,54	26,16 $\pm$ 1,47 *#	53,5 $\pm$ 14,41
TPH+	140 $\pm$ 14,93	159,5 $\pm$ 7,27	165 $\pm$ 15,37
FOS+/ TPH+	4,5 $\pm$ 0,64	1,33 $\pm$ 0,21 *	2,75 $\pm$ 1,03
<b>A6</b>			
FOS+	89,75 $\pm$ 24,82	42 $\pm$ 6,58 #	134 $\pm$ 14,73
TPH+	100 $\pm$ 18,47	89 $\pm$ 19,31	80,8 $\pm$ 10,84
FOS+/ TPH+	4 $\pm$ 0,70	1 $\pm$ 0,44 *	2,2 $\pm$ 0,37 *
<b><i>Raphe pontis</i></b>			
FOS+	13,6 $\pm$ 2,27	14,33 $\pm$ 2,17	26 $\pm$ 2,31 *#
TPH+	45 $\pm$ 4,78	49,5 $\pm$ 4,44	45 $\pm$ 1,18
FOS+/ TPH+	2 $\pm$ 0,44	0,83 $\pm$ 0,40	4,33 $\pm$ 1,1 *#
<b>PBdm</b>			
FOS+	257,4 $\pm$ 22,01	161,33 $\pm$ 25,95 *	189,5 $\pm$ 18,41
<b>PBvl</b>			
FOS+	71 $\pm$ 10,7	71,5 $\pm$ 17,61	82,2 $\pm$ 17,01

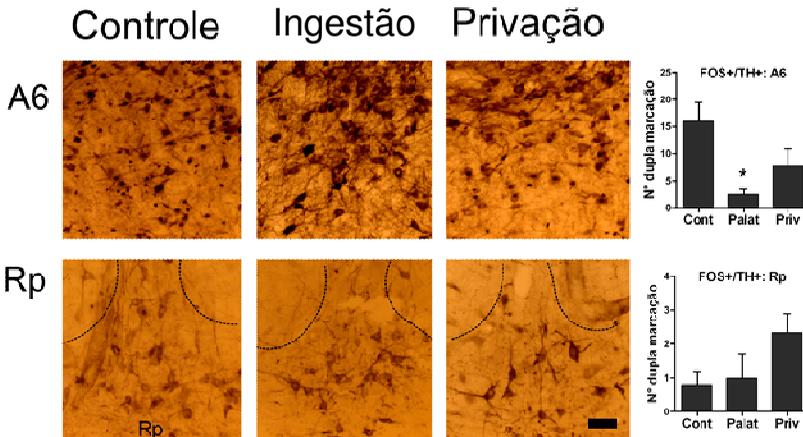
### 3.3.4 Distribuição de dupla marcação FOS+/ TH+

As figuras 14 e 15 mostram a distribuição de células com marcação FOS (células FOS+), TH (células TH+) e duplamente marcadas com FOS e TH (células FOS+/TH+). Essa técnica permite, além da análise de células FOS+ e TH+ separadamente, a quantificação de neurônios catecolaminérgicos ativos ou inibidos nas três diferentes condições experimentais, nos distintos núcleos estudados. No núcleo A8 encontramos uma quantidade de células FOS+/TH+ significativamente menor no grupo Ingestão do que nos grupos Controle ( $F(4, 12) = 4,66$ ,  $p < 0,04$ ) e Privação ( $p < 0,01$ ). No núcleo A6 o número de células FOS+/TH+ no grupo Ingestão também aparece reduzido, porém, nesse caso, apenas em relação ao grupo Controle ( $F(2, 9) = 4,51$ ,  $p < 0,02$ ). No núcleo Scd o número de células FOS+/TH+ é menor nos grupos Ingestão ( $F(2, 12) = 8,06$ ,  $p < 0,001$ ) e Privação ( $p < 0,03$ ), em relação ao grupo Controle. Os dados dos núcleos LC e CS não apresentaram distribuição normal, e para esses dados foram então realizados testes estatísticos não-paramétricos. No núcleo LC não foram encontrados casos de dupla marcação FOS+/TH+ no grupo Controle. No grupo Privação, os poucos casos de dupla marcação encontrados não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Controle. Porém, no grupo Ingestão a ocorrência de dupla marcação FOS+/TH+ foi significativamente maior em relação ao grupo Controle ( $H(2, N = 16)$ ,  $p < 0,007$ ), e marginalmente significativa com relação ao grupo Privação ( $p = 0,051$ ). O núcleo CS apresenta uma distribuição de células FOS+/TH+ semelhante ao encontrado no núcleo LC, também sem ocorrência de casos no grupo Controle, e sem diferenças significantes entre esse grupo e os poucos casos encontrados no grupo Privação. O grupo Ingestão, no núcleo CS, apresenta densidade de marcação FOS+/TH+ significativamente maior que o observado no grupo Controle ( $H(2, N = 16) = 8,96$ ,  $p = 0,03$ ), e também no grupo Privação ( $p = 0,03$ ). Nos núcleos Anl e Rp não houve diferença significativa na densidade de marcação FOS+/TH+ entre os três grupos experimentais, e a densidade de marcação foi pequena em todos os casos.

**Figura 14:** Amostras de fotomicrografias de secções do tronco encefálico, marcadas por imunistoquímica de dupla marcação para a proteína FOS e para TH, representando os seguintes núcleos: A8, Scd, LC, CS e Anl. O gráfico ao lado de cada conjunto de fotomicrografia demonstra a densidade de dupla marcação FOS+/TH+ para cada núcleo analisado, nas 3 diferentes condições experimentais. \* para  $p < 0,05$  em comparação com o grupo Controle. # para  $p < 0,05$  em comparação com o grupo Privação. Barra de escala 5 $\mu$ m.



**Figura 15:** Amostras de fotomicrografias de secções do tronco encefálico, marcadas por imunistoquímica de dupla marcação para a proteína FOS e para TH, representando os núcleos A6 e Rp. O gráfico ao lado de cada conjunto de fotomicrografias demonstra a densidade de dupla marcação FOS+/TH+ para cada núcleo analisado, nas três diferentes condições experimentais. \* para  $p < 0,05$  em comparação com o grupo Controle. Barra de escala 5 $\mu$ m.



Em resumo, no núcleo A8 encontramos uma quantidade de células FOS+/TH+ menor no grupo Ingestão do que nos grupos Controle e Privação. No núcleo A6 o número de células FOS+/TH+ no grupo Ingestão também aparece reduzido, porém, nesse caso, apenas em relação ao grupo Controle. No núcleo Scd o número de células FOS+/TH+ é menor nos grupos Ingestão e Privação, em relação ao grupo Controle. Nos núcleos LC e CS, o grupo Ingestão foi o que apresentou um número superior de células FOS+/TH+, inclusive, nesses dois núcleos, não foram observados casos de dupla marcação FOS+/TH+ no grupo Controle. Os núcleos Anl e Rp não apresentaram casos de marcação FOS+/TH+ em nenhum dos três grupos.

**Tabela 5:** Efeitos dos diferentes protocolos de ingestão sobre a expressão Fos em neurônios catecolaminérgicos e não catecolaminérgicos de distintos núcleos pontinos e mesencefálicos em pombos. Todos os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*) para  $p < 0,05$

0,05 em comparação ao grupo Controle e (#) para  $p < 0,05$  em comparação ao grupo Ingestão ou Privação.

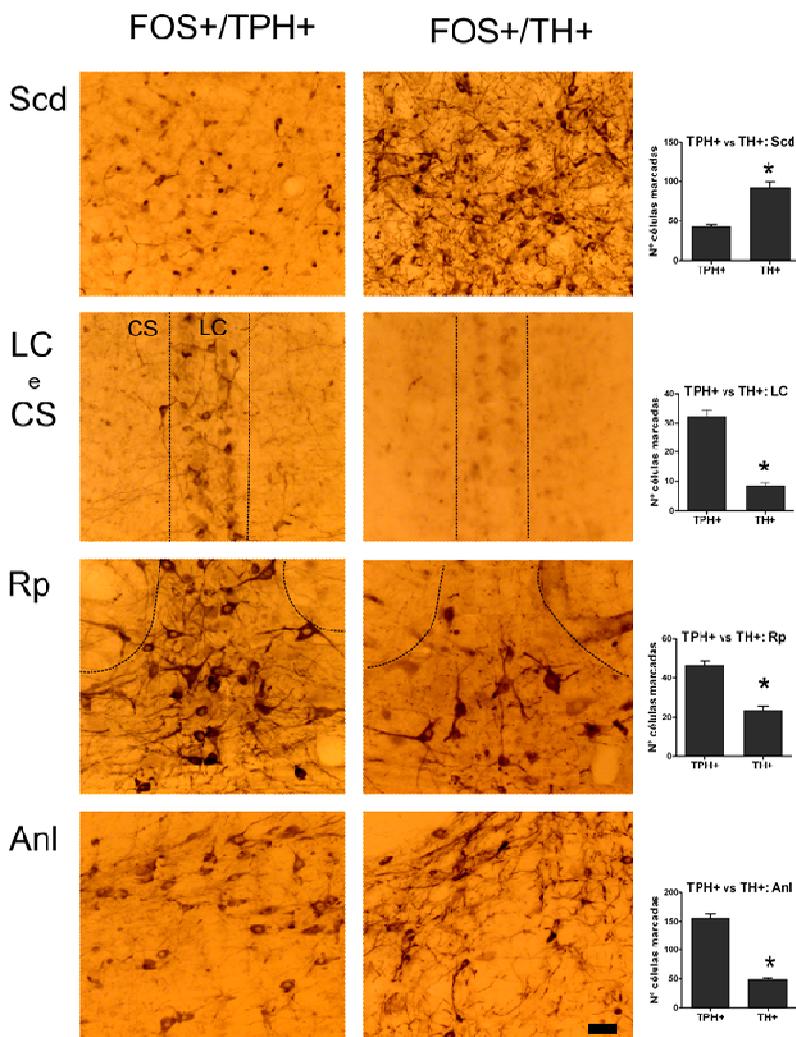
	<b>Controle</b>	<b>Ingestão</b>	<b>Privação</b>
<b>A8</b>			
FOS+	175,40 ± 26,18	75 ± 9,22 * #	219,8 ± 23,7
TH+	75,4 ± 7,65	68,6 ± 4,73	90,2 ± 4,48
FOS+/ TH+	4,2 ± 0,86	0,8 ± 0,37 * #	5,2 ± 1,59
<b>Scd</b>			
FOS+	59 ± 14,39	60 ± 7,45	54,5 ± 14,93
TH+	81 ± 5,98	89 ± 16,41	102,6 ± 11,38
FOS+/ TH+	4,75 ± 1,18	0,4 ± 0,24 *	2,33 ± 0,66 *
<b>Linearis</b>			
<b>Caudalis</b>			
FOS+	9,8 ± 2,8	6,66 ± 2,23	13,66 ± 3,22
TH+	7 ± 1,26	7,8 ± 1,24	10,16 ± 2
FOS+/ TH+	0	1,2 ± 0,2 *	0,33 ± 0,21
<b>Central Superior</b>			
FOS+	103,2 ± 17,02	30,50 ± 6,72 *	49,83 ± 7,68 *
TH+	12,6 ± 2,61	16,6 ± 2,67	8,66 ± 1,64
FOS+/ TH+	0	2,4 ± 0,67* #	0,16 ± 0,16
<b>Annularis</b>			
FOS+	55 ± 8,54	26,2 ± 1,47 * #	53,5 ± 14,41
TH+	44,8 ± 4,36	53 ± 6,65	49,75 ± 4,87
FOS+/ TH+	0,2 ± 0,2	1,33 ± 0,33	0,75 ± 0,47
<b>A6</b>			
FOS+	89,75 ± 24,82	42 ± 6,58 #	134,2 ± 14,73
TH+	82,25 ± 13,43	73,33 ± 17,85	103,25 ± 10,96
FOS+/ TH+	16 ± 3,48	3 ± 1,15 *	7,75 ± 3,14
<b>Raphe pontis</b>			
FOS+	15,6 ± 2,27	14,33 ± 2,17	26,2 ± 2,31 * #
TH+	24,4 ± 3,62	25,25 ± 3,68	21,33 ± 3,59
FOS+/ TH+	0,8 ± 0,37	1 ± 0,70	2,33 ± 0,55

### 3.3.5 Diferenças entre a marcação TPH+ e TH+

Neurônios marcados pelo anticorpo da enzima tirosina hidroxilase (neurônios TH+) foram encontrados no núcleo *Raphe pontis* (*Rp*), região onde não são comumente localizados, ou pelo menos descritos na literatura neurônios catecolaminérgicos em aves. Devido a

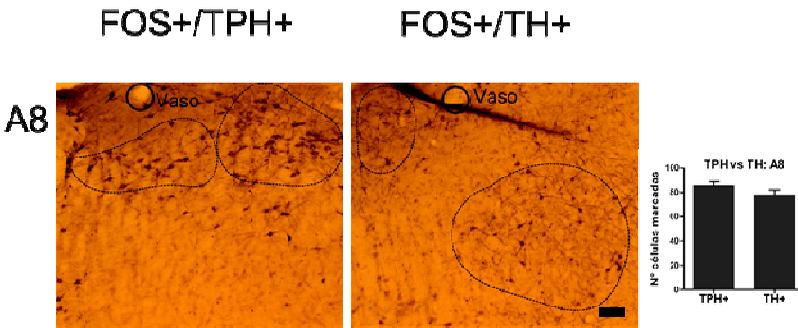
esta observação, foi levantada a hipótese de uma possível reação cruzada entre os anticorpos utilizados nas técnicas de imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) e triptofanohidroxilase (TPH). Porém, diversas são as evidências que nos levaram a acreditar que essa suspeita pode não ser verdadeira. Primeiramente observamos uma diferença significativa na densidade de marcação TPH+ e TH+ em algumas das regiões analisadas, como os núcleos Scd, LC, Anl e Rp, como mostra a figura 16. No núcleo Scd (figura 16, Scd) encontramos uma quantidade significativamente maior de células TH+ do que células TPH+ ( $F(1,28) = 43,018$ ,  $p < 0,00014$ ). O contrário, ou seja, uma maior quantidade de células TPH+, são encontradas em comparação com células TH+, nos outros três núcleos: LC ( $F(1, 31) = 97,927$ ,  $p < 0,00013$ ), Anl ( $F(1, 24) = 184,896$ ,  $p < 0,00015$ ) e Rp ( $F(1, 30) = 63,33$ ,  $p < 0,00013$ ) (figura 14, LC, Rp e Anl). Nas fotomicrografias que representam os núcleos Scd e Anl (figura 16, Scd e Anl), observamos também uma maior quantidade de fibras marcadas com TH+ na imunohistoquímica realizada para esta enzima.

**Figura 16:** Amostras de fotomicrografias de secções do tronco encefálico, marcadas por imunistoquímica para TPH e para TH, demonstrando as diferenças de marcação para as duas enzimas nas mesmas regiões. Estão representados os núcleos Scd, LC, CS, Rp e Anl. O gráfico ao lado demonstra a densidade de marcação TPH+ e TH+ para cada núcleo analisado. (\*) para  $p < 0,05$ . Barra de escala 5 $\mu$ m.



Outra característica diferencial é a localização das células TPH+ e TH+ dentro de um mesmo núcleo, como mostra na figura 17 um exemplo do núcleo A8. Essas imagens de fotomicrografia foram capturadas de secções mesencefálicas adjacentes de um mesmo animal, podendo ser reconhecidas por um marco anatômico colocalizado (vaso), e demonstram as diferenças nos locais de concentração dos dois tipos celulares analisados.

**Figura 17:** Fotomicrografias de secções adjacentes do núcleo A8, marcadas por imunohistoquímica de dupla marcação FOS+/TPH+ e FOS+/TH+. O gráfico ao lado demonstra a densidade de dupla marcação FOS+/TPH+ e FOS+/TH+ no núcleo analisado.

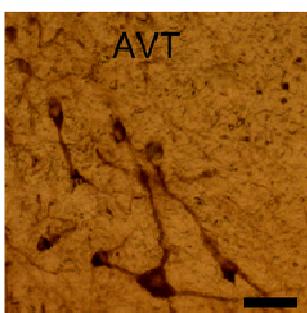
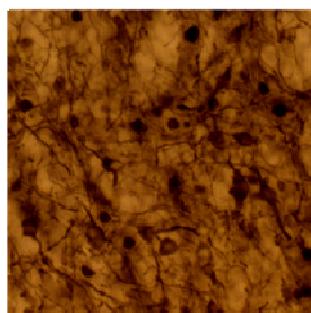
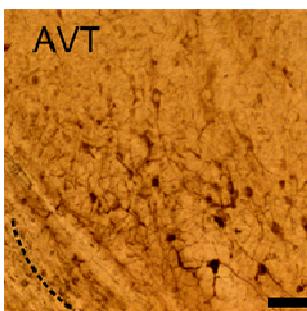
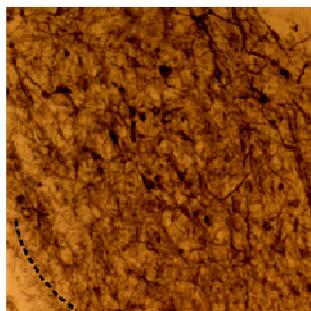
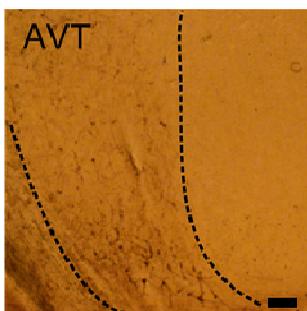
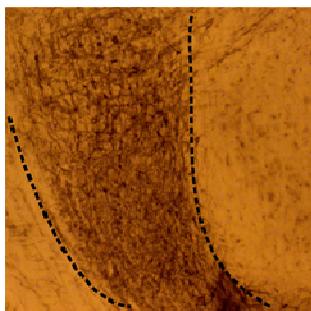


Também é possível verificar a existência de grande número de corpos celulares e fibras marcadas por TH especificamente no núcleo AVT, local onde a imunohistoquímica para TPH revelou uma quantidade muito pequena dessa marcação (figura 18). Barra de escala 5µm.

**Figura 18:** Fotomicrografias da região do AVT em diferentes magnificações, demonstrando as diferenças na marcação de células catecolaminérgicas e células serotoninérgicas. Barra de escala 5µm.

**Fos + TH**

**Fos + TPH**





## 4 DISCUSSÃO

Neste trabalho descrevemos a distribuição da marcação da proteína Fos em neurônios do tronco encefálico de pombos adultos após um evento ingestivo. Essa descrição foi acompanhada por uma análise dos comportamentos que se associam a tal ingestão. A análise comportamental foi necessária, uma vez que esses animais desencadeiam comportamento ingestivo intenso quando expostos a uma reação palatável. Em experimentos anteriormente realizados pelo laboratório, ainda não publicados (SPUDEIT et al., 2013, submetido), foi observado que a disponibilização de ração palatável (mix de sementes de aveia, girassol e painço branco) para pombos, mesmo saciados, com água e ração comum *ad libitum*, é um intenso estímulo ingestivo. A quantidade de ração ingerida por esses animais, quando a ração palatável está presente, pode triplicar em relação à linha de base ingestiva, e até mesmo quadruplicar se os animais forem submetidos à privação alimentar prévia ao oferecimento desta ração.

Além disso, após essa acentuada resposta ingestiva, é observada uma sequência de eventos comportamentais, chamada sequência comportamental de saciedade (SCS). A SCS consiste em um conjunto temporalmente organizado de eventos comportamentais que sucedem a ingestão de alimentos, e que inclui alterações (dependentes do volume e natureza da refeição ingerida) na ingestão de água, em comportamentos de manutenção (auto-limpeza ou grooming), e comportamentos relacionados ao repouso. Esta sequência foi detalhadamente descrita em roedores (ANTIN *et al.*, 1975; ISHII *et al.*, 2003; RODGERS *et al.*, 2010), e nosso laboratório, que já vem acumulando dados relacionados aos comportamentos peri- e pós-prandiais em pombos (CAMPANELLA *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2001; DOS SANTOS *et al.*, 2009; HACKL *et al.*, 2005; HOELLER *et al.*, 2013; STEFFENS *et al.*, 1997;), dedica-se em descrever a SCS nesses animais (SPUDEIT ET AL., 2013, submetido).

Nossos dados indicam que no grupo Ingestão (grupo que teve acesso à ração palatável, além da ração comum e água) foi observada uma SCS consistente, onde o comportamento de comer é sucedido pelo comportamento de beber, que por sua vez é sucedido por comportamentos de manutenção (auto-limpeza), e então por posturas típicas de sono (repouso). Observa-se também no grupo Ingestão, que

apresentou comportamento ingestivo intenso e de grande duração, este e todos os comportamentos posteriores são bastante acentuados, prolongados e espaçados entre si por grande período de tempo.

Já no grupo Controle, em que os animais permanecem em sua linha de base habitual, todos os comportamentos que fariam parte de uma sequência comportamental de saciedade estão presentes. Ou seja, esses animais apresentam episódios de ingestão de ração e água, episódios de auto-limpeza, e também de comportamentos relacionados ao sono. Porém, a sequência desses eventos não é evidente nesse grupo, como ocorre na SCS induzida por intenso estímulo ingestivo, e os picos dos comportamentos não são acentuados e claramente separados entre si. Apesar de não aparecer com tanta intensidade, é possível que estes animais apresentem naturalmente uma série de eventos pós-prandiais correspondentes à sequência comportamental de saciedade. Isso é plausível já que esses animais, mantidos no biotério em condições ambientais controladas, são alimentados e submetidos a procedimentos de manutenção com presença do pesquisador sempre no mesmo horário, além de terem um ciclo claro-escuro fixo de 12/12 horas. Todos esses controles habituais poderiam levar a uma sincronização de picos ingestivos coletivamente nesses animais, e tendo assim também uma sincronização dos comportamentos típicos dos períodos pós-prandiais.

Estudos realizados em pombos demonstram situações espontâneas de alto consumo de água e alimentos nessas aves. O primeiro desses eventos ocorre nas duas primeiras horas após o início do período iluminado do ciclo, e é precedida por um período natural de jejum. Estes animais não ingerem alimentos ou água durante a fase escura do ciclo e quebram este jejum ao início do período claro (ZEIGLER et al., 1972; DOS SANTOS et al., 2009; PHILLIPS e BERGER, 1989 e 1991). Outro pico importante de ingestão no pombo ocorre no terço final do período iluminado do ciclo. Cerca de quatro ou cinco horas antes do apagar da iluminação, pombos com livre acesso a ração e água, aumentam a ingestão de ambos. Esta longa “refeição” diminui na última hora do período claro e cessa completamente com o apagar das luzes (ZEIGLER et al., 1972; DOS SANTOS et al., 2009; PHILLIPS e BERGER, 1989 e 1991).

Porém, a ausência de um intenso e duradouro comportamento ingestivo no grupo Controle deixa a sequência de eventos pós-prandiais sem o mesmo destaque que ocorre no grupo Ingestão, já que mesmo

tendo períodos sincronizados de maior ingestão, os animais desse grupo ainda apresentam duração e volume bastante inferiores ao observado nas condições em que a ração palatável está presente. Uma vez que observamos esta variedade de comportamentos em resposta à presença da ração, como saber com qual destas respostas a atividade Fos eventualmente estaria relacionada?

Nossos dados indicam que na presença da ração palatável os animais dedicam os primeiros 30 a 40 minutos após a apresentação do alimento aos comportamentos ingestivos (com predomínio do comportamento de comer, que é interrompido por poucos e breves episódios do comportamento de beber). O pico de ingestão ocorre na metade do tempo total dedicado a este comportamento, entre 90 e 120 min antes do sacrifício dos animais. Por outro lado, os períodos de saciedade associados a vigília ou ao sono pós-prandial, apresentam seus picos distantes do pico ingestivo por um intervalo não menor do que 60 minutos. Isso garante uma boa margem de tempo para relacionarmos a marcação Fos+ ao comportamento ingestivo, em especial ao período prévio à saciação, processo que gradualmente atenua e interrompe a refeição. Com base nos dados obtidos em experimentos anteriores (SPUDEIT et al., 2013, submetido) observou-se que a Sequência Comportamental de Saciedade pode ser desencadeada nestes animais com protocolos de curto tempo de privação alimentar prévia, já que somente a presença da ração palatável resulta em aumento considerável da ingestão. A decisão por manter uma privação de 1 hora antes do início do experimento teve como objetivo evitar que os animais tivessem, eventualmente, passado por um período de intensa ingestão nesta 1 hora precedente, o que poderia mascarar o real resultado da presença da ração palatável na quantidade ingerida. Isto seria possível visto que o experimento é realizado, propositalmente, num período natural de intensa ingestão nestes animais.

Para investigação do trânsito e esvaziamento gástrico, além das condições de enchimento do trato gastrointestinal superior (TGIS) em períodos de jejum e saciedade destes animais, o conteúdo do TGIS foi separado em porções contidas no ingluvío (papo), proventrículo (estômago glandular) e ventrículo (moela). Este procedimento teve como objetivo demonstrar o estado do TGI em diferentes situações de alimentação, e foi realizado em quatro regimes experimentais diferentes. O grupo TGI- palatável, que recebeu um grande estímulo

para ingestão e apresentou um comportamento ingestivo intenso e duradouro, o conteúdo médio existente no inglúvio encontra-se, em média, pelo menos seis vezes maior do que nas outras condições experimentais. Outro fator relevante, é que o conteúdo encontrado no inglúvio dos animais desse grupo experimental limita-se quase que exclusivamente à ração palatável, e esta não foi encontrada no momento do sacrifício nas porções inferiores do TGIS desses animais. Estando todo o conteúdo ingerido ainda contido no inglúvio, pode-se sugerir que a digestão química, ou mecânica, ainda não tenha sido iniciado até esse momento, já que essa primeira porção do TGIS tem função principal de apenas armazenar e umidificar o alimento. Também podemos considerar que os sinais de saciedade possam ser emitidos principalmente por mecanorreceptores e quimiorreceptores encontrados no inglúvio.

Os sinais gerados pelo trato gastrointestinal (TGI) durante as refeições interagem com o sistema nervoso central, criando uma sensação de saciedade. Apesar de diversas enzimas, hormônios e outros fatores serem secretados pelo TGI em resposta ao alimento no lúmen, apenas alguns são capazes de influenciar diretamente a ingestão de alimentos (DAVIS e SMITH, 1990; WOODS, 2004). Entre os chamados sinais de saciedade, o CCK (colecistoquinina) é o mais investigado. A administração exógena de CCK ou outros sinais de saciedade provoca redução do tamanho das refeições consumidas em animais e humanos, enquanto que o bloqueio da ação da CCK endógena, ou de outros sinais de saciedade, leva ao aumento do volume das refeições (DAVIS e SMITH, 1990; RUSHING e GIBBS, 1998; WOODS, 2004). Uma questão importante é saber se esses mesmos sinais têm um papel na iniciação da alimentação. Se assim for, a atividade tônica endógena poderia estar estimulando continuamente a ingestão alimentar, e os sinais gerados pela alimentação e processamento dos alimentos poderia agir como um “freio”, que é ativado principalmente durante as refeições (RUSHING e GIBBS, 1998; RUSHING et al., 1998).

Como o alimento interage com a mucosa do estômago e do intestino, essa complexa matriz de peptídeos e outros sinais são secretados. Alguns desses entram no lúmen para interagir diretamente com o alimento, outros são liberados para o fluido intersticial local para influenciar as células vizinhas de forma parácrina, e outros ainda atuam na corrente sanguínea, como os hormônios, para influenciar órgãos-alvo

mais distantes, tais como o fígado, o pâncreas ou o cérebro. Estes sinais garantem coletivamente que a combinação adequada de enzimas e outros fatores sejam adicionados ao alimento ingerido, e que passem ao longo do TGI na velocidade apropriada. Alguns ainda fornecem informações para o sistema nervoso central, atuando assim como sinais de saciedade (DAVIS e SMITH, 1990; RUSHING e GIBBS, 1998; WOODS, 2004).

Durante o período experimental, quando os animais começam a realizar os comportamentos relacionados à saciedade, como o sono pós-prandial, essa ocasião coincide aproximadamente com o momento destinado ao sacrifício. Isso também explica o fato de os animais que apresentam ingestão intensa apresentarem uma menor duração para os comportamentos relacionados ao repouso nas análises realizadas, em comparação aos outros dois grupos. O fato é que como esses animais dependem muito do tempo experimental comendo, a duração do repouso, com isso, torna-se pequena, pois este comportamento é inevitavelmente interrompido pelo término do período experimental (de 90 minutos), e subsequentemente pela perfusão e sacrifício dos animais.

Os tempos de sacrifício foram estimados a partir das curvas e dos picos de imunoreatividade à Fos em núcleos hipotalâmicos após administração de salina hipertônica em ratos (SHARP ET AL., 1991). Nesse estudo, a expressão da Fos começou a ser detectada a partir de 30 minutos, e uma quantidade substancial dessa proteína foi observada 60 minutos após o estímulo. O pico da expressão Fos, porém, ocorreu em torno de 120 minutos após a administração de salina hipertônica, e entre 4–8 horas após, a resposta já havia praticamente desaparecido, estando completamente ausente após 8–24 horas (SHARP ET AL., 1991). Em outros grupos de experimentos também realizados em mamíferos, a imunoreatividade à proteína Fos mostrou-se aumentada nas 3 horas subsequentes ao tratamento, demonstrando também um pico de atividade na segunda hora (BOSWELL e LI, 1998; BURMEISTER ET AL., 2008). Isto sugere que a atividade Fos devida a eventos separados entre si por um mínimo de 60 minutos poderia ser discriminada por protocolos como o aqui realizado. No entanto, não pode ser excluída a possibilidade de que alguma atividade Fos observada nos animais possa estar relacionada a eventos ocorrendo entre 30 e 90 minutos antes do sacrifício. Nem todas as mudanças na expressão da Fos que observamos podem ser relacionadas à ingestão de alimentos, e poderia representar

atividades relacionadas a outros fenômenos. Além disto, vemos e registramos a ingestão que predomina externamente, mas outros processos concomitantes a ela estão ocorrendo. A falta de correlação com a ingestão pode apontar para outros processos, durante o evento ingestivo (atenção, vigilância, etc). Em experimentos realizados por D' HONDT et al (1999), foi descrita a preparação de um anticorpo dirigido contra um fragmento sintético do produto protéico do gene *c-fos* em galinha (*Gallus domesticus*). Nesses experimentos, foi demonstrado que este anticorpo pode ser utilizado em várias espécies aviárias para estudar a expressão da Fos induzida por uma variedade de estímulos farmacológicos, fisiológicos e comportamentais. Estudos realizados por métodos de Western blot indicaram que este anticorpo reconhece uma proteína do tamanho esperado (47 kDa), mas também reage, em certa medida, com as proteínas de peso molecular mais baixo que partilham homologia de sequência com a Fos. Técnicas de imunistoquímica para Fos foram realizadas com este anticorpo, em quatro espécies de aves, em três diferentes laboratórios, e utilizando diversas variantes no processo imunocitoquímico. Em todos os casos, o anticorpo forneceu uma identificação confiável dos antígenos Fos. O anticorpo descrito nesse estudo parece ser adequado para mapear a atividade encefálica em animais, através da expressão da Fos em diferentes espécies de aves e diferentes situações (D' HONDT et al., 1999).

É interessante notar que os comportamentos ingestivos (comer e beber) acontecem alternadamente e com frequências muito próximas, embora haja uma predominância significativa do comportamento de comer. Os períodos de pico desses comportamentos também aparecem com distâncias temporais muito pequenas para que a avaliação da marcação da proteína Fos pudesse ser analisada separadamente entre esses dois comportamentos. Embora a ativação neuronal analisada contemple o acontecimento dos dois comportamentos, evidências sugerem que as diferenças encontradas na marcação Fos+ estejam relacionadas ao comportamento de comer, e não de beber. Nossos dados sugerem que entre os dois grupos que tiveram acesso à alimentação, não foram observadas diferenças no volume ingerido de água. Além do volume, também não encontramos diferenças na duração, latência e frequência do comportamento de beber entre os grupos. Já com relação ao comportamento de comer, com a presença da ração palatável, os animais apresentam um volume ingerido até quatro vezes maior, com relação à linha de base. Além disso, também são observadas mudanças

nesse comportamento com relação à duração, latência e frequência. Sendo assim, as diferenças na expressão Fos+ estão mais provavelmente relacionadas ao evento que apresenta diferenças significantes entre os dois grupos, que é o comportamento de comer.

Um fator que pode acarretar mudanças na distribuição da marcação Fos em distritos do tronco encefálico, como a PAG em mamíferos, é o estresse, que pode ser causado por inúmeros desencadeadores (LINO-DE-OLIVEIRA ET AL., 2006; LINO-DE-OLIVEIRA ET AL., 2001; BELLCHAMBERS ET AL., 1998). Em mamíferos, a PAG é considerada parte de um sistema motor emocional, envolvida na integração cardiovascular, movimentos angulares da cabeça, dilatação das pupilas, estratégias emocionais de enfrentamento e cópula, e comportamentos de defesa e alerta (DEN BOER-VISSER e DUBBELDAM, 2002; HOLSTEGE ET AL., 1992). Estudos realizados em roedores indicam que o estresse de contenção, causado por testes de nado forçado, pode levar a um aumento na atividade neuronal da PAG, quantificada por imunorreatividade à Fos. Nesses estudos, o tratamento prévio com antidepressivos levou à redução da atividade Fos em todas as porções da PAG, demonstrando que essas drogas podem atenuar alterações comportamentais induzidas pelo estresse (LINO-DE-OLIVEIRA ET AL., 2006; LINO-DE-OLIVEIRA ET AL., 2001). Além disso, tanto a apresentação de comida, como uma forma de prazer (STEFANO et al, 2008), quanto a supressão de comida, podem representar estímulos estressores, seja em mamíferos (TANNOCK e SMITH, 1972; WALLACE, 1976; PARYLAK et al, 2011) ou em aves (WODZICKA-TOMASZEWSKA et al, 1982).

O *nucleus intercollicularis* (ICo) e a *substantia grisea centralis* (GCt) de aves, localizados a partir do mesencéfalo e seguindo caudalmente até a ponte, são comparáveis à substância cinzenta periaquedutal (PAG) de mamíferos, apesar de não ser vista com a mesma configuração anatômica (DEN BOER-VISSER e DUBBELDAM, 2002; KINGSBURY, 2011; ADKINS-REGAN, 1996; ANDREW, 1974; WILD, 1997). Em ambas, a estimulação elétrica provoca reações de defesa (WILD, 2012; JAHNKE, 1982; HALLER, 2006). Em aves submetidas à situações de estresse, ocorre um aumento na ativação neuronal dessas regiões, assim como ocorre na PAG de mamíferos submetidos ao estresse (GOODSON, 2009; HALLER, 2006; COMOLI, 2003; MOREIRA, 2008). Estudos realizados em diversas

espécies de aves, como codornas (*Coturnix coturnix*), aves canoras e papagaios, tentilhões (*Fringilla coelebs*), pombos (*Columba livia*) e galinhas (*Gallus domesticus*), sugerem que essas duas estruturas, também interferiram em funções como comportamento reprodutivo (ADKINS-REGAN, 1996), vocalização (WILD, 1997) funções cardiovasculares, respiratórias, e comportamentos de ataque, defesa e alerta (ANDREW, 1974; KINGSBURY, 2011; WILD, 1997).

Em nossas análises, verificamos marcação semelhante em todos os grupos experimentais no ICo e no GCt. O ICo apresenta marcação bastante intensa, já o GCt, exibe uma marcação mais esparsa e em média quantidade. Esses dois núcleos estão diretamente relacionados ao estresse em aves (ANDREW, 1974; ADKINS-REGAN, 1996). Estudos realizados em galinhas (*Gallus domesticus*) demonstram que lesões no ICo provocam redução dos comportamentos de ataque e defesa em situações de estresse pela presença de objetos estranhos (ANDREW, 1974). O fato de essas regiões apresentarem marcação Fos+ semelhante entre os grupos torna menos provável que as alterações na marcação Fos+ em outras regiões possam ser atribuídas à estímulos estressores específicos como a privação alimentar ou a apresentação de uma comida palatável. Assim, estando a marcação de atividade da proteína Fos nessas regiões com igual distribuição em todos os grupos, nossos dados sugerem que fatores possivelmente estressores, como as condições e manipulações laboratoriais, não se destacam em nenhum grupo experimental.

Para a avaliação inicial da expressão Fos, todas as regiões pontinas e mesencefálicas do tronco encefálico que apresentavam qualquer quantidade de células Fos+ foram analisadas qualitativamente (tabela 2). Entre todas essas regiões, foram escolhidas para contagens e análises estatísticas as que pareciam apresentar, pela análise qualitativa, alguma diferença entre os grupos. Em uma análise geral da expressão da proteína Fos em todos os núcleos, observamos que o grupo Controle mantém uma ativação neuronal consistentemente moderada e estável. Já no grupo Ingestão observamos uma redução geral na atividade dos neurônios localizados nesses núcleos, e diferenças entre este e o grupo Controle aparecem em quase todas as regiões analisadas. O grupo Privação foi o que menos apresentou diferenças em comparação ao grupo Controle. Isso indica que na maioria dos casos estudados, a privação alimentar por uma hora não afeta de forma importante a atividade dos núcleos do tronco cerebral investigados aqui.

Em diversas das regiões analisadas foram observadas diferenças na densidade de marcação entre os grupos experimentais, como é o caso do núcleo parabraquial (PBN), especialmente em sua porção dorsomedial (PBdm). O PBN foi identificado em roedores como um “centro do sabor” em 1971 (NORGREN e LEONARD, 1971). Em uma combinação de procedimentos eletrofisiológicos e anatômicos, a partir da porção anterior do núcleo do trato solitário (NTS), foram rastreadas projeções para o PBN, estrutura que até então não era vinculada à ingestão alimentar (NORGREN e LEONARD, 1971). Esses estudos indicam que, em roedores, o NTS não tem apenas projeções que vão diretamente para o tálamo. Invés disso, essa projeções partem para áreas celulares que circundam o *brachium conjunctivum* (BC), na ponte. Essas regiões, que por sua vez compõem o núcleo PBN, então projetam-se bilateralmente para o tálamo, em regiões que são excitadas por estímulos gustativos. A descoberta de projeções do PBN para o tálamo e prosencéfalo ventral, que evidenciaram sinalizações de informações sensoriais e hedônicas, respectivamente, conferiram ao PBN um importante papel relacionado à alimentação (NORGREN e LEONARD, 1971; SCOTT e SMALL, 2009). A partir dessas descobertas, e em vários estudos subsequentes, este núcleo foi amplamente relacionado com paladar, sensações viscerais, hedonismo e aversões alimentares em mamíferos (LIN *et al.*, 2012; NORGREN e LEONARD, 1971; SCAFLANI *et al.*, 2001; SÖDERPALM e BERRIDGE, 2000).

Com relação ao PBN em aves, pouco se sabe sobre suas atribuições funcionais. Porém, estudos que revelam as projeções ascendentes e descendentes desse núcleo, descritas acima, auxiliam no entendimento de suas funções, pelas semelhanças nas projeções observadas em mamíferos (ARENDS ET AL., 1988; MITCHELL *et al.*, 1993; WILD *et al.*, 1990). Investigações realizadas em pombos (*Columba livia*) revelaram uma segregação funcional de projeções do núcleo do trato solitário (NTS) para o PBN. Subnúcleos do NTS relacionados à funções gustatórias e gastrointestinais projetam principalmente para porções dorsais e mediais do PBN, ou seja, PBdm. Já subnúcleos do NTS relacionados à funções cardiovasculares e respiratórias, enviam suas projeções, em sua maioria, para porções ventrolaterais do PBN (PBvl) (ARENDS *et al.*, 1988; WILD *et al.*, 1990). Foi observado também que o núcleo PBvl, assim como o bulbo ventrolateral, o núcleo ambíguo e o ICo, recebe projeções do NTS provenientes dos pulmões (WILD e ARENDS, 1987). Nesse núcleo,

PBvl, que está bastante envolvido com a integração de funções cardiovasculares, respiratórias e controle da vocalização, não foram observadas diferenças entre os grupos estudados no presente trabalho sugerindo que essas funções podem estar estáveis em todos os animais dos diferentes grupos.

A palatabilidade dos alimentos e o seu valor hedônico desempenham papéis centrais na ingestão de nutrientes. Estudos mostram que os efeitos na ativação neuronal após administração de uma comida calórica ocorrem principalmente devido a sua palatabilidade, acarretando em efeitos peri e pós-prandiais. No entanto, os efeitos pós-prandiais podem influenciar as preferências alimentares independentemente de palatabilidade, embora as bases neurobiológicas de tais mecanismos permaneçam pouco compreendidos. (ARAÚJO et al., 2008; SCAFLANI, 2001) Um estudo de LI et al (2012) analisou a expressão da proteína Fos em ratos obesos, 120 minutos após a ingestão de dieta rica em sacarose. Os resultados desse estudo demonstraram aumento da expressão da proteína Fos em neurônios da amígdala, e redução dessa expressão em neurônios do PBN. Os pesquisadores atribuíram à amígdala maiores relações com respostas excitatórias hedônicas comportamentais e emocionais, e ao PBN características de um centro do paladar sensível a efeitos pós-ingestivos com respostas inibitórias (LI et al., 2012). Nossos dados demonstram que a densidade de células FOS+ no núcleo PBdm apresentou diferenças, sendo inferior no grupo que ingeriu a ração palatável, em relação ao grupo Controle, apoiando os achados do estudo relatado acima. Em resumo, nossos dados confirmam a literatura neuroanatômica disponível em aves, reforçando a noção da relevância do PBdm em fenômenos relacionados à ingestão de alimentos em aves. Em vista das similaridades acima apontadas entre o papel desta região em aves e mamíferos, nossos dados sugerem que essas atribuições funcionais estão similarmente conservadas nessas duas espécies.

Com relação aos procedimentos de imunistoquímica para dupla marcação (FOS+/TPH+ e FOS+/TH+), foi observada uma relação entre núcleos que contêm neurônios serotoninérgicos e/ou catecolaminérgicos e os comportamentos ingestivos. A ativação ou inibição desses grupos de neurônios variou conforme a região e o protocolo ingestivo ao qual o animal foi submetido. Apesar de terem sido encontradas diferenças significantes entre os grupos experimentais nos casos de neurônios serotoninérgicos e/ou catecolaminérgicos ativos, essas duplas marcações

aparecem sempre em número bastante pequeno. Quando comparamos a população total existente de células serotoninérgicas e/ou catecolaminérgicas nesses núcleos, os casos desses neurônios ativos em qualquer uma das três situações, parece ser pouco significativa. Ou seja, a grande maioria da população de neurônios serotoninérgico e/ou catecolaminérgicos encontrada nessas regiões não é afetada pelo protocolos relacionados à ingestão aqui realizados. Apesar disso, em diversos desses núcleos a densidade de expressão Fos varia significativamente, em números proporcionalmente muito maiores. Isso sugere que na fase de pré-saciação em que se encontram os animais do grupo Ingestão, outros grupos neuronais, que não serotoninérgicos ou catecolaminérgicos, estejam fortemente envolvidos.

Os achados com maior relevância nos casos Fos+ ou de dupla marcação Fos+/TPH+ e Fos+/TH+, foram observados nos núcleos: A6, A8, Scd, LC, CS, Anl, e Rp. No atlas estereotáxico de pombos (KARTEN e HODOS, 1967), o *locus ceruleus* (LoC) foi identificado como um grande campo neuronal que se estende da ponte rostral ao mesencéfalo caudal. O LoC em mamíferos é um núcleo densamente preenchido por células, contendo neurônios ricos em noradrenalina, restrito à níveis rostrais da ponte, sem se estender ao mesencéfalo (SMEETS e REINER, 1994). Técnicas imunoistoquímicas aplicadas em diversas espécies de aves vêm demonstrando que apenas a porção caudal do que é chamado no atlas de Karten e Hodos como LoC, contém neurônios noradrenérgicos, e se encontra na mesma localização topográfica que o LoC em mamíferos (BAILHACHE e BALTHAZART, 1993; REINER et al., 1994). Assim, o LoC em aves foi redefinido como um conjunto de células noradrenérgicas na borda lateral do quarto ventrículo em níveis pontinos rostrais (REINER et al., 2004). O núcleo A6, conhecido como *caudal locus ceruleus*, não corresponde exclusivamente às definições citoarquitetônicas do LoC, já que os neurônios noradrenérgicos dessa região se estendem ventral e rostralmente ao LoC, e nas proximidades de neurônios serotoninérgicos e catecolaminérgicos, que acabam se sobrepondo parcialmente uns com os outros (MEDINA e REINER, 1994; REINER et al., 2005). No entanto, o núcleo A6 coincide amplamente com o LoC, e os neurônios noradrenérgicos representam a população predominante no LoC.

O grupo celular identificado em aves por KARTEN e HODOS (1967) como *rostral locus ceruleus*, corresponde atualmente ao grupo

celular dopaminérgico mesencefálico A8 (REINER et al., 2004). A alteração de nomenclatura desse núcleo se deu por sua localização topograficamente equivalente ao A8 de mamíferos, apesar de suas características funcionais estarem mais condizentes com o Locus Ceruleus dessa classe animal. No núcleo A8 a densidade de marcação Fos+ encontrada foi muito intensa no grupo Controle e no grupo Privação, reduzindo para uma quantidade moderada no grupo Ingestão. Isso demonstra que uma acentuada ingestão de alimentos provoca redução na atividade geral desse núcleo. Com resultados semelhantes aos observados no núcleo A8, no núcleo A6 a quantidade de células Fos+ é intensa no grupo Privação, e moderada nos grupos Controle e Ingestão. Os resultados observados nos dois núcleos, A6 e A8, sugerem que a privação alimentar pode levar a ativação de neurônios dessas regiões.

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram, por métodos imunistoquímicos cromogênicos e fluorescentes para TPH e 5-HT, a existência de um grande número de células serotoninérgicas nos núcleos A6 e A8 de pombos, com pericários poligonais e de tamanho médio (MENEGHELLI et al, 2009), apoiando os dados encontrados no presente estudo por métodos de imunistoquímica cromogênica para TPH. Com relação à dupla marcação Fos+/TPH+ nos núcleos A6 e A8, observamos uma quantidade maior de células serotoninérgicas ativas no grupo Controle, em comparação aos outros dois grupos.

Porém, essa diferença, apesar de significativa, não parece ser significativa, já que nos três grupos analisados, os casos dessa dupla marcação são muito pequenos se comparados ao número total de células TPH+. Dados anteriores do nosso laboratório avaliaram os efeitos de injeções de 8-OH-DPAT (um agonista seletivo do receptor 5-HT<sub>1A</sub>) na região do núcleo A8 em pombos adultos. Os dados desse estudo não evidenciaram alterações no consumo ou nos padrões comportamentais de ingestão de comida ou água nesses animais, demonstrando que os neurônios serotoninérgicos desse núcleo que apresentam receptores 5-HT<sub>1A</sub> parecem não participar do controle ingestivo (HACKL et al., 2005). Esses achados sustentam os dados encontrados no presente estudo, em que a intensa ingestão alimentar parece não afetar a atividade dos neurônios serotoninérgicos desse núcleo. O grupo Controle foi o que apresentou um maior número de células serotoninérgicas ativas, tanto em comparação ao grupo que ingeriu grande quantidade de alimento, quanto em comparação ao grupo que permaneceu em privação

alimentar, ou seja, duas situações completamente opostas. Podemos sugerir então que alguns neurônios serotonérgicos dessa região apresentem uma atividade tônica em condições alimentares habituais, em que os animais têm comida e água *ad libitum* e nenhum estímulo que possa aumentar a ingestão alimentar. Podemos observar que em situações que fogem da linha de base ingestiva desses animais, ocorre uma redução dessa atividade tônica, indiferentemente de a situação experimental levar ao aumento ou redução da ingestão. A redução de atividade observada não parece estar relacionada a mecanismos de alerta, já que parte dos animais do grupo Privação apresentaram comportamentos relacionados ao sono no período inicial do experimento. Também não podemos atribuir esse fato à entrada do pesquisador no biotério no início dos experimentos, já que os animais do grupo Controle também eram submetidos a essa condição. Alternativamente, é possível que estas reduções ocorram em subpopulações diferentes de neurônios serotonérgicos, alguns relacionados à ingestão e outros relacionados à falta dela. Nossos métodos não permitem avaliar se esse caso realmente ocorre, mas é necessário propor esta possibilidade.

Além de neurônios serotonérgicos, estudos realizados nos últimos 15 anos, em diversas espécies de aves, demonstraram a presença de células catecolaminérgicas no núcleo A8. Esses estudos estabelecem que tais neurônios catecolaminérgicos são, em sua maioria, dopaminérgicos, e em menor quantidade noradrenérgicos (BAILHACHE and BALTHAZART, 1993; REINER *et al.*, 2004). Nos últimos anos, nosso laboratório tem analisado o papel de circuitos monoaminérgicos no controle da ingestão em aves (CANELLO *et al.*, 1993; DARIO *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 1996; HAGEMANN *et al.*, 1998, MARINO-NETO e ARMENGOL, 2000; SABI *et al.*, 2002; MARINO-NETO *et al.*, 2004; RAVAZIO *et al.*, 1990; RAVAZIO e PASCHOALINI, 1991). No presente estudo, com relação à dupla marcação Fos+/TH+ nos núcleos A6 e A8, encontramos uma quantidade reduzida de neurônios catecolaminérgicos ativos no grupo Ingestão, em relação aos outros dois grupos. Este fato sugere que a intensa ingestão alimentar, vista no grupo Ingestão, pode reduzir a atividade de neurônios catecolaminérgicos dessa região. Como os tipos celulares analisados nesses dois núcleos são semelhantes, podemos sugerir que exerçam funções similares com relação à ingestão alimentar. Estudos realizados por RAVAZIO *et al.* (1990) analisaram os efeitos

comportamentais da administração ICV de 1 microlitro de adrenalina e de noradrenalina (ambas na concentração de 30 nmol/microlitro) no ventrículo lateral de pombos adultos. Nos animais com livre acesso à alimentação no período experimental, as injeções das catecolaminas provocaram um imediato e intenso efeito ingestivo, seguido por aumento na duração do sono (50-90% maior que a duração apresentada pelo animais controle tratados com veículo). RAVAZIO e PASCHOALINI (1992), analisaram os efeitos de injeções ICV de catecolaminas (80nmol/microlitro) sobre o comportamento alimentar. Foi observado nesses experimentos um aumento significativo no consumo de alimentos na primeira hora após a administração de noradrenalina e adrenalina (RAVAZIO e PASCHOALINI, 1992). Com base nos dados do presente estudo, podemos sugerir que os neurônios catecolaminérgicos nos núcleos A6 e A8 não foram afetados pelas injeções de catecolaminas realizadas por RAVAZIO e PASCHOALINI (1992). Esses dados reforçam a noção de que os inputs catecolaminérgicos ao hipotálamo, relevantes para o controle da ingestão de alimentos no pombo, podem ser originados não de núcleos pontinos e mesencefálicos, mas principalmente do NTS e da formação reticular ventrolateral do bulbo (os grupos A2/C2 e A1/C1 respectivamente) (MARINO-NETO e ARMENGOL, 2000).

Estudos realizados em mamíferos de diferentes espécies afirmam que os neurônios catecolaminérgicos do Locus Coeruleus (LoC) estão relacionados a diversas funções, como atenção, memória, ciclos de sono e vigília, controle emocional, postura e neuroplasticidade (BRAUN e PIVIK, 1981; FOOTE *et al.*, 1991; GEORGE *et al.*, 2012). FOOTE *et al* (1991), afirmam que o LoC participa da geração de um estado cerebral generalizado que pode ser caracterizado como "estado de alerta". A estimulação do LoC em mamíferos, por métodos eletrofisiológicos, leva à conversão de padrões de atividade eletroencefalográfica característicos de um estado não-alerta para padrões característicos de um estado de alerta (FOOTE *et al.*, 1991). Além disso, trabalhos realizados com ratos machos demonstram que lesões de neurônios noradrenérgicos do LoC levam a redução da ingestão de alimentos. (AMMAR *et al.*, 2001). As lesões foram causadas por injeção intraperitoneal de uma neurotoxina seletiva para neurônios serotoninérgicos, a DSP-4 (ou N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine). Os ratos lesionados reduziram a ingestão de sacarose, que foi reestabelecida após injeções intraventriculares de noradrenalina (AMMAR *et al.*, 2001).

Estudos realizados por PINOS *et al* (2004) observaram que a nutrição neonatal desempenha um papel fundamental na organização morfológica e funcional de diversas estruturas do tronco encefálico em mamíferos. Foi observado que a privação de alimentos neonatal diminui significativamente o volume e o número de neurônios do *locus coeruleus* em ratos machos e fêmeas. Os dados sugerem que a desnutrição neonatal interfere nos mecanismos neuroendócrinos relacionados ao *locus coeruleus*, demonstrando a relação dessa região com a ingestão de alimentos desde a fase neonatal (PINOS *et al.*, 2004). Outros estudos observaram que a injeção periférica de colecistoquinina (CCK) exógena imita os efeitos de lipídios na ingestão de alimentos e motilidade gástrica via aferentes vagais, e induz a expressão da proteína Fos no *locus ceruleus* (LC), no núcleo do trato solitário (NTS), na área póstrema (AP), e no núcleo paraventricular (PVN). Em ratos acordados, a infusão lipídica intraduodenal aumenta a expressão da proteína Fos nestes núcleos cerebrais. O pré-tratamento com capsaicina reduz o aumento da expressão Fos nos núcleos LC, NTS e PVN em 66-86% e no AP em 46%. Estes achados sugerem que a entrada de lípido para o intestino ativa a expressão da proteína Fos no LC, NTS, PVN e AP (MÖNNIKES *et al.*, 1997). Pouco se sabe sobre os atributos funcionais dos neurônios catecolaminérgicos encontrados no núcleo A8 em aves, porém, pela localização e respostas semelhantes, podemos admitir que tenham função similar à observada nesses neurônios em mamíferos.

Nossos dados relacionados a expressão Fos nos núcleos A6 e A8 podem levar a duas interpretações. Os animais do grupo Ingestão, que absolutamente não estavam dormindo e estavam comendo no momento relacionado à expressão Fos+ observada, apresentam redução da ativação dos neurônios catecolaminérgicos do núcleo A8, embora numa proporção muito pequena em relação à grande quantidade de neurônios catecolaminérgicos encontrados nesse núcleo. Podemos então sugerir que essa pequena parcela de neurônios catecolaminérgicos afetada pelos diferentes protocolos experimentais esteja também relacionada à estado de alerta, já que os animais dos grupos Controle e Privação apresentam um duração total dos comportamentos ativos significativamente maior que o observado no grupo Ingestão. Nossos dados podem levar à interpretação desses dados de duas formas: ou essa parcela dos neurônios catecolaminérgicos do núcleo A8 apresentam diferenças funcionais dos neurônios catecolaminérgicos do LoC de mamíferos (já que o grupo que recebeu a ração palatável foi o que mais comeu, e

apresentou redução da marcação Fos nessa região), ou alguns neurônios envolvidos nos estados de alerta ficam menos ativos quando esses animais estão se alimentando (ai se explica o fato de os animais do grupo Ingestão, que estão comendo, apresentarem redução na ativação desses neurônios). Ou seja, mesmo que não estejam dormindo, o fato de estarem envolvidos com uma atividade (nesse caso, COMER), leva a uma redução na atividade neuronal relacionada aos estados de alerta. Para confirmar essas hipóteses, são necessários outros experimentos que relacionem essa região com outras tarefas além dos comportamentos ingestivos.

Juntamente com o núcleo A8, o núcleo Scd faz parte das estruturas mesencefálicas laterais à linha média. Nesse núcleo também verifica-se uma quantidade moderada e esparsa de neurônios serotoninérgicos (MENEGHELLI et al., 2009) e uma maior quantidade, com distribuição mais condensada, de neurônios catecolaminérgicos (MOONS et al., 1994- Fig 16, Scd). No núcleo Scd observamos uma constante marcação Fos+ de média quantidade nos três grupos experimentais. Isso demonstra que a ativação neuronal geral nesse núcleo permanece constante diante dos diferentes protocolos experimentais. Com relação à dupla marcação Fos+/TPH+ no Scd, o número de casos encontrados é pequeno, também sem apresentar diferenças entre os grupos. Estudos realizados anteriormente em nosso laboratório avaliaram os efeitos de injeções de 8-OH-DPAT (um agonista seletivo do receptor 5-HT<sub>1A</sub>) também na região do núcleo Scd em pombos adultos. Os dados desse estudo não evidenciaram alterações no consumo ou nos padrões comportamentais de ingestão de comida ou água nesses animais, demonstrando que os neurônios serotoninérgicos desse núcleo que apresentam receptores 5-HT<sub>1A</sub> parecem não participar do controle ingestivo (HACKL et al., 2005). Esses achados sustentam os dados encontrados no presente estudo, em que a intensa ingestão alimentar parece não afetar a atividade dos neurônios serotoninérgicos desse núcleo.

Já com relação à dupla marcação Fos+/TH+ no Scd, o grupo Controle aparece com um maior número dessa marcação, em comparação aos grupos Palatável e Privação. Apesar de o número de neurônios catecolaminérgicos ativos, em qualquer um dos grupos, ser pequena em relação à grande quantidade de células TH+ igualmente encontradas nos três casos experimentais, podemos sugerir que a intensa ingestão alimentar provoca uma inibição das células catecolaminérgicas

que encontram-se ativas nos dois grupos em que a ingestão alimentar foi ausente ou mantida em sua linha de base. Nesse núcleo, assim como no A8, a maior parte das células catecolaminérgicas são noradrenérgicas (MOONS et al., 1994).

Na região da linha média pontomesencefálica, imediatamente ventrocaudal às fibras da decussação do pedúnculo cerebelar superior (o núcleo da decussação do brachium conjunctivum, ou nDBC), aparece uma densa população de células constituindo dois cordões paralelos, alinhados ao longo da linha média, formando o núcleo *Linearis caudalis* (LC). Nesse núcleo, observamos uma pequena quantidade de células Fos+ em todos os grupos experimentais, sem apresentar diferença entre eles. Ocupando a região paramediana entre o LC e limitado lateralmente pelas fibras do *Brachium conjunctivum descendens* (BCD) está o *nucleus centralis superioris* (CS). No núcleo CS um intenso número de células Fos+ foi observado no grupo Controle, reduzindo para quantidades moderadas nos outros dois grupos. Podemos sugerir, nesse caso, que a ativação desse núcleo ocorra de forma tônica contínua, e que em alterações do estado considerado habitual, ocorra inibição dessa região. Dorsalmente à zona que circunda o *nucleus Interpeduncularis*, surge um denso grupo de células ocupando o *nucleus Annularis* (AnI), imediatamente ventral ao n. oculomotor e ao fascículo longitudinal medial, e espalhadas ao longo da linha média, entre as fibras da decussação do pedúnculo cerebelar superior. No núcleo AnI a quantidade de marcação Fos+ observada foi de média quantidade nos grupos Controle e Privação, e pequena no grupo Ingestão. Nessas três regiões, LC, CS e AnI, coletivamente chamadas de estruturas da linha média pontomesencefálica, são encontrados neurônios serotonérgicos e, em menor número, neurônios catecolaminérgicos, além de outros possíveis tipos celulares ainda não identificados. (MENEGHELLI et al., 2009; KNIGGE e PIEKUT, 1984).

No núcleo LC não observamos nenhuma ocorrência de dupla marcação Fos+/TPH+ nos grupos Controle e Ingestão, ao contrário do grupo Privação, que apresenta um número significativamente maior dessa marcação. Nos núcleos CS e AnI o número de células serotonérgicas ativas também foi inferior no grupo Ingestão, com relação aos outros dois grupos. De acordo com HACKL et al (2005), injeções de 8-OH-DPAT em estruturas da linha média pontomesencefálica de pombos adultos (*Columba livia*) provocam

efeito dipsogênico e alterações comportamentais no padrão de ingestão hídrica, mas não na ingestão de alimento. As diferentes doses (0,6; 2,0 e 6,2 nmol) de 8-OH-DPAT foram efetivas em provocar um aumento significativo no consumo de água, além de provocar alterações na latência, frequência e duração desse comportamento (HACKL et al., 2005). Das estruturas da linha média analisadas no referido estudo (LC, CS, Anl, nDBC), os locais mais sensíveis à administração da droga foram os núcleos *linearis caudalis* e *centralis superior* (HACKL et al., 2005). Podemos sugerir com esses dados que os efeitos dipsogênicos do 8-OH-DPAT na rafe não estejam associados à ativação de autorreceptores em neurônios serotonérgicos, mas sim da ação desta droga em receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados em células da rafe que usam outros neurotransmissores. O 8-OH-DPAT, ao ativar receptores 5HT<sub>1A</sub>, inibe células serotonérgicas e não-serotonérgicas na rafe. Então, encontrar um maior número de neurônios serotonérgicos ativos em animais que não estão comendo é coerente com a idéia de que estes neurônios serotonérgicos estejam envolvidos com a inibição da ingestão de alimentos. Os achados de HACKL et al (2005) sugerem que estes neurônios (os serotonérgicos envolvidos com ingestão de comida) não tenham sido afetados pelo 8-OH-DPAT, mas que os neurônios serotonérgicos envolvidos com a ingestão de água tenham sido sensíveis à droga.

DOS SANTOS et al (2011), após administrar 5-HT intracerebroventricular em pombos adultos (*Columba livia*) em doses de 50, 150 e 300 nmol, observou alterações na ativação neuronal de neurônios serotonérgicos e não-serotonérgicos dessa região. No LC, um dos locais mais sensíveis ao efeito dipsogênico do 8-OH-DPAT (HÄCKL et al., 2005) as marcações Fos+ e Fos+/TPH+ foram reduzidas no grupo de animais tratado com 5-HT, porém impedido de beber, e foram negativamente correlacionados com a ingestão de água e com os comportamentos típicos de sono (dos SANTOS et al., 2011). O estudo afirma que essa diminuição na atividade parece acontecer principalmente em neurônios serotonérgicos deste núcleo, e estar relacionada à ausência da ingestão hídrica nesta situação, sendo possível que a “sede” induzida pelas injeções de 5-HT esteja associada à redução na atividade de neurônios serotonérgicos do LC (dos SANTOS et al., 2011). Podemos então sugerir que os neurônios serotonérgicos dessa região possam estar mais fortemente relacionados ao comportamento de beber, e que diferentes grupos de neurônios serotonérgicos distribuídos

no tronco encefálico desses animais possam estar envolvidos com diferentes aspectos do comportamento alimentar.

Com relação à dupla marcação Fos+/TH+ nos núcleos LC E CS, apesar da pequena quantidade de células TH+ encontradas em todos os grupos experimentais, o grupo Ingestão apresentou um maior número de casos, com relação aos outros dois grupos, que apresentaram nenhum ou raros casos dessa marcação. Esse resultado indica que as células catecolaminérgicas encontradas nessas estruturas da linha média estejam envolvidas no controle alimentar, e que a intensa ingestão de alimentos leva a uma ativação nos neurônios catecolaminérgicos dessa região. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório analisaram os efeitos comportamentais da administração ICV de 1 microlitro de adrenalina e de noradrenalina (ambas na concentração de 30 nmol/microlitro) no ventrículo lateral de pombos adultos (RAVAZIO et al., 1990). Nos animais com livre acesso à alimentação no período experimental, as injeções das catecolaminas provocaram um imediato e intenso efeito ingestivo, seguido por aumento na duração do sono (50-90% maior que a duração apresentada pelo animais controle tratados com veículo). RAVAZIO e PASCHOALINI (1992), também analisaram os efeitos de injeções ICV de catecolaminas (80nmol/microlitro) sobre o comportamento alimentar. Foi observado nesses experimentos um aumento significativo no consumo de alimentos na primeira hora após a administração de noradrenalina e adrenalina (RAVAZIO e PASCHOALINI, 1992). A noradrenalina também causou uma redução na ingestão alimentar durante a segunda hora após a administração, assim como a dopamina, que também levou à redução da ingestão alimentar na segunda e terceira hora pós-injeção (RAVAZIO e PASCHOALINI, 1992). A ingestão total de alimentos para o período de 6 horas foi semelhante entre os grupos experimentais e o grupo controle. Além disso, o consumo de água não foi afetado pela administração de nenhuma das catecolaminas durante algum período específico, mas a ingestão total aumentou com a injeção de noradrenalina. Estes resultados sugerem que as catecolaminas estejam envolvidas no controle neural do consumo de comida, mas não de água, nesses animais (RAVAZIO e PASCHOALINI, 1992). Nossos dados, que evidenciam aumento na atividade das células catecolaminérgicas nos animais que apresentaram intensa ingestão alimentar, sugerem que essas células poderiam contribuir para o efeito ingestivo observado após a administração ICV de catecolaminas nos estudos descritos acima.

Estudos realizados previamente em nosso laboratório demonstram que neurônios imunorreativos à TPH foram observados em agrupamentos localizados na linha média, na região coletivamente denominada de rafe (MENEGHELLI, 2009). Grande quantidade de processos e varicosidades densamente imunorreativas à TPH são observadas em todo o complexo da rafe. Além disso, nessa região, o padrão distribucional de pericários imunorreativos à serotonina (5-HT) é comparável com a distribuição de pericários imunorreativos à TPH (MENEGHELLI, 2009).

Os resultados do presente estudo demonstram que, no núcleo Rp (*Raphe pontis*) tanto o número de células Fos+ quanto o número de células serotoninérgicas ativas foi superior no grupo Privação. Esse resultado sugere que com a alimentação (intensa ou em valores basais) alguns neurônios serotoninérgicos e outros não serotoninérgicos dessa região ficam inibidos. Podemos sugerir ainda que a inibição prévia desses neurônios é o fator que pode estar levando esses animais à alimentação. Estudos anteriores do nosso laboratório, avaliando o efeito dispogênico da serotonina (Dos SANTOS, et al., 2011) demonstraram que no núcleo Rp, a densidade de células Fos+ aumentou após injeções de 5-HT, independente de os animais beberem ou não após as injeções, e a densidade deste tipo de marcação foi positivamente correlacionada com os índices de sono. Além disso, as injeções de 5-HT induziram sono intenso em ambos os grupos de animais, mas falharam em afetar a expressão Fos em neurônios serotoninérgicos deste núcleo, sugerindo assim, que a ativação induzida pela 5-HT em neurônios não-serotoninérgicos neste núcleo pode estar associada ao sono observado nestes animais (dos SANTOS et al., 2010).

Estudos realizados em mamíferos nas últimas décadas demonstram o envolvimento do sistema serotoninérgico presente na rafe com a regulação do comportamento alimentar (BENDOTTI e SAMANIN, 1986; CURRIE e COSCINA, 1993; TAKASE e NOGUEIRA, 2008). TAKASE e NOGUEIRA (2008) analisaram a expressão da proteína Fos nos núcleos da Rafe de ratos Wistar machos, em diferentes fases do comportamento alimentar. O estudo contou com cinco grupos experimentais, relacionando a marcação Fos+ com os estados de privação alimentar, procura pelo alimento, ingestão, saciedade, além de um controle com alimentação *ad libitum*. Analisando quatro núcleos da Rafe rostral e três núcleos da Rafe ventral, TAKASE e NOGUEIRA observaram, para sua surpresa, que em uma média geral

entre os núcleos da Rafe analisados, o grupo que apresentou o maior número de células Fos+ foi o que não teve estímulo ingestivo, ou seja, o grupo que permaneceu em restrição alimentar. Investigando cada núcleo separadamente, foi observado que os núcleos mais atingidos pela restrição alimentar foram o pontino, o mediano, o magno e o obscuro. Outros autores atribuem esse fato à atividade antecipatória do comportamento alimentar, ou expectativa, como um mecanismo adaptativo para otimizar o consumo de alimentos em animais com alimentação restrita (MARQUES e MENNA-BARRETO, 1997; TAKASE et al., 2000). Esses dados confirmam os resultados encontrados em nosso estudo, já que no núcleo analisado, Rp, tanto o número de células Fos+ quanto o número de células serotoninérgicas ativas foi superior no grupo que permanece em privação alimentar. Esse resultado pode evidenciar uma provável relação funcional entre os núcleos da rafe encontrados em mamíferos e em aves.

Já após a ingestão alimentar, de acordo com TAKASE e NOGUEIRA (2008) os núcleos linear e dorsal foram os que apresentaram o maior número de células Fos+, em comparação aos outros grupos experimentais. O núcleo pálido, por sua vez, aparece com a maior ativação neuronal no grupo relacionado ao momento da saciedade. Os autores confirmaram a hipótese do estudo, de que existe uma diferencial ativação dos neurônios nos diferentes núcleos da Rafe durante diferentes fases do comportamento alimentar. Ou seja, esses resultados sugerem um recrutamento diferenciado para cada fase, em núcleos determinados, e não uma ativação ou inibição geral da Rafe como um todo (TAKASE e NOGUEIRA, 2008).

De forma semelhante ao observado em mamíferos, injeções intracerebroventriculares (ICV) de 5-HT ou de DOI (um agonista de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>) em pombos privados de alimentos por 24 h provocam um intenso efeito hipofágico (STEFFENS *et al.*, 1997a; STEFFENS *et al.*, 1999). Um efeito hiperfágico foi observado nestes animais após a injeção ICV de GR46611 (um agonista de receptores 5-HT<sub>1D/1B</sub>; DA SILVA *et al.*, 2004), ou de metergolina (MET) em diversos núcleos hipotalâmicos (DA SILVA *et al.*, 2007). Já a administração ICV de 8-OH-DPAT provoca um efeito hiperfágico modesto em pombos privados de alimentos (STEFFENS *et al.*, 1997 a) ou não afeta a ingestão de alimentos em animais com livre acesso à comida (DA SILVA *et al.*, 2004). A injeção intra-rafe desta droga em

animais saciados provoca modesto efeito hiperfágico (HACKL *et al.*, 2005). Estes dados indicam que embora a existência de controles serotoninérgicos tonicamente ativos com ação inibitória sobre a ingestão de alimento possa ser uma propriedade filogeneticamente conservada nos amniotas, os mecanismos e circuitos cerebrais subjacentes a estes controles podem variar intensamente.

Neurônios marcados pelo anticorpo da enzima tirosina hidroxilase (neurônios TH+) foram encontrados no núcleo *Raphe pontis*, região onde não são comumente localizados neurônios catecolaminérgicos. Porém, apesar de poucos pesquisadores relatarem a existência dessas células nessa região, encontramos alguns estudos que mapeiam a presença de neurônios catecolaminérgicos na Rafe de aves, assim como o aqui encontrado (KNIGGE e PIEKUT, 1985; BERK *et al.*, 1993; RODMAN e KARTEN, 1995; MOONS *et al.*, 1994). Devido a esta observação, foi levantada a hipótese de uma possível reação cruzada entre os anticorpos utilizados nas técnicas de imunistoquímica para TH e TPH. Em contato estabelecido com a empresa fornecedora dos anticorpos (Millipore), foi relatado pelo departamento de assessoria científica que os dois anticorpos apresentam uma homologia muito semelhante, e que não é absolutamente descartada a possibilidade de uma reação cruzada. Entretanto, em testes realizados pela empresa, não foram observadas quaisquer resultados que levassem a esta suspeita. Além da resposta da empresa a este questionamento, diversas técnicas foram ponderadas para comprovar a veracidade do método utilizado. No entanto algumas dessas técnicas não puderam ser realizadas por algum impedimento metodológico. Por exemplo, a técnica de Western Blot, que poderia comprovar a especificidade de marcação de cada enzima, que não pôde ser realizada pois as duas enzimas em questão apresentam peso molecular muito semelhante. Adicionalmente, técnicas de imunistoquímica de fluorescência, que poderiam marcar distinguindo por diferentes cores, citoplasmas TH+ ou TPH+, também não puderam ser realizadas pois os anticorpos disponíveis para a técnica eram produzidos no mesmo animal (anti-rabbit).

Outros procedimentos foram então utilizados para examinar a possível distinção entre a marcação TPH+ e a marcação TH+. Primeiramente observamos uma diferença significativa na densidade de marcação TPH+ e TH+ em algumas das regiões analisadas, como os núcleos Scd, LC, Anl e Rp. No núcleo Scd encontramos uma quantidade significativamente maior de células TH+ do que células

TPH+. (Figura 16) O contrário, ou seja, uma maior quantidade de células TPH+ são encontradas nos outros três núcleos LC, Anl e Rp, em comparação com células TH+.

Outra característica diferencial é a localização das células TPH+ e TH+ dentro de um mesmo núcleo, e demonstram as diferenças nos locais de concentração dos dois tipos celulares analisados. Também é possível verificar a existência de corpos celulares e fibras marcadas por TH especificamente no núcleo AVT, local onde a imunohistoquímica para TPH não revelou nenhuma marcação. Estes achados sugerem que as duas enzimas TPH e TH estejam marcando distintivamente células serotonérgicas e catecolaminérgicas, respectivamente.

No núcleo Rp, os casos de células catecolaminérgicas ativas foi igualmente pequeno em todos os grupos experimentais. Esse resultado sugere que diferentes estados relacionados à ingestão de alimentos podem não afetar a ativação de células catecolaminérgicas dessa região nesses animais. Estudos realizados em roedores sugerem que receptores adrenérgicos presentes no núcleo mediano da Rafe participam dos mecanismos de controle de ingestão alimentar e apetite (DOS SANTOS, 2009b). Após injeções locais de adrenalina ou noradrenalina no núcleo mediano da Rafe de ratos com livre acesso à alimentação, em doses de 6, 20 ou 60 nmol, foi observado que o tratamento com adrenalina aumenta a ingestão de alimentos de forma dose-dependente, porém, não altera o tamanho da refeição, assim como outros comportamentos não-ingestivos (DOS SANTOS, 2009b). Já o tratamento com noradrenalina não afeta os comportamentos relacionados à ingestão, como comer ou beber (DOS SANTOS, 2009b). Já em animais com alimentação restrita (15g/animal/dia), a microinjeção de adrenalina, nas mesmas doses especificadas anteriormente, o efeito é inverso. Ou seja, a administração de adrenalina no núcleo mediano da Rafe leva a um efeito hipofágico nesses animais (MAIDEL et al., 2007). O estudo também afirma que esse resultado pode ser consequência de um estado induzido de saciedade, e não à mudanças em outros comportamentos não-ingestivos (MAIDEL et al., 2007). Além disso, foi observado que injeções de noradrenalina, em doses equimolares, não apresentaram efeitos nos comportamentos ingestivos (MAIDEL et al., 2007).

Estudos realizados por RIBAS et al (2012) investigaram a participação de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos no núcleo mediano da rafe (RNM) no controle do comportamento alimentar. Injeções de fenilefrina (PHE, agonista  $\alpha$ 1-adrenérgico) em doses equimolares de 0, 6 e 20 nmol foram administradas no RNM de: a) ratos submetidos a jejum durante a noite (18 h), ou b) ratos mantidos com 15 g de ração/dia durante 7 dias. Os resultados demonstraram que ambas as doses de PHE injectados no RNM de animais em jejum durante a noite levaram à diminuição da ingestão de alimentos acompanhada por um aumento na latência para iniciar a alimentação. Uma redução na duração da alimentação foi observada apenas após o tratamento de PHE na dose de 20 nmol. A resposta hipofágica foi acompanhada por uma diminuição da duração de alimentação somente após o tratamento com a dose mais elevada de PHE. Os presentes resultados indicam o papel funcional dos receptores inibitórios  $\alpha$ 1-adrenérgicos no MnR sobre o comportamento alimentar (RIBAS et al., 2012).

Em resumo, a análise total da expressão da proteína Fos em todos os núcleos demonstrou que o grupo Controle mantém uma ativação neuronal consistentemente moderada e estável. Já no grupo Ingestão observamos uma redução geral na atividade dos neurônios localizados nesses núcleos, e diferenças entre este e o grupo Controle aparecem em quase todas as regiões analisadas. O grupo Privação foi o que menos apresentou diferenças em comparação ao grupo Controle. Isso indica que na maioria dos casos estudados, a privação alimentar por uma hora não afeta de forma importante a atividade dos núcleos do tronco cerebral investigados aqui.

A intensa ingestão de alimentos também parece estar associada a uma redução geral da expressão de dupla marcação Fos+/TPH+. Já com relação à expressão de neurônios catecolaminérgicos ativos, a intensa ingestão alimentar parece reduzir o número dessas células em alguns núcleos, como o A8, o A6 e o Scd, aumentar em outros, como os núcleos LC e CS, e não afetar os núcleos Anl e Rp. Apesar de terem sido encontradas diferenças significantes entre os grupos experimentais nos casos de neurônios serotoninérgicos e/ou catecolaminérgicos ativos, essas duplas marcações aparecem sempre em número bastante pequeno. Quando comparamos a população total existente de células serotoninérgicas e/ou catecolaminérgicas nesses núcleos, os casos desses neurônios ativos em qualquer uma das três situações, parece ser pouco significativa. Ou seja, a grande maioria da população de neurônios

serotonérgico e/ou catecolaminérgicos encontrada nessas regiões não é afetada pelo protocolos relacionados à ingestão aqui realizados. Apesar disso, em diversos desses núcleos a densidade de expressão Fos varia significativamente, em números proporcionalmente muito maiores. Isso sugere que na fase de pré-saciação em que se encontram os animais do grupo Ingestão, outros grupos neuronais, que não serotonérgicos ou catecolaminérgicos, estejam fortemente envolvidos.



## REFERÊNCIAS

- ADKINS-REGAN, E. (1996). Neuroanatomy of sexual behavior in the male Japanese quail from top to bottom. *Poultry Avian Biol. Rev.* 7:193–204.
- ALESCI R, BAGNOLI P (1988) Endogenous levels of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in specific areas of the pigeon CNS: effects of serotonin neurotoxins. *Brain Res.* 450: 259-271.
- AMMAR AA, SÖDERSTEN P, JOHNSON AE. (2001). Locus coeruleus noradrenergic lesions attenuate intraoral intake. *Neuroreport.* Oct 8;12(14):3095-9.
- ANTIN J, GIBBS J, HOLT J, YOUNG RC, SMITH GP (1975) Cholecystokinin elicits the complete behavioural sequence of satiety in rats. *J. Comput. Physiol. Psychol.* 89:748–760.
- ANAND, B.K. & BROBECK, J.R. (1951). Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J. Biol. Med.*, 24, 123–140.
- ANDREW, R. J. Changes in visual responsiveness following intercollicular lesions and their effects on avoidance and attack (1974). *Brain Behav. Evol.* 10:400–424.
- ARAUJO IE, A.J. OLIVEIRA-MAIA, T.D. SOTNIKOVA, R.R. GAINETDINOV, M.G. CARON, M.A. NICOLELIS, S.A. SIMON (2008). Food reward in the absence of taste receptor signaling. *Neuron* 57: 930–941.
- ARENDS JJ, WILD JM, ZEIGLER HP. Projections of the nucleus of the tractus solitarius in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* (1988) Dec 15;278(3):405-29.
- AZEVEDO LC, ZIZEMER JR, HACKL LPN, MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA (2002) Muscarinic cholinergic receptor blockade impairs free fatty acid mobilization during fasting in pigeons (*Columba livia*). *J. Comp. Physiol. (B)* 172:115-123.

BAILHACHE, T., BALTHAZART, J. (1993). The catecholaminergic system of the quail brain: immunocytochemical studies of dopamine-hydroxylase and tyrosine hydroxylase. *J. Comp. Neurol.* 329, 230-256.

BELLCHAMBERS CE, CHIENG B, KEAY KA, CHRISTIE MJ (1998). Swim-stress but not opioid withdrawal increases expression of *c-fos* immunoreactivity in rat periaqueductal gray neurons which project to the rostral ventromedial medulla, *Neuroscience* 83 (1998) 517–524.

BENDOTTI C, SAMANIN R (1986). 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.* 1986 Feb 11;121(1):147-50.

BERK, M.L., SMITH, S.E., MULLINS, L.A. (1993). Distribution, Parabrachial Region Projection, and Coexistence of Neuropeptide and Catecholamine Cells of the Nucleus of the Solitary Tract in the Pigeon. *J. Comp. Neurol.* 327, 416-441.

BORBELY AA (1977). Sleep in the rat during food deprivation and subsequent restitution of food, *Brain Research* 124, pp. 457–471.

BOSWELL T, LI Q (1998). Cholecystokinin induces fos expression in the brain of the japanese quail. *Horm Behav* 34 (1): 56-66.

BRAUN CM, PIVIK RT. (1981). Effects of locus coeruleus lesions upon sleeping and waking in the rabbit. *Brain Res.* Dec 28;230(1-2):133-51.

BREWERTON TD (1995). Toward a unified theory of serotonin dysregulation in eating and related disorders. *Psychoneuroendocrinol.* 20: 561-590.

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

BRUN SRM, LUZ V, FERNANDEZ MF, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J (2001) Atypical angiotensin receptors may mediate water intake induced by central injections of angiotensin II and of serotonin in pigeons. *Reg. Peptides*, 98(3):127-135.

- BURMEISTER SS, MANGIAMELE LA, LEBONVILLE CL. (2008). Acoustic modulation of immediate early gene expression in the auditory midbrain of female túngara frogs. *Brain Res* 1190: 105-114.
- CAMPANELLA LC, DA SILVA AA, GELLERT DS, PARREIRA C, RAMOS MC, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J. (2009). Tonic serotonergic control of ingestive behaviours in the pigeon (*Columba livia*): the role of the arcopallium. *Behav Brain Res*. Dec 28;205(2):396-405.
- CANELLO M, RAVAZIO MR, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J (1993) Food deprivation-vs. intraventricular adrenaline-induced feeding and postprandial behaviors in the pigeon (*Columba livia*). *PhysiolBehav*, 54: 1075-1079.
- CAVALCANTE-LIMA HR, LIMA HRC, COSTA-E-SOUZA RH, OLIVARES EL, CEDRAZ-MERCEZ PL, REIS RO, BADAUÊ-PASSOS DJr, DE-LUCCA JrW, MEDEIROS MA, CÔRTEZ WS, REIS LC (2005) Chronic excitotoxic lesion of the dorsal raphe nucleus induces sodium appetite. *Braz J Med Biol Res* 38:1669-75.
- COMOLI E, RIBEIRO-BARBOSA ER, CANTERAS NS (2003) Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. *Behav Brain Res* 138: 17-28.
- COSCINA DV , FEIFEL D, NOBREGA JN, CURRIE PJ (1994) Intraventricular but not intraparaventricular nucleus metergoline elicits feeding in satiated rats, *Am. J. Physiol.* 266: R1562-R1567.
- COZZI B, VIGLIETTI-PANZICA C, ASTE N, PANZICA GC (1991) The serotonergic system in the brain of the Japanese quail. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*; 263:271-284.
- CRISPIM JUNIOR CF, PEDERIVA CN, BOSE RC, GARCIA VA, LINO-DE-OLIVEIRA C, MARINO-NETO J (2012). ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. *Comput Biol Med*. Feb;42(2):257-64.

CURRIE PJ, COSCINA DV (1996). Metergoline potentiates natural feeding and antagonizes the anorectic action of medial hypothalamic 5-hydroxytryptamine, *Pharmacol. Biochem Behav.* 53 :1023–1028.

DANGUIR J, NICOLAIDIS S (1979) Dependence of sleep on nutrients availability. *Physiol. Behav.* 22:735-740.

DANGUIR J, NICOLAIDIS S, GERARD H (1979) Relations between feeding and sleep patterns in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93:820-830.

DANGUIR J, NICOLAIDIS S (1980) Intravenous infusions of nutrients and sleep in the rat: An ischymetric sleep regulation hypothesis. *Am. J. Physiol.* 238:E307-E312.

DANGUIR J, NICOLAIDIS S (1985) Feeding, metabolism and sleep: Peripheral and central mechanisms of their interaction. In: McGinty, D. J., et al., eds. *Brain mechanisms of sleep*. New York: Raven Press; 321-340.

DANGUIR J (1987) Cafeteria diet promotes sleep in rats. *Appetite* 8:49-53.

DARIO AJS, LOPES PRC, FREITAS CG, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J (1996). Electrographic patterns of postprandial sleep after food deprivation or intraventricular adrenaline injections in pigeons. *Brain Res. Bull.* 39: 249-254.

DA SILVA AA, MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA (2003) Feeding induced by microinjections of NMDA and AMPA-kainate receptor antagonists into ventral striatal and ventral pallidal areas of the pigeon. *Brain Res.* 966: 76-83.

DA SILVA AA, CAMPANELLA LCA, RAMOS MC, FARIA MS, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J (2006). Ingestive effects of NMDA and AMPA-kainate receptor antagonists microinjections into the lateral hypothalamus of the pigeon (*Columba livia*). *Brain Res.* 1115: 75-82.

DA SILVA RA, OLIVEIRA ST, HACKL LPN, SPILERE CC, FARIA MS, MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA (2004) Ingestive

behaviors and metabolic fuels after central injections of 5-HT1A and 5-HT1D/1B receptors agonists in the pigeon. *Brain Research*, 1026:274-283.

DA SILVA RA, DA SILVA ASS, POFFO MJ, RIBAS DC, FARIA MS, MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA (2007) Feeding behavior after metergoline or GR-46611 injections into the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pigeon *Behavioural Brain Research* 179 248–257.

DA SILVA ES, DOS SANTOS TV, HOELLER AA, DOS SANTOS TS, PEREIRA GV, MENEGHELLI C, PEZLIN AI, DOS SANTOS MM, FARIA MS, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J (2008) Behavioral and metabolic effects of central injections of orexins/hypocretins in pigeons (*Columba livia*) *Regulatory Peptides*, 147: 9-18.

DAVIS JD e SMITH GP(1990). Learning to sham feed: behavioral adjustments to loss of physiological postingestional stimuli. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 259: R1228–R1235.

DE MELLO DMS, FREITAS CG, MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA (1996) Participation of the autonomic nervous system in lipolysis induced by intraventricular injections of carbachol in the pigeon. *J. Auton. Nervous Sys.* 59: 83-86.

DENBOW DM, VAN KREY HP, LACY MP, DIETRICK TJ (1983) Feeding, drinking and body temperature of Leghorn chicks: effects of ICV injections of biogenic amines. *Physiol. Behav.* 31: 85-90.

DENBOW DM (1984) Body temperature and food intake of turkeys following ICV injections of serotonin. *Nutr. Behav.* 1:301-304.

DE SAINT HILAIRE-KAFI Z, DEPORTERE H, NICOLAIDIS S (1989) Does cholecystokinin induce physiological satiety and sleep? *Brain Res.* 488:304-310.

DE SAINT-HILAIRE Z, NICOLAIDIS S (1992) Enhancement of slow wave sleep parallel to the satiating effect of acidic fibroblast growth factor in rats. *Brain Res. Bull.* 29:525-528.

- DE SAINT-HILAIRE Z, CHARNAY Y, MIKOLAJEWSKI R, GAILLARD J-M (1995) Active immunization against insulin affects sleep and feeding in rats. *Physiol. Behav.* 57:803-806.
- DEN BOER-VISSER AM, DUBBELDAM JL (2002). The distribution of dopamine, substance P, vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y immunoreactivity in the brain of the collared dove, *Streptopelia decaocto*. *J Chem Neuroanat.* Jan;23(1):1-27.
- D'HONDT E, VERMEIREN J, PEETERS K, BALTHAZART J, TLEMC, ONI O, BALL GF, *ET AL.* (1999) Validation of a new antiserum directed towards the synthetic c-terminus of the FOS protein in avian species: immunological, physiological and behavioral evidence. *J Neurosci Methods*; 91:31-45.
- DIETRICH MO, HORVATH TL. (2009) Feeding signals and brain circuitry. *Eur J Neurosci.* 30(9):1688-96.
- DOS SANTOS MM, ARAÚJO BB, SILVA ES, FELISBINO MB, HERDT MA, FARIA MS, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J (2005a) Efeitos comportamentais de injeções sistêmicas de 8-OH-DPAT (8OH) em pombos (*Columba livia*). XX Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Anais. Águas de Lindóia, São Paulo.
- DOS SANTOS MM, ARAÚJO BB, SILVA ES, FELISBINO MB, HERDT MA, FARIA MS, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J (2005b) Efeitos comportamentais de injeções sistêmicas de 1-(M-CHLOROPHENYL) PIPERAZINE (MCP) em pombos (*Columba livia*). XX Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Anais. Águas de Lindóia, São Paulo.
- DOS SANTOS MM, HOELLER AA, DOS SANTOS TS, FELISBINO MB, HERDT MA., DA SILVA ES, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J (2009a) Behavioural and electroencephalographic effects of systemic injections of 8-OH-DPAT in the pigeon (*Columba livia*). *Behav Brain Res*, 201, 244-256.
- DOS SANTOS RL, MANSUR SS, STEFFENS SM, FARIA MS, MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA (2009b). Food intake

increased after injection of adrenaline into the median raphe nucleus of free-feeding rats. *Behav Brain Res.* Feb 11;197(2):411-6.

DOS SANTOS TS (2010). Efeitos comportamentais e sobre a expressão da proteína Fos em neurônios serotoninérgicos após injeções intracerebroventriculares de serotonina em pombos (*Columba livia*). Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de PG em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, em Fevereiro de 2010. 78 pp.

DOS SANTOS, T. S., MENEGHELLI, C., HOELLER, A. A., PASCHOALINI, M. A., ARCKENS, L., LINO-DE-OLIVEIRA, C. e MARINO-NETO, J. (2011). Behavioral profile and Fos activation of serotonergic and non-serotonergic raphe neurons after central injections of serotonin in the pigeon (*Columba livia*). *Behavioural Brain Research.* 220: 173-184.

EMBER AA, GÖBEL GY, PETERVARI E, SZÉKELY M (2000) Fasting hypometabolism and postalimentary hypermetabolism: neural signals from the gastrointestinal tract. *J. Physiol. (London)* 526, 172–173.

FOOTE SL, BERRIDGE CW, ADAMS LM, PINEDA JA (1991). Electrophysiological evidence for the involvement of the locus coeruleus in alerting, orienting, and attending. *Prog Brain Res.* 1991;88:521-32.

FUCHS T, SIEGEL JJ, BURGDORF J, BINGMAN VP (2006) A selective serotonin reuptake inhibitor reduces REM sleep in the homing pigeon. *Physiology & Behavior*, 87: 575-581.

FULTON, S., PISSIOS, P., MANCHON, R.P., STILES, L., FRANK, L., POTHOS, E.N., MARATOS-FLIER, E. & FLIER, J.S. (2006) Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron*, 51, 811–822.

GEORGE SA, KNOX D, CURTIS AL, ALDRIDGE JW, VALENTINO RJ, LIBERZON I (2012). Altered locus coeruleus-norepinephrine function following single prolonged stress. *Eur J Neurosci.* 2012 Dec 20. doi: 10.1111/ejn.12095.

- GLENNON RA, DUKAT M (1995) Serotonin receptor subtypes. in: F.E. Bloom e D.J. Kupfer (eds.) "Psychopharmacology: the fourth generation of progress", p 415-429, New York: Raven Press.
- GOODSON JL, KABELIK D, SCHROCK SE (2009). Dynamic neuromodulation of aggression by vasotocin: influence of social context and social phenotype in territorial songbirds. *Biol Lett.* 2009 Aug 23;5(4):554-6. doi: 10.1098/rsbl.2009.0316. Epub 2009 Jun 3.
- GROSSMAN SP (1960). Eating or drinking elicited by direct adrenergic or cholinergic stimulation of hypothalamus. *Science.* 1960 Jul 29;132(3422):301-2.
- HAGEMANN LF, COSTA CV, ZENI LZR, FREITAS CG, MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA (1998) Food intake after adrenaline and noradrenaline injections into the hypothalamic paraventricular nucleus in pigeons. *Physiol. Behav.*, 64: 645-652.
- HÄCKL LPN, RICHTER GO, FARIA, MS; PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J.(2005) Behavioral effects of 8-OH-DPAT injections into pontine and mesencephalic areas containing 5-HT-immunoreactive perikaria in the pigeon. *Brain Research*, 1035 154-167.
- HALFORD JC, WANNINAYAKE SC, BLUNDELL JE (1998) Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. *PharmacolBiochem Be*, 61, 159-168.
- HALLER J, TOTH M, HALASZ J, DE BOER SF (2006) Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness. *Physiol Behav* 88: 173–182.
- HIRUNAGI K, HASEGAWA M, VIGH B, VIGH-TEICHMANN I (1992) Immunocytochemical demonstration of serotonin-immunoreactive cerebrospinal fluid-contacting neurons in the paraventricular organ of pigeons and domestic chickens. *Prog. Brain Res.* 91:327-330.
- HOELLER AA, DOS SANTOS TS, BRUXEL RR, DALLAZEN AR, DO AMARAL SILVA HT, ANDRÉ ES, MARINO-NETO (2013). J. Serotonergic control of ingestive and post-ingestive behaviors in

pigeons (*Columba livia*): the role of 5-HT1A receptor-mediated central mechanisms. *Behav Brain Res.* Jan 1;236(1):118-30. doi: 10.1016/j.bbr.2012.08.035.

HOLSTEGE, G (1992). The emotional motor system. *Eur. J. Morphol.* 30:67–79.

HOMMEL, J.D., TRINKO, R., SEARS, R.M., GEORGESCU, D., LIU, Z.W., GAO, X.B., THURMON, J.J., MARINELLI, M. & DILEONE, R.J. (2006) Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*, 51, 801–810.

HORVATH, T.L. & DIANO, S. (2004) The floating blueprint of hypothalamic feeding circuits. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 662–667.

ISHII Y, BLUNDELL JE, HALFORD JC, RODGERS RJ (2003). Palatability, food intake and the behavioural satiety sequence in male rats. *Physiol Behav.* 2003 Oct;80(1):37-47.

JACOBS BL, FORNAL CA (1999) Activity of Serotonergic Neurons in Behaving Animals *Neuropsychopharmacology* 21:9S–15S.

JAHNKE HJ, ABS M (1982). Vocalization after electrostimulation of the brain of pigeons in relation to heart- and breathing-rates. *Behav Brain Res.* 1982 May;5(1):65-72.

KANTOR S, JAKUS R, BALOGH B, BENKO A, BAGDY G (2004) Increased wakefulness, motor activity and decreased theta activity after blockade of the 5-HT2B receptor by the subtype-selective antagonist SB-215505. *British Journal of Pharmacology*, 142:1332-1342.

KARTEN HJ, HODOS WA (1967) A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*), Baltimore: Johns Hopkins Press.

KINGSBURY MA, KELLY AM, SCHROCK SE, GOODSON JL (2011) Mammal-Like Organization of the Avian Midbrain Central Gray and a Reappraisal of the Intercollicular Nucleus. *PLoS ONE* 6(6): e20720. doi:10.1371/journal.pone.0020720.

KNIGGE KM, PIEKUT DT (1985). Distribution of CRF- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brainstem of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Peptides*. Jan-Feb;6(1):97-101.

KOELLA WP, CZICMAN JS (1966) Mechanism of the EEG-synchronizing action of serotonin. *The American Journal of Physiology*, 211:926-934.

KRALY FS.(1990) Drinking elicited by eating.*ProgPsychobiolPhysiolPsychol* 14:67 –133.

KRALY FS, TRIBUZIO RA, KEEFE ME, KIM Y-M, LOWRANCE R (1995) Endogenous histamine contributes to drinking initiated without postprandial challenges to fluid homeostasis in rats. *PhysiolBehav* 58: 1137–43.

KROWICKI, Z.K., HORNBY, P.J., (1994). TRH and substance P independently affect gastric motility in nucleus raphe obscurus of the rat. *Am. J. Physiol.* 266, G870–G877.

KROWICKI, Z.K., HORNBY, P.J., (1995). The nucleus raphe obscurus controls pancreatic hormone secretion in the rat. *Am. J. Physiol.* 268, E1128–E1134.

LAURILA M, HOHTOLA E, SAARELA S, RASHOTTE ME (2003) Adaptive timing of digestion and digestion-related thermogenesis in the pigeon. *Physiol. Behav.* 78, 441–448.

LEIBOWITZ SF (1986). Brain monoamines and peptides: role in the control of eating behavior. *Fed Proc.* 1986 Apr;45(5):1396-403.

LEIBOWITZ SF (1988). Brain neurotransmitters and eating behavior in the elderly. *Neurobiol Aging.* 1988 Jan-Feb;9(1):20-2.

LEIBOWITZ, S.F., STANLEY, B.G. (1986). Brain peptides and the control of eating behavior. In: Moody, T.W. (Ed.), *Neural and Endocrine Peptides and Receptors*. New York, Plenum Press, pp. 333–352.

LI J, CHEN K, YAN J, WANG Q, ZHAO X, YANG X, YANG D, ZHAO S, ZHU G, SUN B (2012). Increased sucrose intake and

corresponding c-Fos in amygdala and parabrachial nucleus of dietary obese rats. *Neurosci Lett.* Sep 13;525(2):111

LIN J, AMODEO LR, ARTHURS J, REILLY S (2012) Anisomycin infusions in the parabrachial nucleus and taste neophobia. *Neurobiology of Learning and Memory* 98 (2012) 348–353

LINO-DE-OLIVEIRA C, A.J. SALES, E.A. DEL BEL, M.C.L. SILVEIRA, F.S. GUIMARÃES (2001). Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression, *Brain Res. Bull.* 747–754.

LINO-DE-OLIVEIRA C, DE OLIVEIRA RM, PÁDUA CAROBREZ A, DE LIMA TC, DEL BEL EA, GUIMARÃES FS (2006). Antidepressant treatment reduces Fos-like immunoreactivity induced by swim stress in different columns of the periaqueductal gray matter. *Brain Res Bull.* Oct 16;70(4-6):414-21. Epub 2006 Jul 26.

LORENZ DN, POPPE CJ, QUAIL C, SEIPEL K, STORDEUR SA, JOHNSON E (1998) Filling the gut activates paradoxical sleep in suckling rats. *DevPsychobiol.* Jan;32(1):1-12.

MAIDEL S, LUCINDA AM, DE AQUINO VW, FARIA MS, PASCHOALINI MA (2007). The adrenaline microinjection into the median raphe nucleus induced hypophagic effect in rats submitted to food restriction regimen. *Neurosci Lett.* Jul 11;422(2):123-7. Epub 2007 Jun 15.

MANSBACH RS, LORENZ DN (1983) Cholecystokinin (CCK-8) elicits prandial sleep in rats. *Physiol Behav.* Feb;30(2):179-83.

MANSBACH RS, ROVETTI CC, MACOR JE (1996) CP-135,807, a selective 5-HT<sub>1D</sub> agonist: effects in drug discrimination and punishment procedures in the pigeon. *Psychopharmacology (Berl)* Dec 128:3 313-9.

MARINO-NETO J ; ARMENGOL JA (2000) Phenylethanolamine N-methyltransferase-immunoreactive neurons in the medulla oblongata of the pigeon (*Columba livia*) projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Behav. Evol.*, 56: 184-195.

MARINO-NETO J, SABI M, PASCHOALINI MA (2004) Adrenergic Mechanisms, in: "ENCYCLOPEDIA OF ENDOCRINOLOGY AND ENDOCRINE DISEASES" (Luciano Martini, Ed.) San Diego, Academic Press, Vol. 1, pp 106-111.

MARQUES, N., MENNA-BARRETO, L., (1997). Cronobiologia: Princípios e Aplicações. São Paulo, Edusp

MEDINA L, REINER A (1994). Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. J Comp Neurol. Apr 22;342(4):497-537.

MENEGHELLI C, ROCHA NH, MENGATTO V, HOELLER AA, SANTOS TS, LINO-DE-OLIVEIRA C, MARINO-NETO J. (2009) Distribution of tryptophan hydroxylase-immunoreactive neurons in the brainstem and diencephalon of the pigeon (*Columba livia*) J ChemNeuroanat; In Press, doi:10.1016/j.

METZGER M, TOLEDO C, BRAUN K (2002) Serotonergic innervation of the telencephalon in the domestic chick. Brain Research Bulletin, 57: 547–551.

MÖNNIKES H, LAUER G, BAUER C, TEBBE J, ZITTEL TT, ARNOLD R (1997). Pathways of Fos expression in locus ceruleus, dorsal vagal complex, and PVN in response to intestinal lipid. Am J Physiol. Dec;273(6 Pt 2):R2059-71.

MOONS, L., van GILS, J., GHIJSELS, E., VANDESANDE, F. (1994). Immunocytochemical localization of L-dopa and dopamine in the brain of the chicken (*Gallus domesticus*). J. Comp. Neurol. 346, 97-118.

MOREIRA FA, GUIMARAES FS (2008) Lack of effects of clomipramine on Fos and NADPH-diaphorase double-staining in the periaqueductal gray after exposure to an innate fear stimulus. Physiol Behav 94: 316–321.

NORGREN R, LEONARD CM (1971). Taste pathways in rat brainstem. *Science* 173: 1136–1139.

NORTON WH, FOLCHERT A, BALLY-CUIF L (2008) Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter

(slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain. *J Comp Neurol*, 511, 521-542.

PARENT A (1981) Comparative anatomy of the serotonergic systems. *J Physiol*, 77, 147-156.

PARKER GC, COSCINA DV (2001) Lesions of the posterior basolateral amygdala block feeding induced by systemic 8-OH-DPAT, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 68: 729-734.

PARYLAK SL, KOOB GF, ZORRILLA EP (2011). The dark side of food addiction. *Physiol Behav.* 2011 Jul 25;104(1):149-56. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.04.063. Epub 2011 May 8.

PHILLIPS NH, BERGER RJ (1989) Metabolism and body temperature during circadian sleep in the fed and fasting pigeon. In: Reinertsen RE, Bech C, editors. *Physiology of cold adaptation in birds*. New York: Plenum; p. 265-74.

PHILLIPS NH, BERGER RJ (1991) Regulation of body temperature, metabolic rate, and sleep in fasting pigeons diurnally infused with glucose or saline. *J Comp Physiol*; 161:311-8.

PHILLIPS DL, RASHOTTE ME, HENDERSON RP (1991) Energetic responses of pigeons during food deprivation and restricted feeding. *Physiol. Behav.* 50:195-203.

PINOS H, COLLADO P, SALAS M, PÉREZ-TORRERO E (2004). Undernutrition and food rehabilitation effects on the locus coeruleus in the rat. *Neuroreport*. Jun 28;15(9):1417-20.

RASHOTTE ME, PHILLIPS DL, HENDERSON RP (1997) Nocturnal digestion, cloacal excretion, and digestion-related thermogenesis in pigeons (*Columba livia*). *PHYSIOL BEHAV* 61( 1 ) 83-92.

RASHOTTE ME, SAARELA S, HENDERSON RP, HOHTOLA E (1999) Shivering and digestion-related thermogenesis in pigeons during dark phase. *Am. J. Physiol.* 277, R1579-R1587.

RASHOTTE ME, PASTUKHOV IF, POLIAKOV EL, HENDERSON RP (1998) Vigilance states and body temperature during the circadian cycle in fed and fasted pigeons (*Columba livia*), *The American Journal of Physiology* 275 (5Pt2), pp. R1690–R1702.

RAVAZIO MR, CANELLO M, PASCHOALINI MA, MARINONETO J (1990) Behavioral effects of adrenaline and noradrenaline injected into the lateral ventricles of the pigeon (*Columba livia*). *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 23:1133–1137.

RAVAZIO MR, PASCHOALINI MA (1991) Participation of alpha receptors in the neural control of food intake in pigeons. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 24:943–946.

REINER, A., KARLE, E.J., ANDERSON, K.D., MEDINA, L (1994). Catecholaminergic perikarya and fibers in the avian nervous system. In: Smeets, W.J.A.J.; Reiner, A. *Phylogeny and development of catecholaminergic systems in the CNS of vertebrates*. Cambridge, England: Cambridge University Press. 135-181.

REINER A, YAMAMOTO K, KARTEN HJ (2005). Organization and evolution of the avian forebrain. *Anat Rec* 287A: 1080-1102, 2005.

REINER A, PERKEL DJ, BRUCE L, BUTLER AB, CSILLAG A, KUENZEL W, MEDINA L, PAXINOS G, SHIMIZU T, STRIEDTER GF, WILD M, BALL GF, DURAND S, GUNTURKUN O, LEE DW, MELLO CV, POWERS A, WHITE SA, HOUGH G, KUBIKOVA L, SMULDERS TV, WADA K, DUGAS-FORD J, HUSBAND S, YAMAMOTO K, YU J, SIANG C, JARVIS ED (2004). Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J Comp Neurol* 473 (3): 377-414.

REIS LC, RAMALHO MJP, ANTUNES-RODRIGUES J (1990a) Central serotonergic modulation of drinking behavior induced by water deprivation: effect of a serotonergic agonist (MK-212) administered intracerebroventricularly. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 23:1335-1338.

REIS LC, RAMALHO MJP, ANTUNES-RODRIGUES J (1990b) Central serotonergic modulation of drinking behavior induced by angiotensin II, and carbachol in normally hydrated rats: effect of

intracerebroventricular injection of MK-212. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 23: 1339-1342.

REIS LC, RAMALHO MJP, FAVARETTO ALV, GUTKOWSKA J, MCCANN SM, ANTUNES-RODRIGUES J (1994) Participation of ascending serotonergic system in the stimulation of the atrial natriuretic peptide release. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 91:12022-12026.

RIBAS AS, FLORES RA, DE NAZARETH AM, FARIA MS, TERENCE MG, MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA (2012). Feeding behaviour after injection of  $\alpha$ -adrenergic receptor agonists into the median raphe nucleus of food-deprived rats. *Physiol Behav.* Jan 18;105(2):220-9. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.08.028. Epub 2011 Aug 31.

RICHERSON, G.B., WANG, W., TIWARI, J., BRADLEY, S.R (2001). Chemosensitivity of serotonergic neurons in the rostral ventral medulla. *Respir. Phys* 129, 175–189.

RODGERS RJ, HOLCH P, TALLETT AJ (2010). Behavioural satiety sequence (BSS): Separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite. *Pharmacology, Biochemistry and Behavioural* 97 (2010) 3–14.

RODMAN HR, KARTEN HJ (1995). Laminar distribution and sources of catecholaminergic input to the optic tectum of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 1995 Aug 28;359(3):424-42.

RUSHING PA e GIBBS J (1998). Prolongation of intermeal interval by gastrinreleasing peptide depends upon time of delivery. *Peptides* 19: 1439–1442.

RUSHING PA, HENDERSON RP, e GIBBS J (1998). Prolongation of the postprandial intermeal interval by gastrin-releasing peptide 1–27 in spontaneously feeding rats. *Peptides* 19: 175–177.

SABI M, RAIMONDI C, MARQUES S, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J (2002). Adrenergic control of glycemia in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in pigeons. *NeuroReport*, 13(6): 871-875.

SAMANIN R, GRIGNASCHI G (1996) Role of 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in satiety and animal models of eating disorders. in: Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behaviour. S J Cooper e P G Clifton (eds.), cap. 3 , pp. 39-58, London: Academic Press.

SCLAFANI A, AZZARA AV, TOUZANI K, GRIGSON PS, NORGREN R (2001). Parabrachial nucleus lesions block taste and attenuate flavor preference and aversion conditioning in rats. Behav Neurosci. Aug;115(4):920-33.

SCLAFANI, A. (2001). Post-ingestive positive controls of ingestive behavior. Appetite 36, 79–83.

SCHWARTZ MW, SEELEY RJ (1997) Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. N. Engl. J. Med. 336, 1802–1811.

SCOTT TR, SMALL DM (2009), The Role of the Parabrachial Nucleus in Taste Processing and Feeding. Annals of the New York Academy of Sciences, 1170: 372–377.

SECOR SM (2009) Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response J Comp Physiol B 179:1–56

SHARP FR, SAGAR SM, HICKS K, LOWENSTEIN D, HISANAGA K (1991) c-fos mRNA, Fos, and Fos-related Antigen Induction by Hypertonic Saline and Stress. The Journal of Neuroscience, August, 7 7(8): 2321-2331

SIMANSKY KJ (1996) 5-HT receptor subtypes influencing feeding and drinking: Focus on the periphery. . in: Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behaviour. S J Cooper e P G Clifton (eds.), cap. 4 , pp. 59-98, London: Academic Press.

SÖDERPALM AHV, BERRIDGE KC (2000) The hedonic impact and intake of food are increased by midazolam microinjection in the parabrachial nucleus. Brain Research 877 (2000) 288–297

SOMERVILLE EM, CLIFTON PG (1996) Neurochemical interactions in the control of ingestive behaviour. In: Cooper SJ, Clifton PG, editors.

Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behaviour. San Diego: Academic Press 369–88.

SOUZA WF, FREITAS CG, MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA (1996) Central  $\beta$ -adrenoceptor involvement in neural control of blood glucose in pigeons. *Physiol. Behav.* 60 (3): 889-894.

SPUDEIT WA, SULZBACH NS, BITTENCOURT M, ANDRADE AC, HUNNING GI, MARINO-NETO J. (2013). The Behavioral Satiety Sequence in Pigeons (*Columba livia*). Description and Development of a Method for Quantitative Analysis, submetido.

STANLEY BG, LEIBOWITZ SF (1984). Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci.* 1984 Dec 24;35(26):2635-42.

STANLEY BG, SCHWARTZ DH, HERNANDEZ L, HOEBEL BG, LEIBOWITZ SF (1989). Patterns of extracellular norepinephrine in the paraventricular hypothalamus: relationship to circadian rhythm and deprivation-induced eating behavior. *Life Sci.* 1989;45(4):275-82.

STEFFENS SM, CASAS DC, MILANEZ BC, FREITAS CG, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J (1997a) Hypophagic and dipsogenic effects of central 5-HT injections in pigeons. *Brain Res. Bull.*, 44: 681-688.

STEFFENS SM, CASAS DC, MILANEZ BC, FREITAS CG, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J. (1997b) Participação de receptores 5-HT<sub>2a-2c</sub> e 5-HT<sub>3</sub> na regulação da ingestão de alimentos e água em pombos. XIX Congresso Latinoamericano de Ciências Fisiológicas, 1997, vol. 19, p. 22, Caracas, Venezuela, *Anales.....*, Caracas: ALACF.

STEFFENS SM, HACKL LPN, MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA (1999) Efeitos do tratamento prévio com antagonistas de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1a</sub>, 5-HT<sub>2/1c</sub> e 5-HT<sub>3</sub> sobre a resposta dipsogênica desencadeada pela administração central de serotonina em pombos. In: Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, XIV, 1999, Caxambu. *Anais...* São Paulo: FESBE p. 22.

STEFFENS SM, ANDRIANI VMA, AZEVEDO FM, BENEDETTI MA, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO, J (2001) Sleep and serotonin in the pigeon. I. Behavioral studies on the effects of icv injections of 5-HT1A, 5-HT2A/2C and 5-HT3 receptor agonists. XVI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Anais. Caxambu, Minas Gerais.

STRICKER EM, ZIGMOND MJ (1984). Brain catecholamines and the central control of food intake. *Int J Obes.* 8 Suppl 1:39-50.

SZÉKELY M, SZEENYI Z, KIS A (1997) Fasting and refeeding: alterations of resting metabolic rate and body temperature. In: Nielsen Johannsen, B., Nielsen, R. (Eds.), *Thermal Physiology 1997*. August Krogh Institute, Copenhagen, pp. 235–238.

TANNOCK GW, SMITH JM (1972). The effect of food and water deprivation (stress) on Salmonella-carrier mice. *J Med Microbiol.* 1972 Aug;5(3):283-9.

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

WALLACE ME (1976). Effects of stress due to deprivation and transport in different genotypes of house mouse. *Lab Anim.* 1976 Jul;10(3):335-47.

WANG, W., TIWARI, J.K., BRADLEY, S.R., ZAYKIN, R., RICHERSON, G.B (2001). Acidosis-stimulated neurons of the medullary raphe are serotonergic. *J. Neurophysiol.* 85, 2224–2235.

WELTZIN TE, FERNSTROM MH, KAYE WH (1994) Serotonin and bulimia nervosa. *Nutr. Rev.*, 52: 399-408.

WILD JM, ARENDS JJ (1987). A respiratory-vocal pathway in the brainstem of the pigeon. *Brain Res.* 1987 Mar 24;407(1):191-4.

WILD JM, ARENDS JJ, ZEIGLER HP (1990). Projections of the parabrachial nucleus in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 1990 Mar 22;293(4):499-523

WILD, J. M (1997). Functional anatomy of neural pathways contributing to the control of song production in birds. *Eur. J. Morphol.* 35:303–325.

WILD JM, BALTHAZART J (2012). Neural pathways mediating control of reproductive behaviour in male Japanese quail. *J Comp Neurol.* Dec 10.

WODZICKA-TOMASZEWSKA M, STELMASIAK T, CUMMING RB (1982). Stress by immobilization, with food and water deprivation, causes changes in plasma concentration of triiodothyronine, thyroxine and corticosterone in poultry. *Aust J Biol Sci.* 1982;35(4):393-401.

WOODS, Stephen C (2004). Gastrointestinal Satiety Signals. I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G7–G13, 2004; 10.1152/ajpgi.00448.2003.

YAMADA H, SANO Y (1985) Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallusdomesticus*). II. The distribution of the nerve fibers. *Biogenic Amines* 2: 21-36.

YANG, H., ISHIKAWA, T., TACHÉ, Y., (1990). Microinjection of TRH analogs into the raphe pallidus stimulates gastric acid secretion in the rat. *Brain Res.* 531, 280–285.

YANG, H., TACHÉ, Y., OHNING, G., GO, V.L., (2002). Activation of raphe pallidus neurons increases insulin through medullary thyrotropin-releasing hormone (TRH)-vagal pathways. *Pancreas* 25, 301–307.

ZAMMIT GK, ACKERMAN SH, SHINDLEDECKER R, FAUCI M, SMITH GP (1992) Postprandial sleep and thermogenesis in normal men. *PhysiolBehav.* Aug;52(2):251-9.

ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425–432.

ZEIGLER HP, GREEN HL, SIEGEL J (1972) Food and water intake and weight regulation in the pigeon. *PhysiolBehav* 8:127-34.

ZORRILLA EP, INOUE K, FEKETE EM, TABARIN A, VALDEZ GR, KOOB GF (2005) Measuring meals: structure of prandial food and water intake of rats. *Am J PhysiolRegulIntegrCompPhysiol.* 2005;288(6):R1450-67.