

Ana Paula Dambros Taschetto

**EFEITOS DA REPOSIÇÃO COM ESTRADIOL NA RESPOSTA  
INGESTIVA OCACIONADA PELA ATIVAÇÃO DE  
RECEPTORES 5-HT1A NO NÚCLEO ARQUEADO E NO  
HIPOTÁLAMO LATERAL DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Tese submetida ao Programa de  
Pós-Graduação Multicêntrico em  
Ciências Fisiológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau  
de Doutor em Ciências Fisiológicas  
Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta  
Aparecida Paschoalini.

Florianópolis  
2016

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

Taschetto, Ana Paula Dambros

Efeitos da reposição com estradiol na resposta ingestiva ocasionada pela ativação de receptores 5-HT1A no núcleo arqueado e no hipotálamo lateral de ratas ovariectomizadas / Ana Paula Dambros Taschetto ; orientador, Marta Aparecida Paschoalini - Florianópolis, SC, 2016.  
109 p.

Tese (doutorado) - 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 alimento. 3. Estradiol. 4. Receptor 5-HT1A. 5. Hipotálamo. I. Paschoalini, Marta Aparecida. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

Ana Paula Dambros Taschetto

EFEITOS DA REPOSIÇÃO COM ESTRADIOL NA RESPOSTA  
INGESTIVA OCASIONADA PELA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES  
5-HT<sub>1A</sub> NO NÚCLEO ARQUEADO E NO HIPOTÁLAMO  
LATERAL DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de “Doutor”, e  
aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação  
Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2016.

---

Prof.<sup>a</sup> Fernanda Barbosa Lima Christian, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Marta Aparecida Paschoalini, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Lucila Leico Elias, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade de São Paulo (videoconferência)

---

Prof.<sup>a</sup> Ilma Simoni Brum da Silva, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof.<sup>a</sup> Mariana Graciela Terenzi, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Fernanda Barbosa Lima Christian, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



*Dedico este trabalho a minha mãe,  
Silvia. Uma guerreira, com um coração  
do tamanho do mundo. Ensinou-me,  
desde muito pequena, que o estudo é o  
bem maior que um homem pode ter.  
Obrigado por tudo. Te amo!!!!*



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Silvia Dambros Taschetto e Abilio Taschetto, por todo apoio, carinho, incentivo e paciência pela minha ausência nesses quatro anos. Por terem acreditado no meu sonho, pelo apoio financeiro, por nunca me deixarem desanimar, por terem me ensinado a não desistir. Enfim, por serem o meu porto seguro.

Aos meus irmãos Tiago Taschetto e Marcelo Taschetto, por todo apoio, carinho, incentivo e amor.

Aos meus tios Ana Maria Kist, Marcelo Kist e minha afilhada Julia Dambros Kist, por todo carinho e apoio que sempre me deram.

Ao Leandro César Xavier de Carvalho, por ser essa pessoa tão especial na minha vida. Seu carinho, companheirismo e apoio foram fundamentais nesta minha jornada.

À minha orientadora, a professora Dra Marta Paschoalini, por ter aberto as portas do seu laboratório, pela oportunidade de ingressar no doutorado e por todo conhecimento transmitido.

Ao professor Dr. Moacir Serralvo Farias, pelo seu incentivo, apoio, e disponibilidade de ajudar.

À professora Dra. Fernanda Barbosa Lima Christian, pela sua disponibilidade, carinho e conhecimentos transmitidos.

À professora Dra. Mariana Graciela Terenzi, pela sua disponibilidade e paciência em me ensinar a verificar os locais das microinjeções.

Ao professor Dr. Alex Rafacho, cuja dedicação e determinação para o crescimento do Programa Multicêntrico foram inspiradoras, além de ter sido fundamental durante os primeiros anos do meu doutorado, sempre demonstrando muito esforço para conseguir minhas bolsas provisórias, enquanto a definitiva não vinha.

Aos grandes amigos que fiz nesses quatro anos, e vou levar para o resto da vida: Brunno Rocha Levone, Larissa Kochenberger, Ana Paula Fraga Lopes, Ana Cláudia Januário e Rafael A. Flores. Com um agradecimento especial para o Brunno e para a Larissa, que mais do que colegas e amigos, foram fundamentais para que eu conseguisse vencer todos os desafios, sempre dispostos a me ajudar com os experimentos, com conhecimento, com apoio e carinho. Vocês foram fundamentais.

Às grandes amigas que o doutorado me deu: Myla Bittencourt de Aguiar e Flora Lucena. Um dia me questionaram como nossa amizade tinha começado, já que não éramos do mesmo laboratório. Eu não soube explicar. Porque amizade é isso, não precisa de motivos, ela acontece.

Aos colegas e amigos Flaviano Lorezon, Jordana de Rocco, Karolina Domingues e Pâmela Ramborger, que viveram junto comigo a melhor experiência da pós-graduação: o Workshop “Understanding the female brain and behaviour”.

Aos demais colegas e amigos do laboratório: Eduardo Simão da Silva, Elisa C. Cella, Kariana Savedra, Anderson S. Ribas, entre tantos outros colegas e amigos de outros laboratórios.

À minha aluna de iniciação científica Marina Vieira de Oliveira, por todo auxílio, carinho e amizade.

Aos queridos amigos Tamires Bacarin, Cecília Truite, Rogério Meletti, Ueslei Souza (*in memorian*) e Anabeli Roveda. Obrigada por todo carinho e amizade.

Aos grandes amigos Michele Johan, Márcio Ely, Rafael Arenhard e Luciane Ely por todo carinho e amizade. Vocês compartilharam o sonho do doutorado junto comigo. Sem vocês esse sonho não teria se realizado.

A todos os professores do PPGMCF- UFSC, pelo conhecimento transmitido.

Aos professores das instituições nucleadoras: UFRGS e FMRP/USP, pela disponibilidade e conhecimento transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia: Seu Carlos e Dona Vilma.

A todos os animais que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao CNPq e a CAPES pelo auxílio financeiro.

***A todos o meu muito obrigado!***



## RESUMO

O presente estudo investigou os efeitos do estradiol nos comportamentos ingestivos ocasionados pela ativação dos receptores 5HT<sub>1A</sub> no hipotálamo lateral (HL) e núcleo arqueado (ARC) de ratas ovariectomizadas. Todos os animais foram ovariectomizados e posteriormente tratados com óleo de milho (100µL/ rata; grupo controle) (OVX) ou cipionato de estradiol (E2; 10mg/ kg peso corporal) (OVX+E). Esses animais receberam injeções locais no HL ou no ARC de veículo ou agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> [8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina (8-OHDPAT; na dose de 6 nmol)]. Com o objetivo de verificar o envolvimento dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> na ingestão alimentar, os animais foram pré-tratados com maleato de N-[2-[4-(2-Metoxifenil)-1-piperazinal]etil]-N-2-piridinilciclohexanocarboxamida (WAY100635 – antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>; na dose 0,37 nmol) ou dihidrocloreto de 1-(2-metoxifenil)-4-(4-succinimidobutil) piperazina (MM77- antagonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, nas doses de 0,37 e 3,7 nmol) no HL, e com WAY100635 (0,37 nmol) no ARC, e estes pré-tratamentos foram seguidos de injeções de 8-OHDPAT ou veículo. Os resultados mostraram que no HL, injeções de 8-OHDPAT ocasionaram hiperfagia nos animais OVX, que foi acompanhada por aumentos na duração e frequência deste comportamento. O tratamento com estradiol (OVX+E) suprimiu esta resposta hiperfágica e reduziu a duração e frequência deste comportamento. A latência para iniciar a ingestão não foi alterada pelos tratamentos com agonista e antagonistas tanto em OVX, como em OVX+E. Tanto o pré-tratamento com WAY10063, ou com MM 77 (em ambas as doses) bloquearam os efeitos hiperfágicos provocados pelas injeções de 8-OHDPAT nos animais OVX. A duração dos comportamentos não ingestivos (locomoção, imobilidade, exploração não locomotora, exploração vertical, autolimpeza e exploração de alimento) não foram afetados pelos tratamentos tanto em OVX, como em OVX+E. No ARC, as injeções de 8-OHDPAT ocasionaram hipofagia apenas nos animais OVX+E. Esta hipofagia foi acompanhada por redução na duração da ingestão alimentar. Os animais OVX e OVX+E não apresentaram alterações na latência e na frequência da ingestão alimentar após injeções de 8-OHDPAT. O pré-tratamento com WAY 100635 bloqueou a hipofagia e a redução da duração da ingestão alimentar ocasionadas pelas injeções de 8-OHDPAT. Porém, não foram observadas alterações na duração dos comportamentos não ingestivos.

Tanto no HL, como no ARC, as injeções de 8-OHDPAT não afetaram o consumo de água nos animais OVX e OVX+E, sugerindo que os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, provavelmente, não estão envolvidos com o controle da ingestão de água. Esses resultados sugerem que em ambos os núcleos hipotalâmicos estudados (HL e ARC) a influência serotoninérgica sobre a ingestão alimentar mediada pela ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> é afetada pela concentração de estradiol. Os efeitos do estradiol sobre o circuito serotoninérgico do HL parecem ser tônicos, pois esta influência só foi demonstrada na ausência dos estrógenos. Entretanto, os efeitos do estradiol sobre o circuito serotoninérgico do ARC parecem ser fásicos, pois na ausência dos esteroides ovarianos não foram observadas alterações na ingestão alimentar após ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, indicando que as flutuações destes esteroides durante o ciclo estral, possivelmente, afetam o circuito serotoninérgico que participa do controle da ingestão alimentar no ARC.

**Palavras-chaves:** ingestão alimentar, estradiol, receptores 5-HT<sub>1A</sub>, ARC, HL.

## ABSTRACT

The present study describes some of the effects of estradiol on the ingestive behaviours occasioned by activation of 5HT<sub>1A</sub> receptors in the lateral hypothalamus (LH) and arcuate nucleus (ARC) of satiated female rats. Ovariectomized rats treated with corn oil (100µL/ rat; control group) (OVX) or estradiol cypionate (E2; 10mg/ kg body weight) (OVX+E) received local injections of vehicle or agonist of 5-HT<sub>1A</sub> [8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OHDPAT; at the dose of 6 nmol)] into the LH and the ARC. In order to investigate the involvement of these receptors in food intake, the animals were pre-treated with N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl) cyclohexane carboxamide maleate (WAY100635 –5HT<sub>1A</sub> receptor full antagonist; at the dose of 0.37 nmol) or 1-(2-Methoxyphenyl)-4-(4-succinimidobutyl) piperazine dihydrochloride (MM77- 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, at the dose of 0.37 and 3.7 nmol) in the LH. In the ARC the animals were pretreated only with WAY100635. These pretreatments were followed by injections of 8-OHDPAT or vehicle. The results showed that injections of 8-OHDPAT into the LH of ovariectomized (OVX) rats significantly increased food intake, including duration and frequency of this behaviour. The replacement with estradiol (OVX+E) suppressed this hyperphagic response as well as the increases in the duration and frequency of this behaviour. The latency to start food intake was not changed between different treatments OVX and OVX+E. Pretreatment with WAY10063 and MM 77 (0.37 and 3.7) blocked the hyperphagic effects evoked by injections of 8-OHDPAT in OVX animals. The duration of non ingestive behaviours (locomotion, immobility, non locomotor exploration, rearing and grooming) were not affected by the treatments in OVX and OVX+E. In the ARC, injections of 8-OHDPAT evoked hypophagia only in OVX+E animals, and this hypophagic response was accompanied by reduction in the duration of food intake. In both, OVX and OVX+E, the latency and frequency of the food intake were not changed by the treatment with 8-OHDPAT. The pretreatment with WAY 100635 blocked the hypophagic response and the reduction in the duration of this behaviour evoked by injections of 8-OHDPAT. However, no changes were observed in the duration of non ingestive behaviours. In both hypothalamic nucleus, ARC and LH, the water intake also remained unchanged in OVX and OVX+E animals, suggesting that the 5-HT<sub>1A</sub> receptors are not involved in the control of water intake. These results indicate that in the LH and in the ARC, the

influence of serotonin on food intake, mediated by activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors, is affected by estradiol levels. The effects of estradiol on the serotonergic circuits of LH seem to be tonic, since this influence was showed only in the absence of estrogens. However, the influence of estradiol in the serotonergic circuit of ARC seems to be phasic, since in the absence of ovarian steroids no changes were observed in food intake after activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors, indicating that these steroids fluctuations during normal estrous cycle probably influence the serotonergic system that controls food intake in the ARC.

**Keywords:** food intake, estradiol, 5-HT<sub>1A</sub> receptors, ARC, LH.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**5-HT** - 5-hidroxitriptamina - serotonina  
**8-OHDPAT** - 8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina  
**AcbSh** - Porção shell do núcleo accumbens  
**Ác asc.** - Ácido ascórbico  
**AgRP** - Proteína relacionada ao gene agouti  
**ARC** - Núcleo arqueado  
**BDNF** - Fator neurotrófico derivado do encéfalo  
**CART** - Transcrito regulado pela cocaína e amfetamina  
**CCK** - Colecistocinina  
**CRH** - Hormônio liberador de Corticotrofina  
**DMN** - Núcleo dorsomedial do hipotálamo  
**E2** - Estradiol  
**ER $\alpha$**  - Receptor estrogênico tipo  $\alpha$   
**ER $\beta$**  - Receptor estrogênico tipo  $\beta$   
**GABA** - Ácido gama-aminobutírico  
**GIRK** - Canal de potássio retificador de influxo  
**GLP 1** - Peptídeo semelhante ao glucagon  
**GPER1** - Receptor estrogênico de membrana acoplado a proteína Gs  
**Gq-mER** - Receptor estrogênico de membrana acoplado a proteína Gq  
**HL** - Hipotálamo lateral  
**i.c.v** - Intracerebroventricular  
**MCH** - Hormônio concentrador de melanina  
**MC3-R** - Receptor melanocortina subtipo 3  
**MC4-R** - Receptor melanocortina subtipo 4  
**MM77** - 1-(2-metoxifenil)-4-(4-succinimidobutil) piperazina  
**NDR** - Núcleo dorsal da rafe  
**NMR** - Núcleo mediano da rafe  
**NPY** - Neuropeptídeo Y  
**NTS** - Núcleo do trato solitário  
**OB-Rb** - Receptor da leptina  
**OXM** - Oxintomodulina  
**OVX** - Animais ovariectomizados tratados com óleo  
**OVX+E** - Animais ovariectomizados tratados com estradiol  
**PKA** - Proteína cinase A  
**POMC** - Pró-opiomelanocortina  
**PVN** - Núcleo paraventricular do hipotálamo  
**SUMO** - Proteína modificadora semelhante a ubiquitina  
**SNC** - Sistema Nervoso Central

**TRH** – Hormônio liberador de tireotrofina

**VMN** - Núcleo ventromedial do hipotálamo

**WAY 100635** – Maleato de *N*-[2-[4-(2-Metoxifenil)-1-piperazinal]etil]-*N*-2-piridinilciclohexano-carboxamida

**$\alpha$ -MSH** - Hormônio estimulante do  $\alpha$ -melanócito

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mecanismos envolvidos no controle do balanço energético.. 33
- Figura 2. Seleção de algumas estruturas cerebrais que expressam subtipos de ER e estão envolvidas com os efeitos dos estrógenos sobre os comportamentos ingestivos.. ..... 37
- Figura 3. Caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos..... 48
- Figura 4. Peso dos úteros dissecados de ratas nas fases estro e diestro, e ratas ovariectomizadas (OVX) e ovariectomizadas tratadas com E2 (OVX+E)..... 53
- Figura 5. Diagramas representativos de cortes coronais e das microinjeções no HL..... 55
- Figura 6. Efeitos da reposição com estradiol sobre a ingestão alimentar após injeções de 8-OHDPAT no hipotálamo lateral (HL) em ratas pré-tratadas com MM77 (0,37 e 3,7 nmol)..... 57
- Figura 7. Efeitos da reposição com estradiol sobre a ingestão alimentar após injeções 8-OHDPAT no hipotálamo lateral (LH) em ratas pré-tratadas com WAY100635..... 58
- Figura 8. Diagramas representativos de cortes coronais e das microinjeções que atingiram o ARC..... 68
- Figura 9. Efeitos da reposição com estradiol sobre a ingestão alimentar após injeções 8-OHDPAT núcleo arqueado (ARC) em ratas pré-tratadas com WAY 100635..... 70





## **LISTA DE QUADRO**

Quadro 1. Efeitos da ativação de receptores 5-HT1A sobre o consumo alimentar. ....	31
------------------------------------------------------------------------------------	----



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e do pré-tratamento com MM77 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas (OVX)..... 59
- Tabela 2. Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e do pré-tratamento com MM77 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E)..... 60
- Tabela 3. Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e do pré-tratamento com WAY 100635 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas (OVX)..... 61
- Tabela 4. Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e do pré-tratamento com WAY 100635 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E)..... 62
- Tabela 5. Efeitos na ingestão de água durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo MM77 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas (OVX)..... 63
- Tabela 6. Efeitos na ingestão de água durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo MM77 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E)..... 64
- Tabela 7. Efeitos na ingestão de água durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo WAY 100635 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas. .... 65
- Tabela 8. Efeitos na ingestão de água durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo WAY 100635 no hipotálamo lateral (HL) de ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E). .... 66
- Tabela 9. Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e do pré-tratamento com

WAY 100635 no núcleo arqueado (ARC) de ratas ovariectomizadas (OVX)..... 71

Tabela 10. Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e do pré-tratamento com WAY 100635 no núcleo arqueado (ARC) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E). ..... 72

Tabela 11. Efeitos na ingestão de água durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo WAY 100635 no núcleo arqueado (ARC) de ratas ovariectomizadas (OVX)..... 73

Tabela 12. Efeitos na ingestão de água durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo WAY 100635 no núcleo arqueado (ARC) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E). ..... 74

## **LISTA DE ANEXO**

**ANEXO 1.** Protocolo de aprovação do comitê de ética no uso de animais.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1 REGULAÇÃO CENTRAL DA INGESTÃO ALIMENTAR .....	26
1.1.1 <i>Papel do hipotálamo</i> .....	26
1.1.2 <i>Envolvimento de circuitos serotoninérgicos</i> .....	28
1.2 SINAIS PERIFÉRICOS NO CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR 32	
1.2.1 <i>Papel dos hormônios: CCK, grelina, leptina e insulina</i> .....	32
1.2.2 <i>Papel dos Hormônios ovarianos</i> .....	34
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
3.1 ANIMAIS .....	43
3.2 SOLUÇÕES E DOSES ADMINISTRADAS .....	43
3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	44
3.3.1 <i>Determinação do ciclo estral e Ovariectomia</i> .....	44
3.3.2 <i>Cirurgia estereotáxica</i> .....	44
3.3.3 <i>Tratamento com Estradiol</i> .....	45
3.3.4 <i>Dissecação e pesagem de úteros</i> .....	45
3.3.5 <i>Injeções Intracerebrais</i> .....	45
3.4 REALIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	46
3.4.1 <i>HL</i> .....	46
3.4.2 <i>ARC</i> .....	47
3.5 CAIXA DE REGISTRO COMPORTAMENTAL .....	47
3.6 CATEGORIAS COMPORTAMENTAIS REGISTRADAS .....	48
3.7 HISTOLOGIA .....	49
<b>4. ANÁLISE DOS DADOS</b> .....	<b>51</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
5.1 REPOSIÇÃO COM ESTRADIOL .....	53
5.2 INJEÇÕES NO HIPOTÁLAMO LATERAL .....	54
5.2.1 <i>Microinjeções</i> .....	54
5.2.2 <i>Comportamentos ingestivos</i> .....	56
5.2.3 <i>Comportamentos não ingestivos</i> .....	59
5.2.4 <i>Ingestão de água</i> .....	63

5.3 INJEÇÕES NO NÚCLEO ARQUEADO.....	67
5.3.1 <i>Microinjeções</i> .....	67
5.3.2 <i>Comportamentos ingestivos</i> .....	69
5.3.3 <i>Comportamentos não ingestivos</i> .....	71
6.1 HIPOTÁLAMO LATERAL (HL).....	75
6.2 NÚCLEO ARQUEADO (ARC).....	81
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Há muitas décadas, vários grupos de pesquisa vêm buscando desvendar os mecanismos fisiológicos envolvidos na regulação da ingestão alimentar. Muitos avanços já foram obtidos, mas a cada descoberta surgem novos questionamentos, demonstrando a complexidade desta regulação. Alguns estudos já mostraram que os mecanismos que controlam a ingestão alimentar envolvem uma complexa interação de sinais periféricos e sinais do Sistema Nervoso Central (SNC) (KENNEDY, 1953; WOODS *et al.*, 1998; SCHWARTZ *et al.*, 2000; MORAN e KINZIG, 2004; STRADER e WOODS, 2005).

Neste contexto, já está bem consolidado na literatura que o estradiol participa do controle da ingestão alimentar (DREWETT, 1973; ASARIAN e GEARY, 2006; ECKEL, 2011), pois durante o período periovulatório o aumento na concentração plasmática do estradiol provoca redução da ingestão alimentar (GONG, GARREL e CALLOWAY, 1989; LYONS *et al.*, 1989) e, ao contrário, a ovariectomia bilateral ocasiona hiperfagia (BLAUSTEIN e WADE, 1976), que pode ser revertida pela reposição com estradiol (ASARIAN e GEARY, 2002). Além disso, o estradiol parece influenciar neurônios hipotalâmicos que participam da regulação da ingestão alimentar e, desta maneira, poderia exercer seus efeitos hipofágicos (BONAVERA *et al.*, 1994; MESSINA *et al.*, 2006; SANTOLLO, TORREGROSSA e ECKEL, 2011)

Ainda, dados na literatura sugerem que o estradiol pode interagir com os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> (JACKSON e UPHOUSE, 1998; ÖSTERLUND e HURD, 1998; RAAP *et al.*, 2000; ROSSI *et al.*, 2010a; LI e MUMA, 2013). Estes receptores foram demonstrados em neurônios do ARC e do HL (COLLIN *et al.*, 2002) que participam do controle da ingestão alimentar, sugerindo que as ações do estradiol sobre a ingestão alimentar podem ser mediadas, pelo menos em parte, pela interação com estes neurônios que expressam os receptores 5-HT<sub>1A</sub> (MESSINA *et al.*, 2006; SANTOLLO e ECKEL, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

Desta forma, o desenvolvimento de novos estudos buscando desvendar as reais influências dos estrogênios sobre a circuitaria serotoninérgica, que participa do controle da ingestão alimentar, são altamente relevantes para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos que controlam a ingestão alimentar.

## 1.1 Regulação central da ingestão alimentar

### 1.1.1 Papel do hipotálamo

O hipotálamo recebe informações hormonais e neurais e responde aos níveis plasmáticos de nutrientes e às informações dos estoques de gordura. Em resposta a esses sinais, buscando manter a homeostase energética, envia sinais neurais através de vias eferentes para outras áreas cerebrais gerando alterações autonômicas e comportamentais (WOODS *et al.*, 1998; BECKER, 2001; WOODS e D'ALESSIO, 2008; HIRSCHBERG, 2012). Dentre os núcleos hipotalâmicos o núcleo arqueado (ARC) desenvolve um papel crucial na regulação da ingestão alimentar. Este núcleo recebe sinais periféricos via tronco encefálico e via barreira hematoencefálica (BROADWELL e BRIGHTMAN, 1976; NONAKA *et al.*, 2003; SMALL e BLOOM, 2004). Esses sinais modulam a atividade de neurônios presentes neste núcleo que irão projetar eferências para outros núcleos hipotalâmicos como o núcleo paraventricular (PVN), o hipotálamo lateral (HL) e o núcleo ventromedial (VMN), modulando a ingestão alimentar e o balanço energético (SCHWARTZ *et al.*, 2000; STANLEY *et al.*, 2005; BERTHOUD, 2007; VALASSI, SCACCHI e CAVAGNINI, 2008).

Hormônios como a insulina (BANKS, 2004), leptina (BANKS *et al.*, 1996), grelina (WANG, SAINT-PIERRE e TACHÉ, 2002), colecistocinina (CCK) (JOBST, ENRIORI e COWLEY, 2004), oxintomodulina (OXM), entre outros (KASTIN, AKERSTROM e PAN, 2002; NONAKA *et al.*, 2003), atravessam a barreira hematoencefálica na eminência mediana chegando ao ARC. Também, pelo tronco encefálico chegam ao ARC, principalmente, sinais oriundos do intestino por intermédio do complexo vagal dorsal (núcleo dorsal motor do vago, área postrema e núcleo do trato solitário – NTS) (SUZUKI, JAYASENA e BLOOM, 2011)

No ARC existem duas populações neuronais que apresentam ações opostas no controle da ingestão alimentar. Uma população é composta por neurônios anorexígenos que expressam peptídeos relacionados com a inibição da ingestão alimentar, co-expressando o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) e o hormônio estimulante do  $\alpha$ -melanócito ( $\alpha$ -MSH, derivado da pró-opiomelanocortina – POMC). O  $\alpha$ -MSH é um agonista dos receptores de melanocortina MC3-R e MC4-R, que quando administrado por via intracerebroventricular (i.c.v.) em ratos ocasiona redução da ingestão alimentar (POGGIOLI, VERGONI e BERTOLINI, 1986), já injeções

i.c.v. de antagonistas do MC4-R aumentam a ingestão alimentar em ratos (KASK *et al.*, 1998; SKULADOTTIR *et al.*, 1999). Mutações ou deleções de MC4-R em camundongos e em humanos resultam no desenvolvimento de fenótipo obeso, hiperfágico e hiperinsulinêmico (HUSZAR *et al.*, 1997; VAISSE *et al.*, 1998).

A outra população neuronal presente no ARC é composta por neurônios orexígenos, que expressam peptídeos relacionados com o aumento da ingestão alimentar, como o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao gene *agouti* (AgRP) (CONE *et al.*, 2001). Interessantemente, quando os neurônios NPY são ativados liberam localmente o neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA), para inibir os neurônios que expressam POMC. Também, este grupo neuronal é considerado um dos principais alvos de hormônios que regulam a ingestão alimentar, como a insulina, leptina, grelina e CCK (JOBST, ENRIORI e COWLEY, 2004).

Neurônios que expressam NPY projetam-se do ARC para o PVN (O'DONOHUE *et al.*, 1985). Esta via ARC-PVN-neurônios NPY é ativada durante o jejum em resposta a sinais relacionados com redução dos estoques corporais de gordura, ocasionando aumento da expressão do gene NPY em neurônios do ARC que acarreta aumento da liberação de NPY no PVN, promovendo o aumento na ingestão alimentar (KALRA *et al.*, 1991). Além disso, o PVN também recebe projeções de neurônios anorexígenos do ARC que expressam POMC (KISS, CASSELL e PALKOVITS, 1984). O PVN, por sua vez, possui neurônios que expressam o hormônio liberador de corticotropina (CRH), que se projetam à eminência mediana (VANDESANDE, MEY e DIERICKX, 1974; WHITNALL, 1993) e podem inibir os neurônios que expressam NPY no ARC, levando à redução na ingestão alimentar. Cowley *et al.* (1999) demonstraram que neurônios presentes no PVN são capazes de detectar e integrar sinais orexígenos e anorexígenos. Em ratos, microinjeções de NPY no PVN estimulam a ingestão alimentar, da mesma forma que injeções i.c.v. de AgRP também estimulam a ingestão alimentar (STANLEY, 1993; ROSSI *et al.*, 1998).

Outro núcleo hipotalâmico que recebe aferências de neurônios NPY/AgRP e POMC do ARC é o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMN) (HEIDEL, PLAGEMANN e DAVIDOWA, 1999). Esse núcleo apresenta conexões diretas com o PVN, o HL e com o núcleo dorsomedial (DMN) (BERNARDIS, 1975). O VMN apresenta grande expressão de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), que também participa da regulação da ingestão alimentar, pois camundongos

com expressão reduzida de receptor para BDNF apresentam hiperfagia e aumento do peso corporal (RIOS *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2003).

Ainda, estudos imunohistoquímicos mostraram a presença de projeções de neurônios NPY, AgRP, e POMC oriundos do ARC, em terminações neuronais no HL que estão em contato com neurônios que expressam o hormônio concentrador de melanina (MCH) e orexina (BROBERGER *et al.*, 1998; ELIAS *et al.*, 1998; HORVATH, DIANO e VAN DEN POL, 1999; MARSH *et al.*, 2002). A administração i.c.v. em ratos de MCH aumenta a ingestão alimentar (QU *et al.*, 1996, ROSSI, CHOI, O'SHEA, *et al.*, 1997) e o tratamento com antagonista do receptor MCH-1 provoca inibição da ingestão alimentar induzida pela administração central de MCH (BOROWSKY *et al.*, 2002). Em camundongos, a deleção do gene MCH provoca redução na ingestão alimentar, no peso corporal, na concentração plasmática de leptina e redução na expressão de NPY no ARC (SHIMADA *et al.*, 1998; MARSH *et al.*, 2002).

Além dos neurônios que expressam MCH, o HL também possui populações neuronais que expressam orexinas (A e B) (DE LECEA *et al.*, 1998; SAKURAI *et al.*, 1998). Estes neurônios projetam uma ampla rede de eferências no SNC, com destaque para o ARC, PVN e NTS (DE LECEA *et al.*, 1998; PEYRON *et al.*, 1998). Estudo realizado por Haynes *et al.* (1999) demonstrou que injeções i.c.v. de orexina A ocasionam hiperfagia em ratos.

Alguns trabalhos também sugerem que o HL também esteja relacionado com comportamentos motivacionais e de recompensa e, que estes comportamentos seriam resultado da ativação de neurônios presentes neste núcleo que se projetam para o sistema dopaminérgico mesolímbico (PHILLIPSON, 1979; GEISLER e ZAHM, 2005). Maldonado-Irizarry *et al.* (1995) sugeriram a existência de uma relação funcional entre o núcleo accumbens shell (AcbSh) e o LH, pois o AcbSh envia projeções GABAérgicas para o HL e acredita-se que existam conexões recíprocas entre estes dois núcleos que afetam a palatibilidade dos alimentos e a motivação por alimentos (para uma revisão, KELLEY, 2004).

### 1.1.2 Envolvimento de circuitos serotoninérgicos

Já está bem consolidado na literatura que a 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) exerce efeitos inibitórios sobre a ingestão alimentar (BLUNDELL, 1984; 1986; DOURISH, HUTSON e CURZON, 1985; MONTGOMERY, FLETCHER e BURTON, 1986; CURRIE e COSCINA, 1993). Vários trabalhos têm sugerido que estes efeitos

anorexígenos da 5-HT estão associados com sua capacidade de interagir com o sistema melanocortina. Este sistema é composto por neurônios que expressam POMC e que após clivagem originam  $\alpha$ -MSH que, por sua vez, ativa os receptores MC4R que são expressos em uma população neuronal secundária localizada no PVN e no HL (GARFIELD *et al.*, 2009). A inativação genética dos receptores MC4R ocasiona hiperfagia e aumento do peso corporal (COLL *et al.*, 2006). Além disso, fármacos como a fluoxetina, sertralina e outros inibidores seletivos da recaptação de 5-HT, demonstraram-se como potenciais redutores da ingestão alimentar (POLLOCK e ROWLAND, 1981; WONG, REID e THRELKELD, 1988; SIMANSKY e VAIDYA, 1990).

A população neuronal serotonérgica em núcleos hipotalâmicos que participam do controle da ingestão alimentar, como o ARC, PVN e HL, emerge de projeções serotonérgicas dos núcleos mediano (NMR) e dorsal da rafe (NDR) (SAWCHENKO *et al.*, 1983; WILLOUGHBY e BLESSING, 1987; PETROV, KRUKOFF e JHAMANDAS, 1992), e o efeito hipofágico da 5-HT e de seus agonistas parece ser mediado por diversos subtipos de receptores pós-sinápticos localizados nos circuitos hipotalâmicos (BOVETTO e RICHARD, 1995).

Até o momento foram descritas sete classes de receptores da 5-HT, classificados como 5-HT<sub>1</sub>(1A, 1B, 1C, 1E, 1F), 5-HT<sub>2</sub>(2A, 2B, 2C), 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>(5A, 5B), 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub>. Todos esses receptores pertencem à classe de receptores acoplados à proteína G, com exceção do receptor 5-HT<sub>3</sub> que está ligado a um canal iônico (HOYER *et al.*, 1994; BARNES e SHARP, 1999). Dentre estes sub-tipos, ganham destaque no controle da ingestão alimentar os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>. Inúmeros estudos em ratos e em camundongos demonstram que a ativação dos receptores 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> reduzem a ingestão alimentar (HALFORD e BLUNDELL, 1996; DE VRY e SCHREIBER, 2000; HEWITT *et al.*, 2002; DALTON *et al.*, 2006).

Heisler *et al.* (2006) sugerem que a hipofagia ocasionada pela ativação dos receptores 5-HT<sub>1B</sub> possa ser explicada pelo fato que neurônios AgRP no ARC expressam estes receptores, e quando eles são ativados inibem a expressão deste neuropeptídeo orexígeno, suprimindo a inibição GABAérgica sobre os neurônios POMC, reduzindo a ingestão alimentar. Ao contrário, os receptores 5-HT<sub>2C</sub> são expressos nos neurônios anorexígenicos (POMC) do ARC e a ativação destes receptores ativa estes neurônios promovendo a redução da ingestão alimentar.

Porém, os efeitos da ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> sobre a ingestão de alimento são um pouco mais complexos. Em mamíferos

estes receptores foram subdivididos em dois grupos: pré-sinápticos (também chamados de autoreceptores somatodendríticos) e pós-sinápticos. Os autoreceptores somatodendríticos estão localizados nos dendritos e corpo celular de neurônios serotoninérgicos localizados nos núcleos da rafe, principalmente no NDR e NMR (CHALMERS e WATSON, 1991; KIA *et al.*, 1996; ADELL *et al.*, 2002), onde operam como sensores e respondem diminuindo a liberação de 5-HT e o disparo das células serotoninérgicas quando a concentração de 5-HT no espaço extracelular torna-se excessiva (ADELL e ARTIGAS, 1998; ADELL *et al.*, 2002). Os receptores pós-sinápticos estão presentes em várias áreas cerebrais como: hipocampo, córtex entorrinal e frontal, septum lateral, amígdala (HJORTH e SHARP, 1991; BARNES e SHARP, 1999) e em vários núcleos hipotalâmicos como ARC, HL, PVN, VMN (COLLIN *et al.*, 2002).

O emprego de agonistas do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, como o 8-OHDPAT pode ocasionar hipo ou hiperfagia. Em animais machos saciados a administração deste agonista provoca hiperfagia (DOURISH, HUTSON e CURZON, 1985, 1988; CURRIE e COSCINA, 1993; COSCINA *et al.*, 2000; EBENEZER e SURUJBALLY, 2007) e em animais privados de alimentos promove hipofagia (EBENEZER, PARROTT e VELLUCCI, 1999; ARKLE e EBENEZER, 2000; EBENEZER, VELLUCCI e PARROTT, 2001; EBENEZER e TITE, 2003; EBENEZER, ARKLE e TITE, 2007; LÓPEZ-ALONSO *et al.*, 2007). No Quadro 1 estão os resultados de importantes trabalhos que demonstraram os efeitos do agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> sobre a ingestão alimentar, especificando as vias de administração, os animais e os efeitos causados por injeções de 8-OHDPAT.

Quadro 1. Efeitos da ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> sobre o consumo alimentar.

Ativação receptor	Alimento	Animais/via/estado nutricional	Autores
5-HT <sub>1A</sub>	Aumento	Ratos/ip/saciados	Dourish et al., 1985
		Ratos/sc/saciados	Gilbert e Dourish, 1987
		Ratos/sc/saciados	Dourish et al., 1988
		Ratos/NDR/NMR/saciados	Currie e Coscina, 1993
		Ratos/pBLA/saciados	Coscina et al., 2000
		Ratos/pBLA/saciados	Parker e Coscina, 2001
		Camundongo/sc/saciados	Ebenezer e Surujbally, 2007
5-HT <sub>1A</sub>	Redução	Porcos/iv/jejum	Ebenezer et al., 1999
		Ratos/sc/jejum	Arkle e Ebenezer, 2000
		Porcos/iv/jejum	Ebenezer et al., 2001
		Ratos/ip/jejum	Ebenezer e Tite, 2003
		Ratos/sc/jejum	Ebenezer et al., 2007
		Ratos/PVN/jejum	López-Alonso et al., 2007

Abreviações: ip = administrações intraperitoniais, sc = administrações subcutâneas, NDR = núcleo dorsal da rafe, NMR = núcleo mediano da rafe, pBLA= amígdala basolateral e PVN = núcleo paraventricular do hipotálamo. Adaptado de Steffens *et al*, 2009.

Collin *et al.* (2002) demonstraram imunorreatividade para receptores 5-HT<sub>1A</sub> no ARC, em neurônios orexígenos (NPY e AgRP) e anorexígenos (POMC). No HL, estes pesquisadores mostraram imunorreatividade para este receptor em neurônios orexígenos, que expressam MCH e orexina. Estes dados sugerem que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> podem integrar o circuito serotoninérgico que controla a ingestão alimentar nestes neurônios localizados no ARC e no HL.

## 1.2 Sinais periféricos no controle da ingestão alimentar

### 1.2.1 Papel dos hormônios: CCK, grelina, leptina e insulina

Como citado anteriormente, vários hormônios produzidos periféricamente participam do controle da ingestão alimentar. Quando o duodeno detecta a presença de lipídeos ou proteínas no quimo ocorre a secreção de CCK que, via receptores CCK-1 no nervo vago, envia sinais a neurônios do NTS influenciando o tamanho da refeição. A administração em humanos de agonista dos receptores CCK-1 reduz a ingestão alimentar, e a administração de um antagonista destes receptores aumenta a ingestão alimentar (LIEVERSE *et al.*, 1994; BEGLINGER *et al.*, 2001)

Outro hormônio que apresenta grande participação na regulação da ingestão alimentar é a grelina. Este hormônio produzido no estômago é conhecido por estimular a ingestão alimentar, apresentando picos na concentração plasmática durante o jejum (CUMMINGS *et al.*, 2001). Em ratos, administrações centrais e periféricas aumentam a ingestão alimentar e o peso corporal (OKADA *et al.*, 1996), além de induzir a expressão de c-fos nos neurônios orexígenos NPY do ARC (DICKSON e LUCKMAN, 1997). A grelina exerce seus efeitos orexígenos através de sua ação direta no ARC, ligando-se aos receptores presentes nos neurônios NPY, ou pode também sinalizar seus efeitos via nervo vago para o NTS (DATE *et al.*, 2002).

Também, sinais representativos da massa de gordura corporal, como a leptina e insulina, chamados de sinais de adiposidade, possuem grande participação no controle da ingestão alimentar. A leptina é produzida principalmente nos adipócitos e seus receptores (LepRb) são altamente expressos em diferentes núcleos hipotalâmicos e outras regiões do SNC envolvidas na homeostase energética (ELMQUIST *et al.*, 1998). No ARC, os LepRb estão presentes nos neurônios que expressam neuropeptídeos anorexígenos e orexígenos (ELIAS *et al.*, 1999; COWLEY *et al.*, 2001). Quando a leptina liga-se a estes receptores estimula a transcrição do neuropeptídeo POMC, a despolarização dos neurônios POMC, aumenta o processamento e secreção de  $\alpha$ -MSH (COWLEY *et al.*, 2001; STUART *et al.*, 2004), além de atenuar a expressão e liberação de NPY e AgRP (MIZUNO e MOBBS, 1999).

Assim como a leptina, a insulina também pode agir como um sinal anorético no SNC. Estudos mostram que administrações i.c.v. ou



intra-hipotalâmicas de insulina reduzem a ingestão alimentar em ratos e primatas (AIR *et al.*, 2002). Além disso, os receptores da insulina também são expressos nos neurônios AgRP e POMC do ARC (BENOIT *et al.*, 2002) e a ligação da insulina a estes receptores provoca redução na expressão de NPY e aumento nos níveis de POMC no ARC, ou seja, exercendo efeitos anorexígenos (SCHWARTZ *et al.*, 1992; BENOIT *et al.*, 2002).

Como mostra a Figura 1 vários outros peptídeos também são sugeridos participar da regulação alimentar, como o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), o peptídeo YY (PYY), glucagon, amilina, oxintomodulina, hormônio liberador de corticotropina (CRH), o hormônio liberador de tireotropina (TRH), entre outros (para revisão BOGUSZEWSKI e VAN DER LELY, 2014).

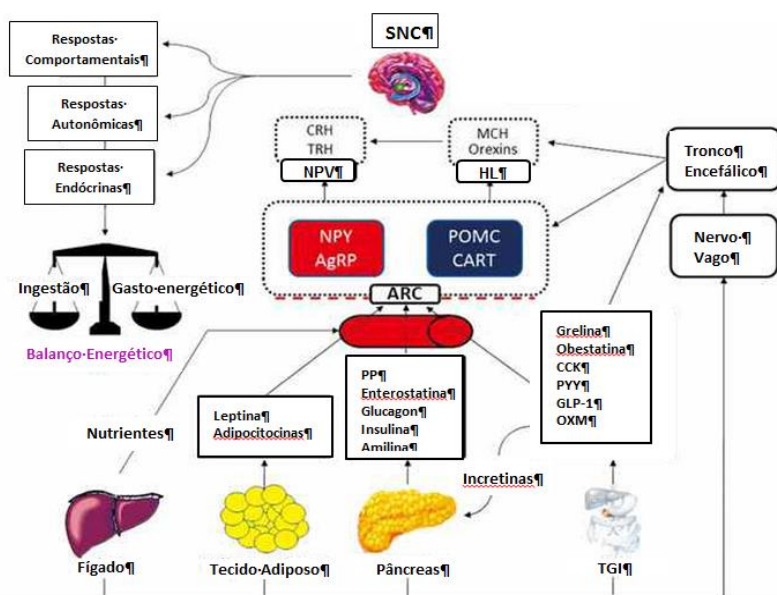


Figura 1. Mecanismos envolvidos no controle do balanço energético.

O balanço entre a ingestão alimentar e o gasto energético é regulado pelo SNC, que integra informações oriundas do meio externo e interno, como sinais periféricos (nutrientes e hormônios) do fígado, tecido adiposo, pâncreas e trato gastrointestinal (TGI). Estes sinais são enviados as duas populações neuronais do ARC: NPY/AgRP (neurônios orexínicos) e POMC/CART (neurônios

anorexígenos). Do ARC partem circuitos neuronais para outros núcleos hipotalâmicos, como o HL e NPV, estimulando ou inibindo vias anabólicas ou catabólicas. Sinais periféricos podem também atingir o SNC por ligação a receptores específicos localizados em neurônios aferentes vagais e tronco cerebral. Análises cerebrais destas informações resultam em respostas comportamentais, autonômicas e endócrinas para manter o balanço energético. NPY, neuropeptídeo Y, AgRP, proteína relacionada ao gene agouti, POMC, pró-opiomelanocortina, CART, transcrito regulado pela cocaína e anfetamina, PP, polipeptídeo pancreático, CCK, colecistocinina, PPY, peptídeo YY, GLP-1, peptídeo semelhante ao glucagom, OXM, oxintomodulina, CRH, hormônio liberador de corticotropina, TRH, hormônio liberador de tireotropina, MCH, hormônio concentrador de melanina, SNC, sistema nervoso central, GIT, trato gastrointestinal, ARC, núcleo arqueado, HL, hipotálamo lateral, PVN, núcleo paraventricular. Adaptado de Boguszewski e Van Der Lely, 2014.

### 1.2.2 Papel dos Hormônios ovarianos

Acrescentando complexidade ao controle da ingestão alimentar, alguns estudos sugerem que as alterações fisiológicas na concentração dos hormônios ovarianos, que ocorrem durante o ciclo estral em ratas, parecem influenciar os circuitos serotoninérgicos que controlam a ingestão alimentar (BUFFENSTEIN *et al.*, 1995; DYE e BLUNDELL, 1997; STEFFENS *et al.*, 2008, 2010).

Em ratas os ciclos ovarianos são de 4-5 dias, e apresentam quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro. Estas fases podem ser determinadas por esfregaços vaginais, que permitem a visualização dos tipos celulares e determinação da fase estral (EVANS e LONG, 1922; MARCONDES, BIANCHI e TANNO, 2002). Durante a fase proestro, quando ocorre o pico de liberação de estradiol, ocorre redução na ingestão alimentar diária (GONG, GARREL e CALLOWAY, 1989; LYONS *et al.*, 1989; ECKEL, HOUPPT e GEARY, 2000; ASARIAN e GEARY, 2006). Na verdade os níveis de estradiol começam a aumentar em metaestro, atingindo o pico durante proestro e retornando aos valores basais em estro. Porém, os efeitos fisiológicos deste pico de estradiol em proestro perduram por mais ou menos 12 horas, fazendo com que as alterações na ingestão alimentar, ocasionadas por este pico de estradiol, ainda sejam observadas na fase estro.

A ovariectomia bilateral em ratas provoca aumento na ingestão alimentar diária, na adiposidade e promove ganho de peso corporal (WADE, 1975; BLAUSTEIN e WADE, 1976; VARMA *et al.*, 1999). Estas alterações podem ser revertidas pela reposição somente com estradiol (GEARY e ASARIAN, 1999, ASARIAN e GEARY, 2002). A reposição em um regime fisiológico com progesterona sozinha não é

capaz de atenuar a hiperfagia induzida pela ovariectomia, e também não altera a hipofagia ocasionada pela reposição do estradiol nas ratas OVX (GRAY e WADE, 1981; VARMA *et al.*, 1999).

Assim, diante da redução da ingestão alimentar durante proestro/estro e do aumento na ingestão após ovariectomia, foi sugerido que o estradiol exerce efeitos inibitórios fásicos e tônicos sobre a ingestão alimentar. O controle fásico estaria correlacionado com flutuações na concentração plasmática de estradiol durante o ciclo estral, e o efeito tônico com o aumento na ingestão alimentar diária, evidenciado pela ovariectomia, que excede o consumo diário quando comparado a ratas intactas ciclando normalmente, mesmo na fase diestro (WADE, 1975; BLAUSTEIN e WADE, 1976; VARMA *et al.*, 1999).

Muitos trabalhos têm sugerido que as ações do estradiol sobre a ingestão alimentar possam ser consequência de suas influências sobre neurônios hipotalâmicos que participam do controle da ingestão (BONAVERA *et al.*, 1994; MESSINA *et al.*, 2006; ACOSTA-MARTINEZ, HORTON e LEVINE, 2007). Bonavera *et al.* (1994) demonstraram que o tratamento de animais ovariectomizados com estradiol diminui os níveis hipotalâmicos de NPY no PVN. Outro estudo mostrou que a deficiência de estradiol leva a um aumento na expressão de NPY no ARC (AKABAYASHI *et al.*, 1994). Além disso, foi sugerido que a redução na ingestão alimentar durante proestro poderia ser mediada por uma redução na sinalização do MCH no HL (HERVIEU *et al.*, 2000; MESSINA *et al.*, 2006).

Ainda, acredita-se que o estradiol potencialize os efeitos inibitórios da leptina sobre a ingestão alimentar (CLEGG *et al.*, 2006), pois quando os níveis de estrogênios estão baixos, a sensibilidade central à leptina é reduzida, como ocorre nos animais ovariectomizados (AINSLIE *et al.*, 2001), porém quando estes níveis aumentam a sensibilidade à leptina também é aumentada (CLEGG *et al.*, 2003). Esta hipótese de que o estradiol potencializa os efeitos da leptina é reforçada pelo fato de que a expressão de receptores da leptina (OB-Rb) estarem co-localizados com receptores de estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) no ARC (MERCER *et al.*, 1996; DIANO, KALRA e HORVATH, 1998). Além disso, os estrógenos também aumentam a potência dos sinais de saciedade induzidos pela CCK, fazendo com que a duração da ingestão seja reduzida, ou seja, antecipando o final da refeição. Na verdade, os estrógenos aumentam a sensibilidade dos receptores vagais CCK-A, sem alterar a secreção e o número de receptores deste hormônio (LINDÉN *et*

*al.*, 1990; BUTERA, BRADWAY e CATALDO, 1993; GEARY, SMITH e CORP, 1996; GEARY e ASARIAN, 1999).

Até meados da década de 90, acreditava-se existir apenas um subtipo de ER (ER $\alpha$ ) presente exclusivamente no núcleo das células, através do qual os estrógenos exerciam suas ações (O'LONE *et al.*, 2004; HELDRING *et al.*, 2007). Posteriormente, foi descoberto outro subtipo, o ER $\beta$  (KUIPER *et al.*, 1996; KUIPER e GUSTAFSSON, 1997). Estes dois tipos de ER são expressos em algumas áreas cerebrais envolvidas com a regulação da ingestão alimentar, como o NTS, HL, ARC entre outros (SHUGHRUE, LANE e MERCHANTHALER, 1997). Mais recentemente, foram identificados ERs associados à membrana, como o receptor estrogênico acoplado a proteína Gs (GPER-1, chamado inicialmente de GRP30) e o receptor estrogênico acoplado a proteína Gq (Gq-mER) (REVANKAR *et al.*, 2005; THOMAS *et al.*, 2005). GPER-1 ativa sinalização intracelular através da estimulação da adenilil ciclase (SRIVASTAVA e EVANS, 2013) e, assim como os ER $\alpha$  e ER $\beta$ , também são expressos em áreas cerebrais envolvidas com o controle da ingestão alimentar (BRAILOIU *et al.*, 2007; SPARY *et al.*, 2013). Os Gq-mERs parecem ativar vias de sinalização intracelulares envolvendo a proteína cinase C (PKC) e proteína cinase A (PKA), que atenuam a ativação de canais iônicos ligados a proteínas G (GIRK) em receptores GABA<sub>B</sub> receptores (QIU *et al.*, 2006) e, conseqüentemente, atenuam a inibição sobre os neurônios POMC. As expressões dos diferentes tipos de ERs em algumas áreas cerebrais, que estão envolvidas com a ingestão alimentar, podem ser observadas na Figura 2.

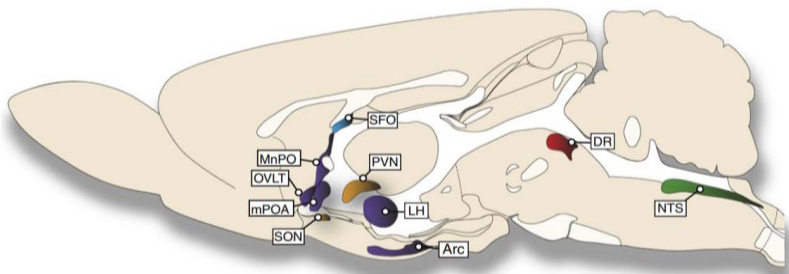


Figura 2. Seleção de algumas estruturas cerebrais que expressam subtipos de ER e estão envolvidas com os efeitos dos estrógenos sobre os comportamentos ingestivos. “A” expressão de RNAm de subtipos de ER em cada área do cérebro de rato é indicada pela cor da estrutura. SFO expressa somente ER $\alpha$  (azul), DR expressa somente ER $\beta$  (vermelho), MnPO, OVLT, mPOA, LH e ARC expressam ambos ER $\alpha$  e ER $\beta$  (púrpura). ER $\beta$  e GPER-1 são expressos no PVN e SON (laranja). ER $\alpha$ , ER $\beta$  e GPER-1 são expressos no NTS (verde). Legenda: SFO = órgão subfornical; MnPO = núcleo pré-óptico medial; OVLT = órgão vasculoso da lâmina terminal; mPOA = área pré-óptica medial; LH = hipotálamo lateral; ARC = núcleo arqueado; PVN = núcleo paraventricular, SON = núcleo supra-óptico; NTS = núcleo do trato solitário, DR = núcleo dorsal da raphe. Adaptado de Santollo e Daniels, 2015.

Alguns estudos sugerem que a ativação dos receptores ER $\alpha$  seja necessária para os efeitos anorexígenos do estradiol em ratas (HEINE *et al.*, 2000; ROESCH, 2006; SANTOLLO, WILEY e ECKEL, 2007). Porém, outros trabalhos sugeriram a participação de ER $\beta$  intermediando os efeitos anorexígenos do estradiol (LIANG *et al.*, 2002; GONZALES, TETEL e WAGNER, 2008). Estes dados claramente demonstram a necessidade de novos estudos buscando esclarecer as reais participações, exclusivas ou não, dos diferentes tipos de ER na regulação da ingestão alimentar. Um fato que chama a atenção é que receptores Gq-mER são expressos na membrana celular de neurônios POMC, dopaminérgicos e GABAérgicos no ARC (QIU *et al.*, 2006; ROEPKE, RONNEKLEIV e KELLY, 2011) demonstrando que, provavelmente, estes receptores também devam estar relacionados com o controle da ingestão alimentar.

Além disso, foi sugerido que o estradiol pode regular a sinalização serotoninérgica através dos receptores 5-HT $_{1A}$  (JACKSON e UPHOUSE, 1998; ÖSTERLUND e HURD, 1998; RAAP *et al.*, 2000; LU e BETHEA, 2002; ROSSI *et al.*, 2010a; LI *et al.*, 2013; LI e MUMA, 2013). Essa hipótese é sustentada pelo fato de ter sido

verificado imunorreatividade destes receptores em neurônios que expressam NPY e POMC no ARC e, em neurônios que expressam MCH e orexina no HL (COLLIN *et al.*, 2002), ou seja, em duas áreas hipotalâmicas envolvidas com o controle da ingestão alimentar onde há presença de receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$  e Gq-mER. Reforçando todas estas evidências, vários grupos de pesquisa têm mostrado que o estradiol exerce suas ações, sobre a ingestão alimentar, por meio de alterações nesses neuropeptídeos hipotalâmicos presentes nestas áreas (MUSCHAMP e HULL, 2007; MALYALA *et al.*, 2008; TITOLO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 2013).

A ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> inibe a ativação intracelular da adenilil ciclase através de ações em proteínas Gi/o reduzindo a atividade neuronal serotoninérgica (HANNON e HOYER, 2008). Raap *et al.* (2000), demonstraram que os estrógenos induzem redução nos níveis hipotalâmicos das proteínas Gz, Gi1 e Gi3 e, portanto, este poderia ser um dos mecanismos pelos quais o estradiol induziria dessensibilização dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Foi sugerido também, que o estradiol poderia potencializar a sumoilação (modificação translacional do receptor, SUMO1-5HT<sub>1A</sub>-receptor) causada pela estimulação aguda do agonista 8-OHDPAT no hipotálamo de ratos. A sumoilação desses receptores induzida pelo agonista poderia contribuir para dessensibilização dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, mediada pela internalização deste receptor. Além disso, a interação de proteínas SUMO1 com receptores 5HT<sub>1A</sub> induz redução da afinidade do receptor 5-HT<sub>1A</sub> pelo agonista 8-OHDPAT (LI e MUMA, 2013). Portanto, é possível que a dessensibilização dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> induzida pelo estradiol reduza a resposta hiperfágica ocasionada pela ativação sistêmica desses receptores.

Como injeções sistêmicas do agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (8-OHDPAT) provocam uma resposta hiperfágica nos animais ovariectomizados que é revertida pelo tratamento com estradiol (SALAMANCA e UPHOUSE, 1992) e, como em animais intactos a administração s.c. deste agonista produz uma hiperfagia mais pronunciada na fase diestro (UPHOUSE, SALAMANCA e CALDAROLA-PASTUSZKA, 1991), pode ser sugerido que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> façam parte dos circuitos serotoninérgicos que controlam a ingestão alimentar, e que o estradiol, pelo menos em parte, exerça suas ações neste circuito através da interação com os receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

Buscando verificar os efeitos da ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> do ARC e no HL sobre a ingestão de alimento, assim como, a presença de uma possível influência das variações cíclicas dos hormônios

ovarianos sobre esses receptores serotoninérgicos, estudos conduzidos no laboratório de Controle da Ingestão Alimentar e do Metabolismo Energético, coordenado pela professora Dra Marta Aparecida Paschoalini, demonstraram que injeções do agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (8-OHDPAT) no ARC provocam hipofagia e redução da duração da ingestão somente durante a fase estro, sugerindo que os hormônios ovarianos podem afetar a influência de mecanismos serotoninérgicos sobre os neurônios peptidérgicos do ARC que participam da regulação da ingestão alimentar. Todavia, injeções de 8-OHDPAT no HL ocasionaram redução da ingestão alimentar em ambas as fases do ciclo estral (diestro e estro), porém neste núcleo foi observada redução na duração da ingestão alimentar somente na fase estro (STEFFENS *et al.*, 2008). Desta forma, a sugestão de que hormônios ovarianos influenciariam a sensibilidade de receptores serotoninérgicos no HL foi evidenciada apenas pela redução na duração da ingestão alimentar em estro. Mas, experimentos subsequentes mostraram que a hipofagia induzida pelo 8-OHDPAT foi acompanhada por redução na duração da ingestão em ambas as fases do ciclo estral (STEFFENS *et al.*, 2010).

Sendo assim, dando continuidade a esta linha de pesquisa que investiga o controle da ingestão alimentar e metabolismo energético, esta tese de doutorado propôs-se: 1) consolidar a influência dos níveis plasmáticos de estrogênios sobre o controle exercido pela serotonina nos neurônios peptidérgicos do ARC; e 2) determinar se as flutuações plasmáticas dos estrogênios afetam a resposta ingestiva induzida pela administração de 8-OHDPAT no HL. Para isso, os experimentos foram realizados em ratas castradas com ou sem a reposição com estradiol e posteriormente tratadas com 8-OHDPAT ARC ou no HL.





## 2. OBJETIVOS

### 2.1. *Objetivo Geral*

O presente trabalho teve dois objetivos principais: 1) determinar se no HL o estradiol influencia os circuitos serotoninérgicos que participam do controle da ingestão alimentar; e 2) consolidar a influência das flutuações estrogênicas sobre o circuito serotoninérgico que participa do controle da ingestão alimentar no ARC.

### 2.2. *Objetivos Específicos*

✓ Avaliar os efeitos da reposição com estradiol sobre a resposta ingestiva obtida após injeções de 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina (8-OHDPAT, agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>) no HL e ARC em ratas OVX e OVX+E;

✓ Avaliar os efeitos da reposição com estradiol sobre as respostas ingestivas obtidas após o pré-tratamento do HL com os antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>: maleato de N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil] etil]-N-(2-piridinil) ciclohexano carboxamida (WAY100635) e 1-(2-metoxifenil)-4-(4-succinimidobutil) piperazina) (MM77) em ratas OVX e OVX+E;

✓ Avaliar os efeitos da reposição com estradiol sobre as respostas ingestivas obtidas após o pré-tratamento do ARC com o antagonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>: maleato de N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil] etil]-N-(2-piridinil) ciclohexano carboxamida (WAY100635) em ratas OVX e OVX+E;

✓ Avaliar os efeitos do estradiol, após injeções de agonista e antagonistas no LH e ARC, sobre a ingestão de água (quantidade ingerida, duração da ingestão e latência para iniciar a resposta de consumo), bem como nas durações dos comportamentos não ingestivos (exploração vertical, autolimpeza, locomoção, imobilidade, exploração não locomotora, exploração de alimento).



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC), protocolo de pesquisa número 00755/CEUA. (ANEXO 1)

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em acordo com os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

#### 3.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), peso corporal entre 200 e 250g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, adaptadas durante sete dias às condições ambientais do biotério setorial, com temperatura controlada entre  $21 \pm 2^\circ$  C, e um ciclo claro-escuro de 12 horas (luz das 7:00 – 19:00 horas). Foram mantidos cinco animais por caixas de polipropileno (49 X 34 X 16 cm) forradas com maravalha, dispondo de água e ração granulada (CR-1, Nuvilab -Nuvital Nutrientes, Brasil) *ad libitum*. Durante este período os animais foram manipulados somente durante a limpeza das caixas, a cada dois dias, e mantidos sobre condições padrões.

#### 3.2 Soluções e doses administradas

Para realização dos experimentos foram empregadas as seguintes soluções:

- ✓ Solução Salina 0,9% (sal)
- ✓ Ácido Ascórbico pH=7,0 (ác asc)
- ✓ 8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina (8-OHDPAT): agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>7</sub>, na dose de 6 nmol.
- ✓ 1-(2-metoxifenil)-4-(4-succinimidobutil) piperazina (MM 77): antagonista dos receptores 5HT<sub>1A</sub>, nas doses de 0,37 e 3,7 nmol.
- ✓ Maleato de N-[2-[4-(2-Metoxifenil)-1-piperazinal]etil]-N-2-piridinilciclohexanocarbo-xamida (WAY 100635): antagonista seletivo de receptor 5-HT<sub>1A</sub> na dose de 0,37 nmol

As doses empregadas estão embasadas em estudos empregando injeções locais de 8-OHDPAT (STEFFENS *et al.*, 2008, 2010), de MM77 (WESOLOWSKA, PALUCHOWSKA e CHOJNACKA-WÓJCIK, 2003) e WAY 100635 (SOARES e ZANGROSSI JR, 2004).

### 3.3 Procedimentos experimentais

#### 3.3.1 Determinação do ciclo estral e Ovariectomia

Os animais tiveram seus ciclos estrais monitorados através do esfregaço vaginal, coletado diariamente das 8-9h da manhã, durante sete dias após sua chegada do Biotério Central. Com auxílio de uma pipeta de plástico foi inserido no intróito vaginal de cada rata 10  $\mu$ L de solução salina (NaCl 0,9%). O fluido vaginal obtido foi analisado ao microscópio óptico, com lentes objetivas de 10 e 40x e a fase estral determinada (LONG e EVANS, 1922; MANDL, 1951). Apenas as ratas que apresentaram ciclos estrais regulares, durante este período foram ovariectomizadas. Para realizar a ovariectomia estes animais foram anestesiadas com xilazina e cetamina (13mg/ Kg de xilazina, 87 mg/ Kg cetamina, i.p. - Laboratório König, S.A.), após foi realizada tricotomia no dorso do animal, seguido de assepsia local com álcool iodado e posterior incisão longitudinal, seguida de pequenas incisões na musculatura dorsal, lateralmente. Com o auxílio de uma pinça, os ovários foram identificados e removidos. Após este procedimento, a musculatura foi aproximada com fio catégute simples 4-0, e a pele suturada com fio de nylon 3-0. Todo o material utilizado para o procedimento cirúrgico era submetido à esterilização. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais retornavam ao biotério.

#### 3.3.2 Cirurgia estereotáxica

Decorridos sete dias da ovariectomia, foram implantadas as cânulas-guia. Inicialmente os animais foram adaptados ao aparelho estereotáxico (Insight, modelo Insight Instruments, Ribeirão Preto, SP, BRA) tendo a cabeça fixada por intermédio de barras posicionadas nos condutos auditivos e incisivos superiores. Após, foi realizada assepsia com álcool iodado, e incisão longitudinal de aproximadamente 1cm foi realizada no escalpo com auxílio de bisturi. Então, foi marcada a posição para a perfuração e implantação da cânula-guia, de acordo com as coordenadas descritas por Paxinos e Watson (2007). Para o ARC: plano frontal (posterior a bregma) -3,6mm, plano sagital (lateral à sutura sagital) 0,2 mm e plano horizontal (abaixo da calota craniana) -7,8 mm. Para o HL: plano frontal (posterior a bregma) -3,6 mm, plano sagital (lateral a sutura sagital) 1,5 mm e plano horizontal (abaixo da calota craniana) -7,2 mm. A ponta da cânula foi posicionada 2 mm acima do ARC ou do HL, na posição previamente determinada, e para isto, foi realizado um orifício na calota craniana com aproximadamente 1mm de

diâmetro, por intermédio de uma broca esférica de uso odontológico. Na sequência a cânula-guia<sup>1</sup> foi introduzida e ancorada na calota craniana, juntamente com dois parafusos inoxidáveis de joalheiro, implantados contra lateralmente e fixados com acrílico. A cada cânula-guia foi ajustado um mandril de aço inoxidável para evitar obstrução. Ao término do procedimento cirúrgico, animais retornaram ao biotério setorial, onde foram mantidos, individualmente, em caixas de polipropileno. Após um período de recuperação de sete dias, foram iniciados procedimentos experimentais.

### *3.3.3 Tratamento com Estradiol*

Os animais foram tratados com óleo de milho (grupo controle, 100 µL/ animal) ou com cipionato de estradiol (10µg/ kg de peso corporal), por via subcutânea, durante os três dias que antecederam a realização dos experimentos, sempre no mesmo horário (14:00 – 15:00 horas). A dose de estradiol empregada foi baseada no fato de que esta dose provoca os efeitos fásicos e tônicos do estradiol sobre o tamanho da refeição (GEARY e ASARIAN, 1999). A reposição apenas com estradiol, sem progesterona, foi embasada em estudos demonstrando que o emprego do estradiol sozinho reverte a hiperfagia induzida pela ovariectomia (GEARY e ASARIAN, 1999; ASARIAN e GEARY, 2002).

### *3.3.4 Dissecção e pesagem de úteros*

Decorridos 14 dias da realização da ovariectomia, as ratas OVX e OVX+E (tratadas durante três dias com estradiol) foram anestesiadas e tiveram seus úteros dissecados. As ratas intactas tiveram seus ciclos estrais monitorados e apenas as que estavam na fase estro e diestro foram selecionadas para dissecção dos úteros. Depois de dissecados os úteros foram pesados para posterior análise.

### *3.3.5 Injeções Intracerebrais*

As injeções intracerebrais das drogas e de veículo foram realizadas por meio de uma agulha injetora (0,3 mm de diâmetro - agulha gengival 30G - Injecta Produtos Odontológicos, Brasil), que foi introduzida na cânula-guia conectada por um tubo de polietileno (PE10) a uma microseringa de Hamilton (capacidade de 1µL). A agulha injetora excedeu o tamanho da cânula-guia em 2 mm. Com o objetivo de

---

<sup>1</sup> As cânulas-guias (0,6mm de diâmetro externo e 18mm de comprimento) foram confeccionadas a partir de agulhas injetoras hipodérmicas de 23G.

minimizar variações na pressão intracerebral, as soluções foram administradas no período de 1 min, sendo o volume injetado sempre de 0,2  $\mu$ L para qualquer uma das condições de tratamento.

### **3.4 Realização dos procedimentos experimentais**

Sete dias após a implantação das cânulas-guia os animais passaram pelo processo de habituação à caixa de registro comportamental, local onde foram registrados os comportamentos no dia do experimento. Durante três dias consecutivos, pelo período de 1h/dia (09:00 às 14:00) os animais foram colocados dentro da caixa de registro comportamental contendo em seu interior um recipiente de vidro (Placa de Petri, de 5 cm de diâmetro) com 20g de ração enriquecida com sacarose 10% (FLETCHER, 1988) e uma garrafa de vidro contendo 100 mL de água. Esta ambientação dos animais à caixa de registro comportamental tem como objetivo minimizar as possíveis interferências nos comportamentos pela exposição a um novo ambiente e, também, expor os animais a dieta enriquecida com sacarose. Ao término do procedimento os animais retornavam ao biotério tendo acesso livre à ração comercial e água. Estes três dias consecutivos que antecediam o experimento coincidiam com o tratamento com estradiol (10 $\mu$ g/kg de peso corporal) ou óleo de milho (0,1 mL/ animal).

No dia seguinte ao término do período de habituação, iniciavam as injeções intracerebrais.

#### **3.4.1 HL**

Os animais OVX e OVX+E receberam injeções de:

1. Veículo (ác asc), após 7 min, veículo (ác asc)
2. Veículo (ác asc), após 7 min, 8-OHDPAT 6 nmol
3. MM77 0,37 nmol, após 7 min, veículo (ác asc)
4. MM77 0,37 nmol, após 7 min, 8-OHDPAT 6 nmol.
5. MM77 3,7 nmol, após 7 min, veículo (ác asc)
6. MM77 3,7 nmmol, após 7 min, 8-OHDPAT 6 nmol.
7. Veículo (sal), após 7 minutos, veículo (sal).
8. Veículo (sal), após 7 min, 8-OHDPAT 6 nmol.
9. WAY 100635 0,37 nmol, após 7 minutos, veículo (sal).
10. WAY 100635 0,37 nmol, após 7 minutos, 8-OHDPAT 6 nmol.

### 3.4.2 ARC

Os animais OVX e OVX+E receberam injeções de:

1. Veículo (sal), após 7 minutos, veículo (sal)
2. Veículo (sal), após 7 min, 8-OHDPAT 6 nmol.
3. WAY 100635 0,37 nmol, após 7 minutos, veículo (sal).
4. WAY 100635 0,37 nmol, após 7 minutos, 8-OHDPAT 6 nmol.

Imediatamente após as injeções no LH ou ARC, os animais foram colocados na caixa de registro comportamental por um período de 1h, onde ocorreu o registro dos comportamentos ingestivos e não ingestivos. Ao término deste período, a ração restante na caixa foi recolhida e pesada, sendo o consumo de alimento avaliado pela diferença entre a quantidade de ração inicial e final. Da mesma forma, o consumo de água foi avaliado pela diferença entre o volume final menos o inicial. Os comportamentos, durante o experimento, foram categorizados de acordo com Halfort *et al.* (1998). Todos os experimentos foram realizados entre às 09h00 e 14h00.

### 3.5 Caixa de registro comportamental

A caixa de registro comportamental era constituída de vidro transparente de 4 mm de espessura, possuindo as medidas de comprimento e de largura similares aos da caixa de hospedagem (49 X 34 cm), porém, tendo a medida de altura maior (40 cm) para evitar possíveis fugas. O chão da caixa e as três paredes laterais eram cobertas com plástico adesivo preto. Uma parede lateral da caixa era mantida com vidro transparente onde está colocado um espelho em uma angulação que não permite ao animal visualizar sua imagem refletida durante o experimento, mas que possibilita ao experimentador a visualização lateral dos seus comportamentos e o registro digitalizado dos mesmos. (Figura 3)



Figura 3. Caixa de registro dos comportamentos ingestivos e não-ingestivos.

### 3.6 *Categorias comportamentais registradas*

Os registros digitalizados foram analisados com o auxílio do software Etholog 2.25 (OTTONI, 2000). As variáveis avaliadas foram: latência (tempo, em segundos, para realizar pela primeira vez uma resposta comportamental) e duração (tempo, em segundos, de execução de determinado comportamento) dos seguintes comportamentos:

- ✓ *Ingestão do Alimento (comer)*: quando o animal se aproximava do comedouro, e efetivamente ingeria alimento sólido, com comportamentos característicos de deglutição;
- ✓ *Ingestão de Água (beber)*: quando o animal se aproximava do bebedouro e lambia diretamente sua ponta;
- ✓ *Exploração do alimento*: quando o animal cheirava ou manipulava a ração, sem realizar o ato de ingerir;
- ✓ *Exploração não locomotora*: quando o animal explorava ativamente o ambiente com a cabeça, seja cheirando o ar ou chão, sem tirar as quatro patas do local onde se encontrava;
- ✓ *Exploração vertical*: quando o animal explorava o ambiente apoiado somente nas patas traseiras, estando as patas dianteiras livres e não apoiadas no fundo da caixa (ereto);
- ✓ *Manutenção (auto limpeza)*: quando o animal apresentava comportamentos típicos de auto limpeza, como: limpar a cabeça com as patas, limpar as unhas, coçar o corpo ou genitais, morder o corpo;
- ✓ *Locomoção*: quando o animal estava deambulando pela caixa, ou realizando movimentos circulares que envolviam as quatro patas, sem apresentar qualquer outro comportamento já citado.
- ✓ *Imobilidade*: quando o animal permanecia imóvel, sem apresentar qualquer outro comportamento já citado.



✓ A frequência foi avaliada apenas para a ingestão alimentar, representando o número de vezes, durante 60 minutos, em que o animal ingeriu o alimento.

### ***3.7 Histologia***

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados e perfundidos transcardialmente com salina 0,9 %, seguida de formalina 10 %. Os encéfalos dissecados permaneceram imersos em formol 10 %, por um período sete dias. Após, passaram por banhos de sacarose e, então, foram seccionados em fatias de 50 µm de espessura, no criostato da marca Leica, modelo CM 1850 UV a uma temperatura de - 20°. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e permaneceram secando cerca de uma semana. As lâminas contendo os cortes foram coradas pelo método de Nissl e, permaneceram secando pelo mesmo período de tempo antes de serem analisadas ao microscópio. A reprodução gráfica dos cortes e dos sítios de injeção analisados ao microscópio foi realizada a partir do Atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (2007).



#### 4. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados através dos softwares Statistica 8.0 (Statsoft) e GraphPad Prism (GraphPad), empregando análise de variância (ANOVA) de duas vias usando como fator 1 os diferentes tratamentos ( veículo, 8-OHDPAT; MM77; WAY 100635) e como fator 2 a reposição com óleo ou estradiol (OVX; OVX+E). Para análise dos pesos uterinos foi empregado análise de variância (ANOVA) de uma via. Todos estes testes foram seguidos, quando apropriados, por teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Somente valores de probabilidade (p) menores do que 5% foram considerados significantes.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Reposição com estradiol

Os resultados mostraram que existem diferenças significantes entre os pesos dos úteros dissecados ( $F_{3,20} = 186,3$ ;  $p < 0.0001$ ), sendo que as ratas OVX apresentaram pesos uterinos que foram significativamente menor em comparação as ratas OVX+E e intactas na fase estro. Porém, os pesos uterinos das ratas OVX não apresentaram diferenças significantes em relação às ratas intactas em diestro. As ratas OVX+E apresentaram pesos uterinos semelhantes às ratas intactas em estro. (Figura 4)

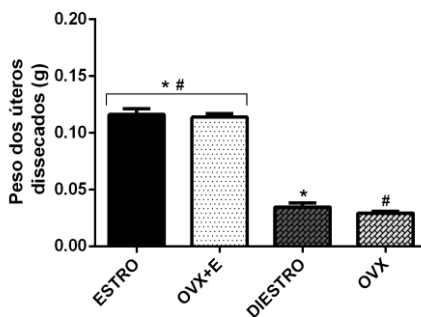


Figura 4. Peso dos úteros dissecados de ratas nas fases estro e diestro, e ratas ovariectomizadas (OVX) e ovariectomizadas tratadas com E2 (OVX+E). Peso dos úteros é expresso em gramas (g). Todos os dados são expressos como a média  $\pm$  S.E.M. (\*)  $p < 0,05$  diferença significante de ratas em diestro em relação às ratas em estro e OVX+E. (#)  $p < 0,05$  diferença significante de ratas OVX em relação às ratas em estro e OVX+E, e  $n=6$  em cada grupo. Abreviações: OVX = ratas ovariectomizadas tratadas com óleo; OVX+E = ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol.

## ***5.2 Injeções no Hipotálamo Lateral***

### ***5.2.1 Microinjeções***

A Figura 5 mostra secções coronais com a posição das microinjeções no HL. Análises histológicas indicaram que um total 238 animais que passaram pelo protocolo experimental, 157 apresentaram injeções corretamente posicionadas no HL, sendo 80 OVX e 77 OVX+E. As microinjeções ocorreram às distâncias de aproximadamente: -3,5 (17 microinjeções – 6 OVX e 11 OVX+E), -3,60 (44 micro injeções, 26 OVX e 17 OVX+E), -3,7 (16 microinjeções, 9 OVX e 7 OVX+E), -3,9 (17 microinjeções, 6 OVX e 12 OVX+E), -4,0 (21 microinjeções, 9 OVX e 11 OVX+E) e -4,1 (42 microinjeções, 24 OVX e 19 OVX+E) milímetros do bregma.

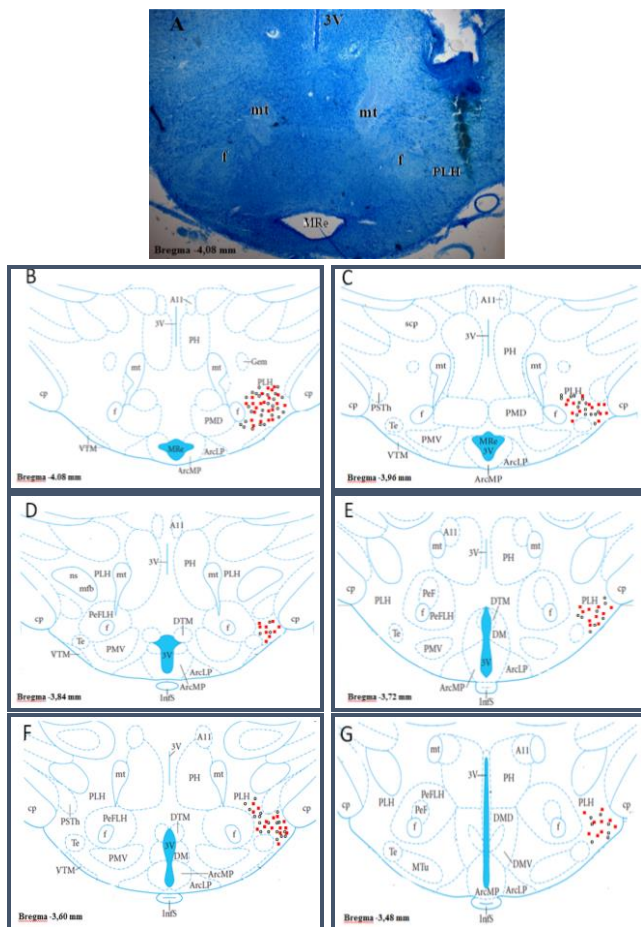


Figura 5. Diagramas representativos de cortes coronais e das microinjeções no HL. “A” é a fotomicrografia de um corte coronal mostrando o local de uma microinjeção no HL. “B à G” são representações esquemáticas dos locais das microinjeções segundo PAXINOS e WATSON (2007), onde o representa microinjeções em OVX, e ■ em OVX+E. Barra de Escala: 600µm. Abreviações: OVX = ratas ovariectomizadas tratadas com óleo; OVX+E = ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol; PLH = hipotálamo lateral; 3V= Terceiro ventrículo; mt = trato mamilotalâmico; f = fornix; cp = pedúnculo cerebral; A11= núcleo subparafascicular magnocelular do tálamo , PH= núcleo hipotalâmico posterior, PeFLH=parte perifornical do hipotálamo lateral, Te=núcleo hipotalâmico terete, mTU= núcleo tuberal medial, ArMP= núcleo

arqueado, parte posterior medial, InFs= haste infundibular, DMV= núcleo dorsomedial, parte ventral, ArcLP= núcleo arqueado, parte lateroposterior, DM= núcleo dorsomedial, DTM= núcleo tuberomamilar dorsal, VTM= núcleo tuberomamilar ventral, ns= feixe nigroestriatal, mFb= feixe medial prosencefálico, PSTh= núcleo parasubtalâmico.

### 5.2.2 Comportamentos ingestivos

#### 5.2.2.1 Injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista MM77

Injeções de 8-OHDPAT no HL ocasionaram hiperfagia apenas nos animais OVX. O pré-tratamento com as duas doses do antagonista MM77 (0,37 e 3,7 nmol) bloquearam esta hiperfagia induzida pelas injeções do agonista nos animais OVX. ANOVA de duas vias mostrou que a ingestão foi afetada pelos tratamentos [ $F_{5, 84} = 3,04$ ;  $p = 0,01$ ], pela reposição com E2 [ $F_{1, 84} = 6,30$ ;  $p = 0,01$ ] e houve interação entre eles [ $F_{5, 84} = 3,29$ ;  $p = 0,009$ ]. (Figura 6A)

A Figura 6B demonstra que os animais OVX e OVX+E, não apresentaram alterações na latência para iniciar a ingestão de alimento. A latência não foi afetada pelas injeções de agonista e antagonistas [ $F_{5, 84} = 0,91$ ;  $p = 0,47$ ], pela reposição com estradiol [ $F_{1, 84} = 0,08$ ;  $p = 0,76$ ] e nem pela interação entre eles [ $F_{5, 84} = 2,13$ ;  $p = 0,07$ ].

A resposta hiperfágica, ocasionada pelas injeções de 8-OHDPAT no HL, foi acompanhada por aumento na duração e frequência da ingestão alimentar nos animais OVX. Nos animais OVX+E a duração e a frequência não demonstraram alterações significantes. O pré-tratamento com ambas as doses de MM77 (0,37 e 3,7 nmol) bloquearam o aumento na duração e frequência nos animais OVX. ANOVA de duas vias mostrou que a duração foi afetada pelos tratamentos [ $F_{5, 84} = 2,55$ ;  $p = 0,03$ ], pela reposição com E2 [ $F_{1, 84} = 4,09$ ;  $p = 0,04$ ] e pela interação entre eles [ $F_{5, 84} = 3,03$ ;  $p = 0,01$ ]. Igualmente, a frequência também foi afetada pelos tratamentos [ $F_{5, 84} = 2,43$ ;  $p = 0,04$ ], pela reposição com E2 [ $F_{1, 84} = 9,24$ ;  $p = 0,003$ ] e pela interação entre eles [ $F_{5, 84} = 3,61$ ;  $p = 0,005$ ]. (Figura 6C e 6D).



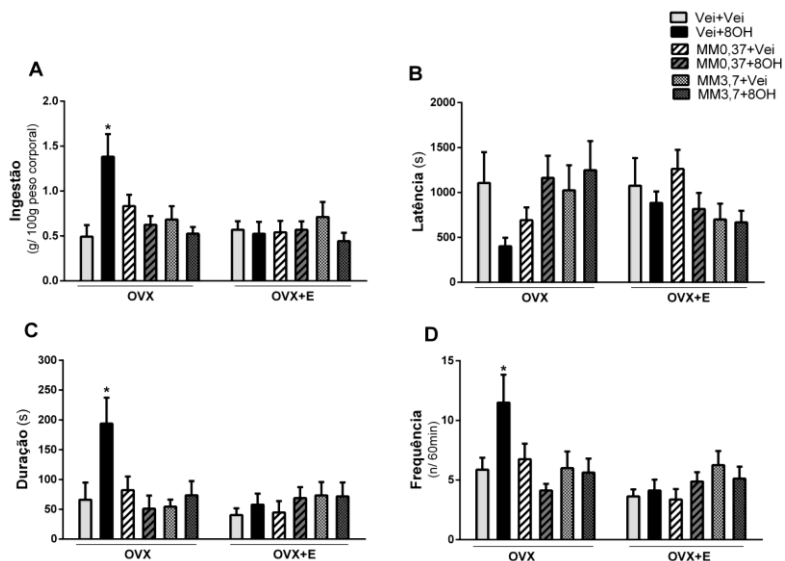


Figura 6. Efeitos da reposição com estradiol sobre a ingestão alimentar após injeções de 8-OHDPAT no hipotálamo lateral (HL) em ratas pré-tratadas com MM77 (0,37 e 3,7 nmol). “A” ingestão de ração palatável, expressa em gramas por 100 gramas de peso corporal (g/ 100 g de peso corporal); “B” latência para iniciar a ingestão, expressa em segundos (s); “C” duração da ingestão, expressa em segundos (s) e “D” frequência da ingestão, expressa como o número de vezes que o animal realizou a ingestão durante o período de 1 hora. Todos os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M. e  $n = 8$  animais por grupo. (\*) Diferença significativa entre os grupos foi  $p < 0.05$ . Abreviações: Vei = veículo (salina); MM0,37 = MM77 0,37 nmol; MM3,7 = MM77 3,7 nmol; 8OH = 8-OHDPAT 6nmol; OVX = ratas ovariectomizadas; OVX+E = ratas ovariectomizadas tratadas com E2.

### 5.2.2.2 Injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo WAY100635

Como demonstrado no item 5.2.2.1, injeções do agonista 8-OHDPAT no HL de animais OVX provocaram hiperfagia somente nos animais OVX. Assim como o pré-tratamento com MM77, o pré-tratamento com o antagonista seletivo WAY100635 atenuou esta resposta hiperfágica. ANOVA de duas vias mostrou que a ingestão foi afetada pelos tratamentos [ $F_{3, 56} = 3,33$ ;  $p = 0,02$ ], pela reposição com

E2 [ $F_{1, 56} = 4,06$ ;  $p = 0,04$ ] e houve interação entre os tratamentos [ $F_{3, 56} = 6,08$ ;  $p = 0,001$ ]. (Figura 7A)

A latência para iniciar a ingestão não foi alterada pelas injeções de 8-OHDPAT nos animais OVX e OVX+E, e o pré-tratamento com WAY100635 também não alterou este comportamento. Os tratamentos [ $F_{3, 56} = 0,98$ ;  $p = 0,40$ ], a reposição com E2 [ $F_{1, 56} = 0,31$ ;  $p = 0,57$ ], e a interação entre eles [ $F_{3, 56} = 0,81$ ;  $p = 0,49$ ] não ocasionaram alterações significantes na latência. (Figura 7B)

Como demonstrado na Figura 7C e 7D, a resposta hiperfágica provocada pelas injeções de 8-OHDPAT no HL foi acompanhada por aumentos na duração e na frequência da ingestão alimentar somente nos animais OVX. O pré-tratamento com WAY100635 bloqueou estes aumentos na duração e frequência. A duração da ingestão foi afetada pelos tratamentos [ $F_{3, 56} = 0,81$ ;  $p = 0,49$ ], pela reposição com E2 [ $F_{1, 56} = 4,06$ ;  $p = 0,04$ ] e pela interação entre os tratamentos [ $F_{1, 56} = 4,06$ ;  $p = 0,04$ ]. Similarmente, a frequência foi afetada pelos tratamentos [ $F_{1, 56} = 4,06$ ;  $p = 0,04$ ], pela reposição com E2 [ $F_{1, 56} = 6,92$ ;  $p = 0,01$ ] e pela interação entre eles [ $F_{3, 56} = 3,45$ ;  $p = 0,02$ ].

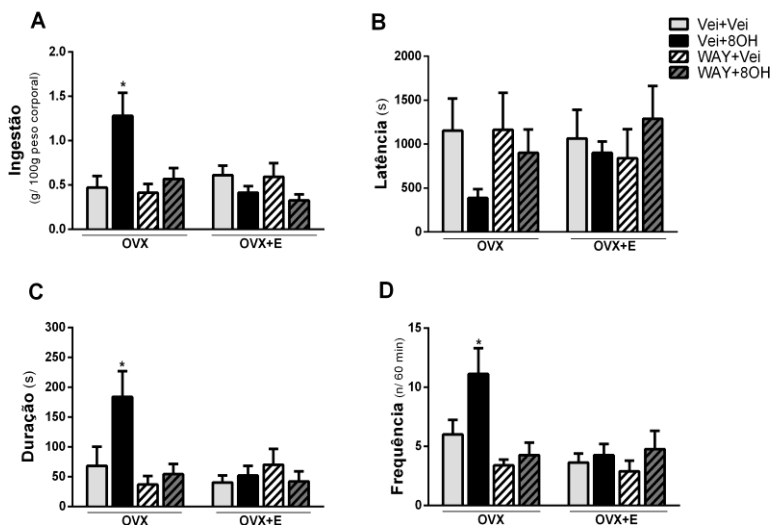


Figura 7. Efeitos da reposição com estradiol sobre a ingestão alimentar após injeções 8-OHDPAT no hipotálamo lateral (LH) em ratas pré-tratadas com WAY100635. “A” ingestão de ração palatável, expressa em gramas por 100 gramas de peso corporal (g/ 100 g de peso corporal); “B” latência para iniciar a

ingestão, expressa em segundos (s); “C” duração da ingestão, expressa em segundos (s) e “D” frequência da ingestão, expressa como o número de vezes que o animal realizou a ingestão durante o período de 1 hora. Todos os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M. de 7 a 8 animais por grupo. (\*) Diferença significante entre os grupos foi  $p < 0,05$ . Abreviações: Vei = veículo (salina); WAY =WAY100635 0,37 nmol; 8OH = 8-OHDPAT 6nmol; OVX = ratas ovariectomizadas tratadas com óleo; OVX+E = ratas ovariectomizadas tratadas com E2.

### 5.2.3 Comportamentos não ingestivos

#### 5.2.3.1. Injeções de 8-OHDPAT e o pré-tratamento com MM77 (nas doses 0,37 e 3,7 nmol )

A duração dos comportamentos não ingestivos: locomoção, imobilidade, exploração não locomotora, autolimpeza, exploração vertical e exploração de alimento não sofreram alterações após injeções do agonista 8-OHDPAT e do antagonista MM77 em ambas as doses (0,37 nmol e 3,7 nmol) tanto em OVX, como em OVX+E, como demonstrado nas Tabela 1 e 2.

Tabela 1. Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e do pré-tratamento com MM77 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas (OVX).

Variáveis	Vei +Vei	Vei +8OH	MM0,37 +Vei	MM0,37 +8OH	MM3,7 +Vei	MM3,7 +8OH
Locomoção	142 $\pm 38$	254 $\pm 38$	219 $\pm 36$	181 $\pm 13$	154 $\pm 30$	207 $\pm 30$
Exploração não locomotora	1072 $\pm 99$	1220 $\pm 114$	1099 $\pm 147.16$	1179 $\pm 12$	1295 $\pm 79$	1300 $\pm 123$
Imobilidade	1880 $\pm 63$	1256 $\pm 235$	1572 $\pm 190$	1686 $\pm 151$	1292 $\pm 178$	994 $\pm 175$
Autolimpeza	269 $\pm 62$	408 $\pm 87$	413 $\pm 64$	291 $\pm 42$	556 $\pm 97$	414 $\pm 72$
Exploração Vertical	164 $\pm 52$	255 $\pm 76$	204 $\pm 34$	193 $\pm 32$	243 $\pm 65$	415 $\pm 64$
Exploração de alimento	3 $\pm$ 0,7	5 $\pm 0,7$	4 $\pm$ 0,8	6 $\pm$ 1,2	5 $\pm$ 1	4 $\pm$ 0,9

Todos os dados estão expressos em segundos (média + S.E.M). Durante os experimentos todos os animais exibiram comportamentos locomotores imediatamente após serem colocados na caixa de registro comportamental. Abreviações: Vei = Salina; 8OH = 8-OHDPAT 6 nmol; MM0,37= MM77 0,37

nmol; MM3,7= MM 3,7 nmol; OVX= ratas ovariectomizadas. ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc Newman-Keuls e n=8 por grupo.

Tabela 2. Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e do pré-tratamento com MM77 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E).

Variáveis	Vei +Vei	Vei +8OH	MM0,37 +Vei	MM0,37 +8OH	MM3,7 +Vei	MM3,7 +8OH
Locomoção	149 ± 30	119 ± 29	211 ± 45	238 ± 45	217 ± 53	292 ± 44
Exploração não locomotora	1344 ± 114	1268 ± 100	1315 ± 107	1275 ± 91	1362 ± 121	1438 ± 46
Imobilidade	1478 ± 152	1407 ± 139	1406 ± 215	1399 ± 139	1273 ± 249	1041 ± 83
Autolimpeza	343 ± 52	464 ± 53	325 ± 29	290 ± 39	326 ± 53	432 ± 27
Exploração Vertical	239 ± 53	276 ± 67	292 ± 57	315 ± 48	239 ± 61	350 ± 55
Exploração de alimento	3 ± 0,5	5 ± 2	2 ± 0,5	3 ± 1	1 ± 0,5	1 ± 0,8

Todos os dados estão expressos em segundos (média + S.E.M). Durante os experimentos todos os animais exibiram comportamentos locomotores imediatamente após serem colocados na caixa de registro comportamental. Abreviações: Vei = Salina; 8OH = 8-OHDPAT 6 nmol; MM0,37= MM77 0,37 nmol; MM3,7= MM 3,7 nmol; OVX+E= ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol. ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc Newman-Keuls e n=8 por grupo.

### 5.2.3.2 Injeções de 8-OHDPAT e o pré-tratamento com antagonista WAY 100635

As

Tabela 3 e 4 demonstram que a duração dos comportamentos não ingestivos nos animais OVX e OVX+E não sofreram alterações significantes após injeções de 8-OHDPAT, assim como, não foram alteradas pelo pré-tratamento com o antagonista WAY.

Tabela 3. Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e do pré-tratamento com WAY 100635 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas (OVX).

Variáveis	Vei +Vei	Vei +8OH	WAY +Vei	WAY +8OH
Locomoção	141 ± 38	250 ± 42	149 ± 35	152 ± 23
Exploração não locomotora	1062 ± 116	1216 ± 117	1152 ± 109	1239 ± 88
Imobilidade	1916 ± 198	1260 ± 220	1449 ± 221	1122 ± 198
Autolimpeza	281 ± 65	407 ± 89	403 ± 37	476 ± 25
Exploração Vertical	125 ± 54	275 ± 80	404 ± 123	424 ± 147
Exploração de alimento	3 ± 0,7	5 ± 0,9	4 ± 1	7 ± 1

Todos os dados estão expressos em segundos (média ± S.E.M). Durante os experimentos todos os animais exibiram comportamentos locomotores imediatamente após serem colocados na caixa de registro comportamental. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls e n= 8 por grupo. Abreviações: Vei = Salina; 8OH = 8-OHDPAT 6 nmol; WAY = WAY 100635 0,37 nmol; OVX= ratas ovariectomizadas.

Tabela 4. Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e do pré-tratamento com WAY 100635 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E).

Variáveis	Vei +Vei	Vei +8OH	WAY +Vei	WAY +8OH
Locomoção	147 ± 31	121 ± 29	132 ± 29	226 ± 58
Exploração não locomotora	1392 ± 140	1285 ± 112	1261 ± 111	1112 ± 102
Imobilidade	1321 ± 182	1352 ± 134	1455 ± 231	1467 ± 244
Autolimpeza	356 ± 55	478 ± 53	407 ± 38	421 ± 81
Exploração Vertical	339 ± 55	260 ± 71	294 ± 80	354 ± 72
Exploração de alimento	3 ± 0,5	5 ± 3	3 ± 1	5 ± 1

Todos os dados estão expressos em segundos (média ± S.E.M). Durante os experimentos todos os animais exibiram comportamentos locomotores imediatamente após serem colocados na caixa de registro comportamental. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls. O número de animais analisados nos grupos tratados com Vei+8OH, WAY+Vei e WAY+8OH foi 7, e no grupo Vei+Vei foi 8. Abreviações: Vei = Salina; 8OH = 8-OHDPAT 6 nmol; WAY = WAY 100635 0,37 nmol; OVX+E = ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol.

### 5.2.4 Ingestão de água

#### 5.2.4.1 Injeções de 8-OHDPAT e o pré-tratamento com MM77 (nas doses 0,37 e 3,7 nmol)

As Tabela 5 e 6 mostram que a ingestão, duração e latência para iniciar o consumo de água não foram afetadas pelas injeções do agonista 8-OHDPAT, nem pelo pré-tratamento com as duas doses do antagonista MM77 nos animais OVX e OVX+E.

Tabela 5. Efeitos na ingestão de água durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo MM77 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas (OVX).

Variáveis	Vei	Vei	MM0,37	MM0,37	MM3,7	MM3,7
	+Vei	+8OH	+Vei	+8OH	+Vei	+8OH
Ingestão	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Duração	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,2	1,4 ± 0,8	6,3 ± 5,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Latência	3600 ± 0,0	3105 ± 403	2596 ± 518	2982 ± 413	3600 ± 0,0	3600 ± 0,0

Valores são a média ± SEM. Ingestão de água é expressa em mL, duração é expressa em segundos (s) e a latência é expressa em segundos (s). Durante os experimentos todos os animais exibiram comportamentos locomotores imediatamente após serem colocados na caixa de registro comportamental. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls e n=8. Abreviações: Vei = Salina; 8OH = 8-OHDPAT 6 nmol; MM0,37= MM77 0,37 nmol; MM3,7=MM77 3,7 nmol OVX= ratas ovariectomizadas.

Tabela 6. Efeitos na ingestão de água durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo MM77 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E).

Variáveis	Vei	Vei	MM0,37	MM0,37	MM3,7	MM3,7
	+Vei	+8OH	+Vei	+8OH	+Vei	+8OH
Ingestão	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Duração	0,5 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,3
Latência	2974 ± 436	3373 ± 226	3007 ± 421	3429 ± 119	3600 ± 0,0	3062 ± 373

Valores são a média ± SEM. Ingestão de água é expressa em mL, duração é expressa em segundos (s) e a latência é expressa em segundos (s). Durante os experimentos todos os animais exibiram comportamentos locomotores imediatamente após serem colocados na caixa de registro comportamental. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls e n=8. Abreviações: Vei = Salina; 8OH = 8-OHDPAT 6 nmol; MM0,37= MM77 0,37 nmol; MM3,7=MM77 3,7 nmol, OVX+E = ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol.



#### 5.2.4.2 Injeções de 8-OHDPAT e o pré-tratamento com antagonista WAY 100635

Nos animais OVX e OVX+E a ingestão, duração e latência para iniciar o consumo de água também não foram afetadas pelas injeções de agonista e antagonista WAY100635. (Tabela 7 e 8)

Tabela 7. Efeitos na ingestão de água durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo WAY 100635 no hipotálamo lateral (HL) de ratas ovariectomizadas.

Variáveis	Vei +Vei	Vei +8OH	WAY +Vei	WAY +8OH
Ingestão	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Duração	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,5
Latência	3600 ± 0,0	2697 ± 575	3600 ± 0,0	2800 ± 524

Valores são a média ± SEM. Ingestão de água é expressa em mL, duração é expressa em segundos (s) e a latência é expressa em segundos (s). Durante os experimentos todos os animais exibiram comportamentos locomotores imediatamente após serem colocados na caixa de registro comportamental. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls e n= 8 por grupo. Abreviações: Vei = Salina; 8OH = 8-OHDPAT 6 nmol; WAY = WAY 100635 0,37 nmol; OVX= ratas ovariectomizadas.

Tabela 8. Efeitos na ingestão de água durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo WAY 100635 no hipotálamo lateral (HL) de ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E).

Variáveis	Vei +Vei	Vei +8OH	WAY +Vei	WAY +8OH
Ingestão	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Duração	0,5 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,3	0,0 ± 0,0
Latência	3094 ± 404	3600 ± 0,00	2872 ± 476	3600 ± 0,00

Valores são a média ± SEM. Ingestão de água é expressa em mL, duração é expressa em segundos (s) e a latência é expressa em segundos (s). Durante os experimentos todos os animais exibiram comportamentos locomotores imediatamente após serem colocados na caixa de registro comportamental. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls. O número de animais analisados nos grupos tratados com Vei+8OH, WAY+Vei e WAY+8OH foi 7, e no grupo Vei+Vei foi 8. Abreviações: Vei = Salina; 8OH = 8-OHDPAT 6 nmol; WAY = WAY 100635 0,37 nmol; OVX+E = ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol.

### ***5.3 Injeções no Núcleo Arqueado***

#### ***5.3.1 Microinjeções***

A Figura 8 mostra secções coronais, com a posição das microinjeções no ARC. Análises histológicas indicaram que um total 98 animais que passaram pelo protocolo experimental, 64 animais apresentaram injeções corretamente posicionadas no ARC, sendo 32 microinjeções em cada grupo (OVX e OVX+E). As microinjeções ocorreram às distâncias de aproximadamente: 3,5 (7 microinjeções – 5 OVX e 2 OVX+E), -3,60 (10 microinjeções, 3 OVX e 7 OVX+E), -3,7 (16 microinjeções, 7 OVX e 9 OVX+E), -3,9 (17 microinjeções, 11 OVX e 6 OVX+E), -4,0 (11 microinjeções, 4 OVX e 7 OVX+E) e -4,1 (3 microinjeções, 2 OVX e 1 OVX+E) milímetros posterior ao bregma.

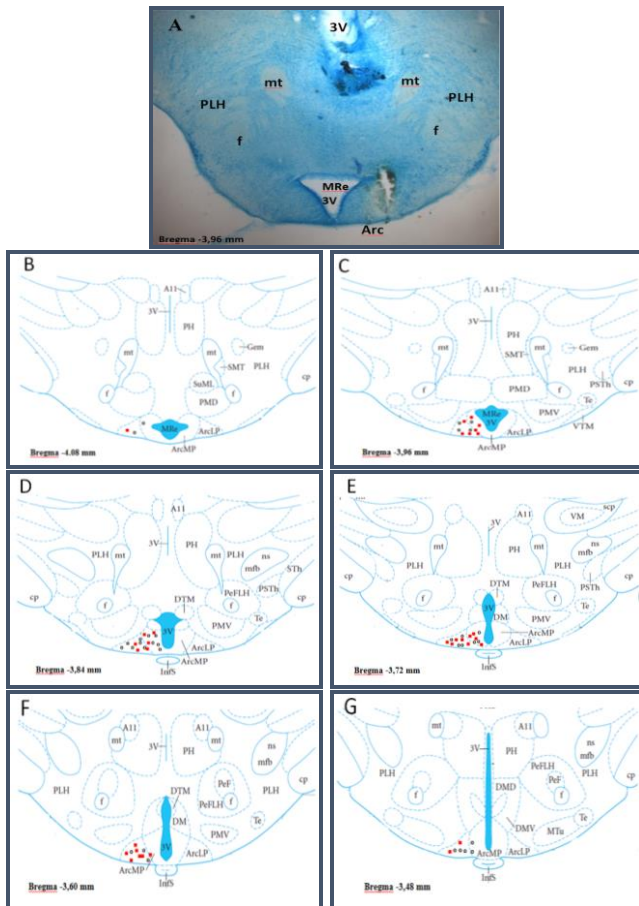


Figura 8. Diagramas representativos de cortes coronais e das microinjeções que atingiram o ARC. “A” fotomicrografia de um corte coronal mostrando o local de uma microinjeção no ARC. “B a G” representações esquemáticas dos locais de microinjeções segundo PAXINOS e WATSON (2007). Sendo o injeções em OVX, e ■ injeções em OVX+E. Abreviações: OVX = ratas ovariectomizadas tratadas com óleo; OVX+E = ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol; PLH = hipotálamo lateral; 3V= Terceiro ventrículo; mt = trato mamilotalâmico; f = fornix; cp = pedúnculo cerebral; A11= núcleo subparafascicular magnocelular do tálamo, PH= núcleo hipotalâmico posterior, PeFLH=parte perifornical do hipotálamo lateral, Te=núcleo hipotalâmico terete, mTU= núcleo tuberal medial, ArMP= núcleo arqueado, parte posterior medial, InFS= haste infundibular, DMV= núcleo dorsomedial, parte ventral, ArcLP= núcleo arqueado, parte lateroposterior, DM= núcleo dorsomedial , DTM= núcleo

tuberomamilar dorsal, VTM= núcleo tuberomamilar ventral, ns= feixe nigroestriatal , mFb= feixe medial prosencefálico , PSTh= núcleo parasubtalâmico.

### 5.3.2 *Comportamentos ingestivos*

A Figura 9A mostra que injeções de 8-OHDPAT no ARC ocasionaram hipofagia nos animais OVX+E, que foi bloqueada pelo pré-tratamento com o antagonista WAY 100635. Nos animais OVX não foram observadas diferenças após a injeção deste agonista. ANOVA de duas vias mostrou que a ingestão alimentar foi afetada apenas pela reposição com E2 [ $F_{1,56} = 6,83$ ;  $p = 0,01$ ], não sendo afetada pelos tratamentos [ $F_{3,56} = 1,00$ ;  $p = 0,39$ ] e nem pela interação entre eles [ $F_{3,56} = 0,31$ ;  $p = 0,81$ ].

A latência para iniciar a ingestão não foi alterada pelas injeções de 8-OHDPAT nos animais OVX e OVX+E, e o pré-tratamento com WAY100635 também não alterou este comportamento. A análise estatística mostrou que os tratamentos [ $F_{3,56} = 0,30$ ;  $p = 0,81$ ], a reposição com E2 [ $F_{1,56} = 0,003$ ;  $p = 0,95$ ] e a interação entre eles [ $F_{3,56} = 0,08$ ;  $p = 0,96$ ] não afetaram este comportamento. (Figura 9B).

Como demonstrado na Figura 9C e 9D, a resposta hipofágica provocada pelas injeções de 8-OHDPAT no ARC foi acompanhada por uma redução na duração da ingestão alimentar nos animais OVX+E. O pré-tratamento com WAY100635 bloqueou esta redução na duração. Porém, a frequência da ingestão alimentar não sofreu alterações nos animais OVX e OVX+E. ANOVA de duas vias mostrou que a duração da ingestão foi afetada apenas pela reposição com E2 [ $F_{1,56} = 7,61$ ;  $p = 0,007$ ]. Os tratamentos [ $F_{3,56} = 0,60$ ;  $p = 0,61$ ] e a interação entre eles [ $F_{3,56} = 0,08$ ;  $p = 0,96$ ] não apresentaram significância. A frequência não foi afetada pelos tratamentos [ $F_{3,56} = 0,69$ ;  $p = 0,55$ ], pela reposição com E2 [ $F_{1,56} = 0,71$ ;  $p = 0,40$ ] e nem pela interação entre eles [ $F_{3,56} = 0,06$ ;  $p = 0,97$ ].

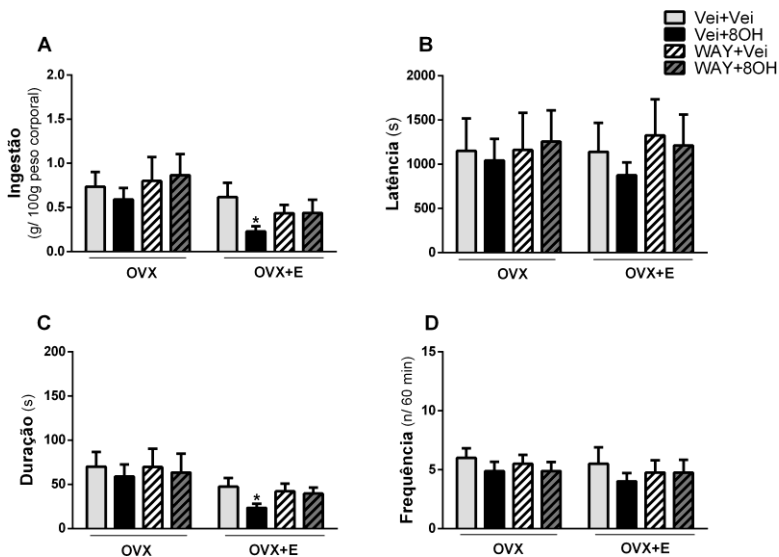


Figura 9. Efeitos da reposição com estradiol sobre a ingestão alimentar após injeções 8-OHDPAT núcleo arqueado (ARC) em ratas pré-tratadas com WAY 100635. “A” ingestão de ração palatável, expressa em gramas por 100 gramas de peso corporal ( $\text{g}/100\text{ g}$  de peso corporal); “B” latência para iniciar a ingestão, expressa em segundos (s); “C” duração da ingestão, expressa em segundos (s) e “D” frequência da ingestão, expressa como o número de vezes que o animal realizou a ingestão durante o período de 1 hora. Todos os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M. e  $n = 8$  animais por grupo. (\*) Diferença significativa entre os grupos foi  $p < 0.05$ . Abreviações: Vei = veículo (salina); 8OH = 8-OHDPAT 6nmol; WAY = WAY 100635; OVX = ratas ovariectomizadas; OVX+E = ratas ovariectomizadas tratadas com E2.

### 5.3.3 Comportamentos não ingestivos

As Tabela 9 e 10 mostram que a duração dos comportamentos não ingestivos (locomoção, imobilidade, exploração não locomotora, exploração vertical, exploração de alimento e auto-limpeza) não sofreram alterações significantes após injeções de 8-OHDPAT, assim como, não foram alteradas pelo pré-tratamento com o antagonista WAY tanto nos animais OVX, como OVX+E.

Tabela 9. Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e do pré-tratamento com WAY 100635 no núcleo arqueado (ARC) de ratas ovariectomizadas (OVX).

Variáveis	Vei	Vei	WAY	WAY
	+Vei	+8OH	+Vei	+8OH
Locomoção	139 ± 42	207 ± 39	161 ± 34	146 ± 32
Exploração não locomotora	1123 ± 121	1099 ± 111	1201 ± 102	1219 ± 98
Imobilidade	1881 ± 201	1243 ± 200	1412 ± 229	1195 ± 193
Autolimpeza	329 ± 61	418 ± 72	398 ± 49	439 ± 28
Exploração Vertical	141 ± 88	246 ± 89	373 ± 112	405 ± 123
Exploração de alimento	2 ± 0,5	4 ± 0,7	5 ± 0,8	5 ± 1

Todos os dados estão expressos em segundos (média ± S.E.M). Durante os experimentos todos os animais exibiram comportamentos locomotores imediatamente após serem colocados na caixa de registro comportamental. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls e n=8. Abreviações: Vei = Salina; 8OH = 8-OHDPAT 6 nmol; WAY = WAY 100635 0,37 nmol; OVX= ratas ovariectomizadas.

Tabela 10. Duração dos comportamentos não ingestivos durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e do pré-tratamento com WAY 100635 no núcleo arqueado (ARC) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E).

Variáveis	Vei +Vei	Vei +8OH	WAY +Vei	WAY +8OH
Locomoção	143 ± 38	138 ± 36	169 ± 33	179 ± 43
Exploração não Locomotora	1328 ± 138	1204 ± 102	1196 ± 129	1046 ± 102
Imobilidade	1309 ± 197	1299 ± 202	1387 ± 204	1409 ± 221
Autolimpeza	349 ± 59	455 ± 59	392 ± 41	422 ± 72
Exploração Vertical	296 ± 81	249 ± 101	331 ± 128	392 ± 121
Exploração de alimento	4 ± 0,7	5 ± 1	5 ± 2	4 ± 0,8

Todos os dados estão expressos em segundos (média ± S.E.M). Durante os experimentos todos os animais exibiram comportamentos locomotores imediatamente após serem colocados na caixa de registro comportamental. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls e n=8. Abreviações: Vei = Salina; 8OH = 8-OHDPAT 6 nmol; WAY = WAY 100635 0,37 nmol; OVX+E = ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol.



### 5.3.4 Ingestão de água

Como demonstrado nas Tabela 11 e 12, a ingestão, duração e latência para iniciar o consumo de água não foram afetadas pelas injeções do agonista 8-OHDPAT, e nem pelo pré-tratamento com WAY 100635 nos animais OVX e OVX+E.

Tabela 11. Efeitos na ingestão de água durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo WAY 100635 no núcleo arqueado (ARC) de ratas ovariectomizadas (OVX).

Variáveis	Vei	Vei	WAY	WAY
	+Vei	+8OH	+Vei	+8OH
Ingestão	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Duração	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,0 ± 0,0
Latência	3155 ± 498	2697 ± 575	2786 ± 588	3600 ± 0,00

Valores são a média ± SEM. Ingestão de água é expressa em mL, duração é expressa em segundos (s) e a latência é expressa em segundos (s). Durante os experimentos todos os animais exibiram comportamentos locomotores imediatamente após serem colocados na caixa de registro comportamental. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls e n = 8. Abreviações: Vei = Salina; 8OH = 8-OHDPAT 6 nmol; WAY = WAY 100635, OVX = ratas ovariectomizadas.

Tabela 12. Efeitos na ingestão de água durante 1 hora após injeções de 8-OHDPAT e pré-tratamento com antagonista seletivo WAY 100635 no núcleo arqueado (ARC) de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E).

Variáveis	Vei	Vei	WAY	WAY
	+Vei	+8OH	+Vei	+8OH
Ingestão	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Duração	0,5 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,3	0,7 ± 0,0
Latência	311 ± 469	3600 ± 0,00	2872 ± 476	2589 ± 699

Valores são a média ± SEM. Ingestão de água é expressa em mL, duração é expressa em segundos (s) e a latência é expressa em segundos (s). Durante os experimentos todos os animais exibiram comportamentos locomotores imediatamente após serem colocados na caixa de registro comportamental. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls e n = 8. Abreviações: Vei = Salina; 8OH = 8-OHDPAT 6 nmol; WAY = WAY 100635; OVX+E = ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Hipotálamo Lateral (HL)

O presente estudo demonstrou que injeções de 8-OHDPAT no HL ocasionaram hiperfagia acompanhada por aumento na duração e na frequência da ingestão alimentar nos animais OVX, sem alteração na latência para iniciar a ingestão. A reposição com estradiol suprimiu a resposta hiperfágica, assim como o aumento na duração e frequência induzido pelas injeções de 8-OHDPAT. Estes resultados demonstram que o estradiol afeta a influência serotoninérgica sobre os neurônios do HL envolvidos com o controle da ingestão alimentar.

Interessantemente, as respostas ingestivas mostradas pelo presente estudo, após ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no HL, são diferentes das respostas obtidas por Steffens *et al.* (2008) em animais intactos, que apresentaram hipofagia após as injeções de 8-OHDPAT em ambas as fases do ciclo estral. Além disso, a única evidência nos animais intactos que os hormônios ovarianos poderiam afetar a resposta ingestiva, mediada pela ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no HL, era uma discreta e inconsistente redução na duração da resposta hipofágica que foi mais intensa em estro do que em diestro (STEFFENS *et al.*, 2008; 2010). Juntos, esses dados sugerem que as flutuações na concentração de estrógenos durante o ciclo estral afetam de forma muito sutil a resposta ingestiva induzida pela ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados no HL.

Estudos sugerem que o estradiol pode diminuir a ingestão por efeitos inibitórios fásicos e tônicos. O controle fásico está relacionado com flutuações na concentração plasmática do estradiol durante o ciclo estral, ou seja, quando ocorre aumento na concentração plasmática de estradiol pode ser observado redução na ingestão alimentar (DREWETT, 1974; ECKEL, HOUPPT e GEARY, 2000). O efeito tônico é evidenciado pela ovariectomia, pois quando comparadas as ingestões diárias dos animais ovariectomizados com os animais intactos, observa-se que a ingestão alimentar diária é superior nos animais ovariectomizados (WADE, 1975; VARMA *et al.*, 1999). Com base nestas evidências, é provável que o estradiol exerça uma influência inibitória tônica sobre o circuito serotoninérgico presente no HL que controla a ingestão alimentar, pois injeções de 8-OHDPAT no HL de ratas intactas ocasionou resposta hipofágica em ambas as fases do ciclo (STEFFENS *et al.*, 2008; 2010) e na ausência dos esteroides ovarianos a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> provocou resposta hiperfágica, que foi inibida pela reposição com estradiol. Além disso, foi sugerido que o

estradiol pode regular a sinalização serotoninérgica através dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (JACKSON e UPHOUSE, 1996; ÖSTERLUND e HURD, 1998; RAAP *et al.*, 2000; ROSSI *et al.*, 2010b) e um dos prováveis mecanismos para esta regulação seria a indução de dessensibilização dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> pelo estradiol. Esta hipótese foi sustentada pelo fato que a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> inibe a ativação intracelular da adenilil ciclase através de ações em proteínas Gi/o reduzindo a atividade neuronal (DE VIVO e MAAYANI, 1986) e os estrógenos podem induzir redução nos níveis hipotalâmicos destas proteínas G (Gz, Gi1 e Gi3) (RAAP *et al.*, 2000). Então, estas reduções nos níveis das proteínas G hipotalâmicas poderiam ser responsáveis pela dessensibilização dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> induzida pelo estradiol. Outro estudo sugeriu que o estradiol potencializa a sumoilação (modificação translacional do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, SUMO1-5HT<sub>1A</sub>-receptor) causada pela estimulação aguda do agonista 8-OHDPAT no hipotálamo de ratos. Os autores sugerem que esta sumoilação poderia ocasionar a internalização e redução da afinidade do receptores 5-HT<sub>1A</sub> pelo agonista 8-OHDPAT (LI e MUMA, 2013). Desta forma, a dessensibilização dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> induzida pelo estradiol poderia explicar a ausência da resposta hiperfágica induzida pela ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> nos animais OVX+E, porém, não explicaria a resposta hipofágica ocasionada pelas injeções de 8-OHDPAT no HL em ratas intactas em estro e diestro.

Uma questão interessante é a sugestão de que os efeitos do estradiol sobre o comportamento alimentar poderiam ser secundários a redução no *set point* do peso corporal através de ações deste hormônio no VMH (JANKOWIAK e STERN, 1974) ou em outros núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle do peso corporal como o PVN (STANLEY e LEIBOWITZ, 1985; BILLINGTON *et al.*, 1994) ou ARC (CONE *et al.*, 2001; COWLEY, 2003). Baseado nesta hipótese poderia ser sugerido que em condições de flutuações hormonais do estradiol, como as observadas em ratas ciclando normalmente, o *set point* do peso corporal determinaria que aferências serotoninérgicas nos neurônios do HL ativassem sinais inibitórios sobre a ingestão. Já, a ausência de estradiol poderia alterar o *set point* do peso corporal levando a modificações na influência serotoninérgica, fazendo com que a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no HL provocasse hiperfagia.

Ao mesmo tempo, alguns estudos tem demonstrado que a exposição aos estrogênios pode modular a expressão de ER $\alpha$  e ER $\beta$  (CASTLES *et al.*, 1997; NOMURA *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* usando células hipotalâmicas têm mostrado que a relação ER $\alpha$ /ER $\beta$  poderia suprimir ou intensificar a expressão de NPY. A predominância

de ER $\alpha$  foi associada com a inibição da expressão de NPY e uma maior expressão de ER $\beta$  estaria associada com um aumento na expressão de NPY (TITOLO, CAI e BELSHAM, 2006). Como no LH já foi demonstrada a presença de ambos ER $\alpha$  e ER $\beta$  (SHUGHRUE, LANE e MERCHENTHALER, 1997; PÉREZ, CHEN e MUFSON, 2003) pode ser que neste núcleo também exista um mecanismo similar, que dependendo da densidade de ER $\alpha$  ou ER $\beta$  poderia favorecer hipo ou hiperfagia. Assim, em ratas ciclando normalmente poderia predominar uma relação ER $\alpha$ /ER $\beta$  que promoveria hipofagia após a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, enquanto que nos animais OVX esta relação poderia ser alterada fazendo com que a ativação desses receptores serotoninérgicos, no HL, induzisse hiperfagia.

Ainda, outra questão relevante em relação ao controle da ingestão alimentar pelo HL, é a presença de receptores 5-HT<sub>1A</sub> em neurônios que expressam MCH (COLLIN *et al.*, 2002). Esta população neuronal no HL aumenta a ingestão em roedores (QU *et al.*, 1996; ROSSI, CHOI, O'SHEA, *et al.*, 1997) e antagonistas de receptores MCH reduzem a ingestão alimentar (KOWALSKI *et al.*, 2004). Dados da literatura sugerem que o estradiol age atenuando estes efeitos estimulatórios do MCH sobre a ingestão alimentar (MESSINA *et al.*, 2006), pois o tratamento agudo com estradiol em ratas OVX diminui a expressão de MCH e dos receptores MCH1. Desta forma, poderíamos sugerir que a ausência do estradiol (animais OVX) ocorre uma potencialização dos efeitos orexígenos do MCH após a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> levando a hiperfagia. Diferentemente, quando os animais recebem a reposição com estradiol este mecanismo é suprimido.

Porém, neurônios imunoreativos ER $\alpha$  e MCH não estão co-localizados no LH de ratas, sugerindo que os efeitos inibitórios do estradiol sobre a expressão hipotalâmica de MCH e MCHR1 seja mediada indiretamente através de outra população neuronal (SANTOLLO e ECKEL, 2013). Como o HL apresenta íntima comunicação com o núcleo AcbSh (MALDONADO-IRIZARRY, SWANSON e KELLEY, 1995; STRATFORD e KELLEY, 1999; URSTADT, KALLY, *et al.*, 2013b) e, como o AcbSh se projeta para o HL (USUDA, TANAKA e CHIBA, 1998; DUVA *et al.*, 2005) através de neurônios GABAérgicos (OERTEL e MUGNAINI, 1984), é possível que os efeitos inibitórios do estradiol sejam mediados pelo AcbSh. Reforçando esta hipótese foi sugerido que a resposta ingestiva ocorre quando o HL deixa de ser inibido pelas aferências GABAérgicas inibitórias oriundas do AcbSh (KELLEY, BALDO e PRATT, 2005; TURENIUS *et al.*, 2009). Além disso, mais recentemente foi sugerido

que além do GABA, o glutamato também estaria envolvido na comunicação entre AcbSh e o HL para regular a ingestão alimentar por meio de uma conexão ipsilateral, sugerindo que o comportamento ingestivo pode, pelo menos em parte, refletir o balanço na liberação sináptica de glutamato e GABA no HL (URSTADT, COOP, *et al.*, 2013a; URSTADT, KALLY, *et al.*, 2013b). Portanto, poderia ser sugerido que em condições de flutuações normais dos estrógenos ocorre um balanço que favorece a liberação de GABA pelo AcbSh, o qual pode exercer seus efeitos inibitórios sobre os neurônios MCH no HL e, conseqüentemente, a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> poderia resultar em hipofagia. Contrariamente, na ausência da secreção estrogênica pelos ovários, pode ocorrer um balanço que favorece a liberação de glutamato pelo AcbSh, atenuando as aferências inibitórias dos neurônios GABA sobre os neurônios MCH do LH, provocando hiperfagia quando os receptores 5-HT<sub>1A</sub> são ativados.

Além disso, já está bem consolidado na literatura que o estradiol reduz a ingestão e o tamanho da refeição (DREWETT, 1973; BLAUSTEIN e WADE, 1976; VARMA *et al.*, 1999). Durante diestro ocorre aumento na ingestão alimentar diária, que é acompanhada por aumento no tamanho da refeição sem aumento compensatório na frequência da ingestão (BLAUSTEIN e WADE, 1976; GEARY e ASARIAN, 1999). Os dados aqui apresentados, também demonstraram aumento na ingestão alimentar, em ratas OVX, que foi acompanhado por aumento na duração da ingestão. Este resultado sugere que, na ausência dos hormônios ovarianos, os efeitos dos sinais periféricos que sinalizam o término da refeição, como a CCK, estão prejudicados. Esta sugestão é reforçada pelo fato do estradiol aumentar a atividade Fos induzida pelo CCK, no núcleo caudal do trato solitário (NTS) (THAMMACHAROEN *et al.*, 2008). Diante disso, pode ser sugerido que nos animais OVX a expressão de CCK pode ser reduzida e, conseqüentemente, a duração da ingestão é aumentada.

Também, estudos têm sugerido que o estradiol atenua os efeitos orexígenos do NPY (BONAVERA *et al.*, 1994; SANTOLLO e ECKEL, 2008) e da grelina (CLEGG *et al.*, 2007). BUTERA *et al.* 2014, demonstraram que injeções i.p. de grelina aumentam a ingestão e a duração da ingestão nos animais OVX, e estes efeitos hiperfágicos foram atenuados pelo tratamento com estradiol. Sendo assim, os efeitos hiperfágicos nos animais OVX, demonstrados no presente estudo, também poderiam ser atribuídos aos efeitos orexígenos destes peptídeos potencializados pela ausência do estradiol.

No presente estudo, a análise dos pesos uterinos demonstrou que o protocolo de reposição hormonal empregando injeções subcutâneas de cipionato de estradiol (10mg / kg peso corporal) por três dias consecutivos foi eficiente em recuperar o peso uterino dos animais OVX a valores semelhantes aos animais intactos na fase estro. Porém, apesar de suprimir a resposta hiperfágica demonstrada pelos animais OVX, esta reposição não reproduziu os efeitos hipofágicos induzidos pelo tratamento com 8-OHDAPT no HL em animais intactos. Deve-se ressaltar que a sensibilidade do SNC aos hormônios ovarianos é diferente da sensibilidade uterina a estes hormônios, assim, é possível que a reposição com estradiol por um tempo maior que três dias poderia ser capaz de evidenciar a resposta hipofágica induzida nos animais intactos após a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no HL.

Outra questão importante é que o pré-tratamento com WAY100635, um antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, bloqueou a hiperfagia ocasionada por injeções do agonista 8-OHDPAT nas ratas OVX. Igualmente, o pré-tratamento com ambas as doses de MM77, outro antagonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, também bloqueou estes efeitos hiperfágicos. Tanto o MM-77 quanto o WAY100635 apresentam alta afinidade pelos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (FLETCHER, CLIFFE e DOURISH, 1993; MOKROSZ *et al.*, 1994), porém foi sugerido que o MM77 também pode agir em receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos (ARKLE, ARKLE e EBENEZER, 2005). Entretanto, foram obtidas respostas idênticas com os dois antagonistas, indicando que os efeitos provocados pelas injeções de 8-OHDPAT sobre a ingestão alimentar no HL de ratas OVX foram especificamente mediados pela ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Como já havia sido sugerida a participação destes receptores no circuito serotoninérgico que controlam a ingestão alimentar no HL de ratas intactas (STEFFENS *et al.*, 2010), os dados aqui apresentados, consolidam a participação destes receptores e demonstram que o estradiol exerce influência inibitória sobre a resposta ingestiva ocasionada pela ativação desses receptores.

No presente estudo não foram observadas alterações na duração dos comportamentos não ingestivos (locomotoção, imobilidade, exploração não locomotora, exploração vertical, autolimpeza e exploração do alimento) após injeções de 8-OHDPAT no HL de ratas OVX e OVX+E, demonstrando que os efeitos hiperfágicos observados nos animais OVX não podem ser atribuídos às alterações na atividade motora ou a outros comportamentos não ingestivos. Estes dados são similares aos encontrados por Steffens *et al.* (2008, 2010) em animais intactos. Também, não foram observadas alterações na ingestão, duração

e latência para ingestão de água nos animais OVX e OVX+E após a ativação injeções de 8-OHDPAT no HL. Estes resultados sugerem que ambos, o estradiol e ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, não interagem com os comportamentos não ingestivos e nem com a ingestão de água.

Portanto, os dados aqui apresentados indicam que no LH, a influência da serotonina sobre a ingestão alimentar é afetada pela presença do estradiol. Os animais OVX mostraram uma resposta hiperfágica após a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> que foi suprimida pela reposição com estradiol, sugerindo que sobre o circuito serotoninérgico presente no HL o estradiol exerça apenas seus efeitos tônicos, pois sua influência só foi demonstrada nos animais OVX. Está hipótese é reforçada pelo fato de que animais intactos apresentam hipofagia tanto na fase estro como em diestro, após a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no HL (STEFFENS *et al.*, 2008; 2010), indicando que as flutuações hormonais durante o ciclo estral tem pouca ou nenhuma influência sobre os circuitos serotoninérgicos que controlam a ingestão alimentar no HL.



## 6.2 Núcleo arqueado (ARC)

O presente estudo demonstrou que a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no ARC ocasionam hipofagia e redução na duração da ingestão alimentar apenas nos animais OVX+E. Estes resultados corroboram com os resultados em animais intactos, que mostraram hipofagia e redução da duração da ingestão apenas na fase estro, após ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (STEFFENS *et al.*, 2008; 2010). Desta forma, estes dados demonstram que o estradiol afeta a influência serotoninérgica sobre os neurônios do ARC envolvidos com o controle da ingestão alimentar.

Como esperado, a hipofagia apresentada pelas ratas OVX+E foi acompanhada por redução na duração da ingestão após a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, sugerindo que nestes animais a reposição com estradiol foi capaz de reduzir o tamanho da refeição, corroborando com os dados presentes na literatura (DREWETT, 1973; BLAUSTEIN e WADE, 1976; VARMA *et al.*, 1999). Esta redução na duração provavelmente é consequência da ação do estradiol em neurônios POMC que se projetam do ARC para o NTS, onde existe uma grande expressão de MC4R (LIU *et al.*, 2003) que parecem mediar os sinais de saciedade desencadeados pela CCK no NTS (FAN *et al.*, 2004). Além disso, foi demonstrado que o estradiol também pode aumentar a sensibilidade dos receptores CCK-A vagais, ou seja, provoca uma potencialização dos efeitos de saciedade gerados pela CCK (BUTERA, BRADWAY e CATALDO, 1993; THAMMACHAROEN *et al.*, 2008).

Associado a esta potencialização dos efeitos da CCK, a reposição com estradiol também pode ter reduzido a eficácia do hormônio orexígeno grelina nos animais OVX+E, pois como demonstrado por Butera *et al.* (2014) o estradiol atenua os efeitos orexígenos da grelina sobre a ingestão e a duração da ingestão alimentar, fazendo com que a grelina reduza seus efeitos estimulatórios sobre a expressão de NPY/AgRP, sobre a atividade elétrica destes neurônios e deixe de aumentar o número de sinapses inibitórias GABAérgicas nos neurônios POMC (CHEN *et al.*, 2004; FU, ACUNA-GOYCOLEA e VAN DEN POL, 2004; VONG *et al.*, 2011).

Outra questão interessante é que a produção de leptina em ratos e em humanos é regulada pelo estradiol (SHIMIZU *et al.*, 1997). Portanto, é possível que a hipofagia demonstrada pelos animais OVX+E, após a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, também seja consequência de uma potencialização na expressão de leptina e de seus efeitos anorexígenos. Essa hipótese é reforçada pela presença de receptores de leptina (LepRb) em neurônios POMC que expressam ER $\alpha$ . Todavia, é importante ressaltar que os efeitos do estradiol sobre estes neurônios não são

dependentes da leptina, ou seja, o estradiol potencializa os efeitos anorexígenos deste hormônio, mas mesmo na ausência da leptina e de seus receptores, o estradiol continua exercendo seus efeitos anorexígenos (LÓPEZ e TENA-SEMPERE, 2015).

No presente trabalho, a hipofagia e a redução na duração da ingestão não foram acompanhadas por redução na frequência da ingestão alimentar nos animais OVX+E. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que mostraram que em proestro a redução da ingestão alimentar é acompanhada por redução na duração da ingestão alimentar sem ocasionar aumento compensatório na frequência da ingestão (BLAUSTEIN e WADE, 1976; GEARY e ASARIAN, 1999).

Além disso, a exposição aos estrogênios pode modular a expressão de ER $\alpha$  e ER $\beta$  (CASTLES *et al.*, 1997; NOMURA *et al.*, 2003) e, como estes dois tipos de receptores são expressos no ARC, é possível que a presença do estradiol nos animais OVX+E tenha favorecido o predomínio da expressão de ER $\alpha$  em relação a ER $\beta$ , ocasionando inibição na expressão de NPY e, conseqüentemente, reduzindo os efeitos inibitórios GABAérgicos sobre os neurônios POMC, contribuindo para o desenvolvimento de hipofagia após a ativação dos receptores 5-HT $_{1A}$ .

Como citado anteriormente, o estradiol pode reduzir a ingestão alimentar por efeitos inibitórios fásicos e tônicos. Assim, é provável que o estradiol exerça uma influência fásica sobre o circuito serotoninérgico presente no ARC que controla a ingestão alimentar. Esta sugestão é sustentada pelo fato de injeções de 8-OHDPAT no ARC de ratas intactas ocasionar respostas hipofágicas apenas na fase estro (STEFFENS *et al.*, 2008; 2010) e, como demonstrado no presente trabalho, na ausência dos esteroides ovarianos (ratas OVX) as injeções deste agonista não provocam alterações na resposta ingestiva, sendo observado hipofagia somente na presença do estradiol (ratas OVX+E). Juntos, esses dados indicam que as flutuações nas concentrações plasmáticas de estradiol durante o ciclo estral influenciam o circuito serotoninérgico que controla a ingestão alimentar no ARC.

Diferente do que ocorreu no HL, no ARC o protocolo de reposição hormonal empregando injeções subcutâneas de cipionato de estradiol (10mg/ kg peso corporal), por três dias consecutivos, ocasionou hipofagia após a ativação dos receptores 5-HT $_{1A}$  nos animais OVX+E, de forma semelhante à encontrada nos animais intactos em estro (STEFFENS *et al.*, 2008; 2010). Uma possível explicação é que o estradiol pode ter agido diretamente nos receptores ER $\alpha$  expressos em

neurônios POMC no ARC, que também expressam receptores 5-HT<sub>1A</sub>, e assim, desencadeou diretamente seus efeitos anorexígenos. Ao contrário, no HL estes receptores estrogênicos não estão co-localizados nos neurônios MCH que expressam receptores 5-HT<sub>1A</sub>, sugerindo que os efeitos inibitórios do estradiol são exercidos de forma indireta através de outra população neuronal, o que poderia demandar um tempo maior de reposição hormonal para que pudesse ser evidenciada hipofagia nestes animais.

Adicionalmente, não pode ser descartada a possibilidade de que no ARC o estradiol também possa ter agido em receptores de membrana como Gq-mER, uma vez que, este receptor é expresso na membrana dos neurônios POMC e AgRP que participam do controle da ingestão alimentar (LAGRANGE, RØNNEKLEIV e KELLY, 1997; QIU *et al.*, 2003, 2006; SMITH *et al.*, 2013). Sendo assim, a ligação do estradiol a estes receptores poderia desencadear respostas mais rápidas nos comportamentos ingestivos.

Similar ao que foi observado no HL, o pré-tratamento com o antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (WAY100635) no ARC bloqueou a hipofagia ocasionada por injeções do agonista 8-OHDPAT nas ratas OVX+E. Desta forma, tanto os resultados obtidos no HL, como no ARC, demonstraram que estes receptores compõem o circuito serotoninérgico que controla a ingestão alimentar, e mais do que isso, indicam que a presença do estradiol é fundamental para que ocorra redução na ingestão alimentar quando estes receptores são ativados no ARC.

Estudos sobre os circuitos serotoninérgicos presentes no ARC demonstram que a ativação de receptores 5-HT<sub>1B</sub> hiperpolariza os neurônios que expressam AgRP reduzindo os efeitos inibitórios GABAérgicos sobre os neurônios que expressam POMC levando a hipofagia. Além disso, também indicam que a ativação de receptores 5-HT<sub>2C</sub> aumenta a atividade dos neurônios POMC e o processamento em  $\alpha$ -MSH provocando redução na ingestão alimentar. (DE VRY e SCHREIBER, 2000; HEISLER *et al.*, 2006). Portanto, os resultados aqui apresentados, que mostram a participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> neste circuito serotoninérgico que controla a ingestão alimentar, ampliam o conhecimento em relação à circuitaria serotoninérgica envolvida com o controle da ingestão alimentar.

Além disso, não foram observadas alterações na duração dos comportamentos não ingestivos (locomoção, imobilidade, exploração não locomotora, exploração vertical, autolimpeza e exploração do alimento) após injeções de 8-OHDPAT no ARC de ratas OVX e

OVX+E, demonstrando que os efeitos hipofágicos observados nos animais OVX+E não podem ser atribuídos às alterações na atividade motora ou a outros comportamentos não ingestivos. Estes dados são similares aos encontrados por Steffens *et al.* (2008, 2010) em animais intactos, bem como, aos resultados encontrados nos animais OVX e OVX+E após ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no HL.

Igualmente ao que ocorreu HL, no ARC também não foram observadas alterações na ingestão, duração e latência para ingestão de água nos animais OVX e OVX+E após injeções de 8-OHDPAT, sugerindo que tanto o estradiol, como a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, não afetam a ingestão de água. Estes resultados também foram semelhantes aos encontrados em ratas intactas (STEFFENS *et al.*, 2008; 2010).

Portanto, os resultados obtidos no ARC, indicam que a influência serotonérgica sobre a ingestão alimentar é afetada pelas flutuações nas concentrações de estradiol. Os animais OVX+E mostraram uma resposta hipofágica similar àquela observada em animais intactos em estro (STEFFENS *et al.*, 2008; 2010) após a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Juntos, esses resultados sugerem que o estradiol exerça apenas seus efeitos fásicos sobre o circuito serotonérgico presente no ARC que participa do controle da ingestão alimentar.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados descritos no presente trabalho nos permitem concluir que o estradiol influencia os circuitos serotoninérgicos que controlam a ingestão alimentar no HL e no ARC. Como estudos anteriores do nosso grupo já haviam sugerido que no ARC as variações hormonais ao longo do ciclo estral poderiam influenciar estes circuitos, os resultados aqui apresentados confirmam que o estradiol realmente, influencia estes circuitos serotoninérgicos presentes no ARC que controlam a ingestão alimentar. Além disso, esses resultados evidenciam que neste núcleo o estradiol exerce seus efeitos inibitórios fásicos, pois na ausência dos esteroides ovarianos (OVX) a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> não alterou a resposta ingestiva.

No HL, os estudos anteriores do grupo com ratas intactas não haviam evidenciado de modo consistente a influência dos hormônios ovarianos sobre o circuito serotoninérgico que controla a ingestão alimentar. Todavia, o emprego de animais ovariectomizados no presente estudo, conseguiu demonstrar que no HL o estradiol exerce seus efeitos inibitórios tônicos sobre a circuitaria serotoninérgica que controla a ingestão alimentar. Estes resultados indicam que as flutuações hormonais têm pouca ou nenhuma influência sobre os circuitos serotoninérgicos presentes no HL envolvidos com a ingestão alimentar.

Portanto, os resultados aqui apresentados representam um avanço no entendimento da complexa regulação da ingestão alimentar, demonstrando pela primeira vez a influência fásica e tônica do estradiol sobre os circuitos serotoninérgicos que participam do controle da ingestão alimentar nestes dois núcleos hipotalâmicos analisados.



## 8. REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTINEZ, M.; HORTON, T.; LEVINE, J. E. Estrogen receptors in neuropeptide Y neurons: at the crossroads of feeding and reproduction. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v.18, n.2, p.48-50. 2007.
- ADELL, A.; ARTIGAS, F. A microdialysis study of the in vivo release of 5-HT in the median raphe nucleus of the rat. *British journal of pharmacology*, v.125, n.6, p.1361-1367. 1998.
- ADELL, A.; CELADA, P.; ABELLÁN, M. T.; ARTIGAS, F. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Research Reviews*, v.39, n.2, p.154-180. 2002.
- AINSLIE, D.; MORRIS, M.; WITTERT, G.; TURNBULL, H.; PROIETTO, J.; THORBURN, A. Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, v.25, n.11, p.1680-1688. 2001.
- AIR, E. L.; BENOIT, S. C.; SMITH, K. A. B.; CLEGG, D. J.; WOODS, S. C. Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.72, n.1, p.423-429. 2002.
- AKABAYASHI, A.; WATANABE, Y.; WAHLESTEDT, C.; MCEWEN, B. S.; PAEZ, X.; LEIBOWITZ, S. F. Hypothalamic neuropeptide Y, its gene expression and receptor activity: relation to circulating corticosterone in adrenalectomized rats. *Brain Research*, v.665, n.2, p.201-212. 1994.
- ARKLE, M.; EBENEZER, I. S. Ipsapirone suppresses food intake in food-deprived rats by an action at 5-HT 1A receptors. *European journal of pharmacology*, v.408, n.3, p.273-276. 2000.
- ARKLE, M. J.; ARKLE, S.; EBENEZER, I. S. A comparison of the effects of the 5HT1A antagonists MM-77 and WAY-100635 on the mouse isolated vasa deferentia. *Autonomic and Autacoid Pharmacology*, v.25, n.3, p.121-128. 2005.
- ASARIAN, L.; GEARY, N. Cyclic Estradiol Treatment Normalizes Body Weight and Restores Physiological Patterns of Spontaneous Feeding and Sexual Receptivity in Ovariectomized Rats. *Hormones and Behavior*, v.42, n.4, p.461-471. 2002.

- ASARIAN, L.; GEARY, N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.361, n.1471, p.1251-1263. 2006.
- BANKS, W. A. The source of cerebral insulin. **European journal of pharmacology**, v.490, n.1, p.5-12. 2004.
- BANKS, W. A.; KASTIN, A. J.; HUANG, W.; JASPAN, J. B.; MANESS, L. M. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. **Peptides**, v.17, n.2, p.305-311. 1996.
- BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v.38, n.8, p.1083-1152. 1999.
- BECKER, L. K. Principles and practice of endocrinology and metabolism. v.3.ed., p.1233-1239. 2001.
- B EGLINGER, C.; DEGEN, L.; MATZINGER, D.; D'AMATO, M.; DREWE, J. Loxiglumide, a CCK-A receptor antagonist, stimulates calorie intake and hunger feelings in humans. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.280, n.4, p.R1149-R1154. 2001.
- BENOIT, S. C.; AIR, E. L.; COOLEN, L. M.; STRAUSS, R.; JACKMAN, A.; CLEGG, D. J.; SEELEY, R. J.; WOODS, S. C. The Catabolic Action of Insulin in the Brain Is Mediated by Melanocortins. **The Journal of Neuroscience**, v.22, n.20, p.9048-9052. 2002.
- BERNARDIS, L. L. The dorsomedial hypothalamic nucleus in autonomic and neuroendocrine homeostasis. **Can J Neurol Sci**, v.2, n.1, p.45-60. 1975.
- BERTHOUD, H.-R. Interactions between the "cognitive" and "metabolic" brain in the control of food intake. **Physiology & Behavior**, v.91, n.5, p.486-498. 2007.
- BILLINGTON, C.; BRIGGS, J.; HARKER, S.; GRACE, M.; LEVINE, A. Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.266, n.6, p.1765-1770. 1994.
- BLAUSTEIN, J. D.; WADE, G. N. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. **Physiology & Behavior**, v.17, n.2, p.201-208. 1976.
- BLUNDELL, J. Serotonin and appetite. **Neuropharmacology**, v.23, n.12, p.1537-1551. 1984.
- BLUNDELL, J. E. Serotonin manipulations and the structure of feeding behaviour. **Appetite**, v.7, p.39-56. 1986.



- BOGUSZEWSKI, C. L.; VAN DER LELY, A. J. The role of the gastrointestinal tract in the control of energy balance. **Translational Gastrointestinal Cancer**, v.4, n.1, p.3-13. 2014.
- BONAVERA, J. J.; DUBE, M. G.; KALRA, P. S.; KALRA, S. P. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology**, v.134, n.6, p.2367-2370. 1994.
- BOROWSKY, B.; DURKIN, M. M.; OGOZALEK, K.; MARZABADI, M. R.; DELEON, J.; HEURICH, R.; LICHTBLAU, H.; SHAPOSHNIK, Z.; DANIEWSKA, I.; BLACKBURN, T. P.; BRANCHEK, T. A.; GERALD, C.; VAYSSE, P. J.; FORRAY, C. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. **Nat Med**, v.8, n.8, p.825-830. 2002.
- BOVETTO, S.; RICHARD, D. Functional assessment of the 5-HT 1A-, 1B-, 2A/2C-, and 3-receptor subtypes on food intake and metabolic rate in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.268, n.1, p.R14-R20. 1995.
- BRAILOIU, E.; DUN, S. L.; BRAILOIU, G. C.; MIZUO, K.; SKLAR, L. A.; OPREA, T. I.; PROSSNITZ, E. R.; DUN, N. J. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. **Journal of Endocrinology**, v.193, n.2, p.311-321. 2007.
- BROADWELL, R. D.; BRIGHTMAN, M. W. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. **The Journal of Comparative Neurology**, v.166, n.3, p.257-283. 1976.
- BROBERGER, C.; DE LECEA, L.; SUTCLIFFE, J.; HÖKFELT, T. Hypocretin/orexin-and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and Agouti gene-related protein systems. **Journal of Comparative Neurology**, v.402, n.4, p.460-474. 1998.
- BUFFENSTEIN, R.; POPPITT, S. D.; MCDEVITT, R. M.; PRENTICE, A. M. Food intake and the menstrual cycle: a retrospective analysis, with implications for appetite research. **Physiology & behavior**, v.58, n.6, p.1067-1077. 1995.
- BUTERA, P. C.; BRADWAY, D. M.; CATALDO, N. J. Modulation of the satiety effect of cholecystokinin by estradiol. **Physiology & Behavior**, v.53, n.6, p.1235-1238. 1993.

- BUTERA, P. C.; CLOUGH, S. J.; BUNGO, A. Cyclic estradiol treatment modulates the orexigenic effects of ghrelin in ovariectomized rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.124, p.356-360. 2014.
- CASTLES, C. G.; OESTERREICH, S.; HANSEN, R.; FUQUA, S. A. W. Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.62, n.2-3, p.155-163. 1997.
- CHALMERS, D. T.; WATSON, S. J. Comparative anatomical distribution of 5-HT 1A receptor mRNA and 5-HT 1A binding in rat brain—a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. **Brain research**, v.561, n.1, p.51-60. 1991.
- CHEN, H. Y.; TRUMBAUER, M. E.; CHEN, A. S.; WEINGARTH, D. T.; ADAMS, J. R.; FRAZIER, E. G.; SHEN, Z.; MARSH, D. J.; FEIGHNER, S. D.; GUAN, X.-M.; YE, Z.; NARGUND, R. P.; SMITH, R. G.; PLOEG, L. H. T. V. D.; HOWARD, A. D.; MACNEIL, D. J.; QIAN, S. Orexigenic Action of Peripheral Ghrelin Is Mediated by Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein. **Endocrinology**, v.145, n.6, p.2607-2612. 2004.
- CLEGG, D.; BENOIT, S.; FISHER, M.; BARRERA, J.; SEELEY, R.; WOODS, S. Sex hormones determine body fat distribution and sensitivity to adiposity signals. **Appetite**, v.40, p.324. 2003.
- CLEGG, D. J.; BROWN, L. M.; WOODS, S. C.; BENOIT, S. C. Gonadal Hormones Determine Sensitivity to Central Leptin and Insulin. **Diabetes**, v.55, n.4, p.978-987. 2006.
- CLEGG, D. J.; BROWN, L. M.; ZIGMAN, J. M.; KEMP, C. J.; STRADER, A. D.; BENOIT, S. C.; WOODS, S. C.; MANGIARACINA, M.; GEARY, N. Estradiol-Dependent Decrease in the Orexigenic Potency of Ghrelin in Female Rats. **Diabetes**, v.56, n.4, p.1051-1058. 2007.
- COLL, A. P.; FASSNACHT, M.; KLAMMER, S.; HAHNER, S.; SCHULTE, D. M.; PIPER, S.; TUNG, Y. C. L.; CHALLIS, B. G.; WEINSTEIN, Y.; ALLOLIO, B.; O'RAHILLY, S.; BEUSCHLEIN, F. Peripheral administration of the N-terminal pro-opiomelanocortin fragment 1–28 to Pomc<sup>-/-</sup> mice reduces food intake and weight but does not affect adrenal growth or corticosterone production. **Journal of Endocrinology**, v.190, n.2, p.515-525. 2006.
- COLLIN, M.; BÄCKBERG, M.; ÖNNESTAM, K.; MEISTER, B. 5-HT<sub>1A</sub> receptor immunoreactivity in hypothalamic neurons involved in body weight control. **NeuroReport**, v.13, n.7, p.945-951. 2002.

- CONE, R.; COWLEY, M.; BUTLER, A.; FAN, W.; MARKS, D.; LOW, M. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. **International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity**, v.25, p.63-7. 2001.
- COSCINA, D. V.; CURRIE, P. J.; BISHOP, C.; PARKER, G. C.; ROLLINS, B. L.; KING, B. M. Posterodorsal amygdala lesions reduce feeding stimulated by 8-OH-DPAT1. **Brain Research**, v.883, n.2, p.243-249. 2000.
- COWLEY, M. A. Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals of energy state. **European Journal of Pharmacology**, v.480, n.1â€“3, p.3-11. 2003.
- COWLEY, M. A.; PRONCHUK, N.; FAN, W.; DINULESCU, D. M.; COLMERS, W. F.; CONE, R. D. Integration of NPY, AGRP, and Melanocortin Signals in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus: Evidence of a Cellular Basis for the Adipostat. **Neuron**, v.24, n.1, p.155-163. 1999.
- COWLEY, M. A.; SMART, J. L.; RUBINSTEIN, M.; CERDAN, M. G.; DIANO, S.; HORVATH, T. L.; CONE, R. D.; LOW, M. J. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, v.411, n.6836, p.480-484. 2001.
- CUMMINGS, D. E.; PURNELL, J. Q.; FRAYO, R. S.; SCHMIDOVA, K.; WISSE, B. E.; WEIGLE, D. S. A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans. **Diabetes**, v.50, n.8, p.1714-1719. 2001.
- CURRIE, P.; COSCINA, D. Diurnal variations in the feeding response to 8-OH-DPAT injected into the dorsal or median raphe. **NeuroReport**, v.4, n.9, p.1105-1107. 1993.
- DALTON, G.; LEE, M.; KENNETT, G.; DOURISH, C.; CLIFTON, P. Serotonin 1B and 2C receptor interactions in the modulation of feeding behaviour in the mouse. **Psychopharmacology**, v.185, n.1, p.45-57. 2006.
- DATE, Y.; MURAKAMI, N.; TOSHINAI, K.; MATSUKURA, S.; NIJIMA, A.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. **Gastroenterology**, v.123, n.4, p.1120-1128. 2002.

DE LECEA, L.; KILDUFF, T. S.; PEYRON, C.; GAO, X.-B.; FOYE, P. E.; DANIELSON, P. E.; FUKUHARA, C.; BATTENBERG, E. L. F.; GAUTVIK, V. T.; BARTLETT, F. S.; FRANKEL, W. N.; VAN DEN POL, A. N.; BLOOM, F. E.; GAUTVIK, K. M.; SUTCLIFFE, J. G. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, n.1, p.322-327. 1998.

DE VIVO, M.; MAAYANI, S. Characterization of the 5-hydroxytryptamine<sub>1a</sub> receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.238, n.1, p.248-253. 1986.

DE VRY, J.; SCHREIBER, R. Effects of selected serotonin 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.24, n.3, p.341-353. 2000.

DIANO, S.; KALRA, S. P.; HORVATH, T. L. Leptin Receptor Immunoreactivity is Associated with the Golgi Apparatus of Hypothalamic Neurones and Glial Cells. **Journal of Neuroendocrinology**, v.10, n.9, p.647-650. 1998.

DICKSON, S. L.; LUCKMAN, S. M. Induction of c-fos Messenger Ribonucleic Acid in Neuropeptide Y and Growth Hormone (GH)-Releasing Factor Neurons in the Rat Arcuate Nucleus Following Systemic Injection of the GH Secretagogue, GH-Releasing Peptide-6. **Endocrinology**, v.138, n.2, p.771-777. 1997.

DOURISH, C.; HUTSON, P.; CURZON, G. Characteristics of feeding induced by the serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT). **Brain research bulletin**, v.15, n.4, p.377-384. 1985.

DOURISH, C. T.; CLARK, M. L.; IVERSEN, S. D. 8-OH-DPAT elicits feeding and not chewing: evidence from liquid diet studies and a diet choice test. **Psychopharmacology**, v.95, n.2, p.185-188. 1988.

DREWETT, R. F. Oestrous and dioestrous components of the ovarian inhibition on hunger in the rat. **Animal Behaviour**, v.21, n.4, p.772-780. 1973.

DREWETT, R. F. The meal patterns of the oestrous cycle and their motivational significance. **Quarterly Journal of Experimental Psychology**, v.26, n.3, p.489-494. 1974.

- DUVA, M. A.; TOMKINS, E. M.; MORANDA, L. M.; KAPLAN, R.; SUKHASEUM, A.; STANLEY, B. G. Origins of lateral hypothalamic afferents associated with N-methyl-d-aspartic acid-elicited eating studied using reverse microdialysis of NMDA and Fluorogold. **Neuroscience Research**, v.52, n.1, p.95-106. 2005.
- DYE, L.; BLUNDELL, J. Menstrual cycle and appetite control: implications for weight regulation. **Human reproduction**, v.12, n.6, p.1142-1151. 1997.
- EBENEZER, I.; ARKLE, M.; TITE, R. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin inhibits food intake in fasted rats by an action at 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v.29, n.4, p.269-272. 2007.
- EBENEZER, I.; TITE, R. Differential effects of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist gepirone on food intake in rats may depend on their motivation to eat. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v.25, n.9, p.727-732. 2003.
- EBENEZER, I. S.; PARROTT, R. F.; VELLUCCI, S. V. Effects of the 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Agonist 8-OH-DPAT on Operant Food Intake in Food-Deprived Pigs. **Physiology & behavior**, v.67, n.2, p.213-217. 1999.
- EBENEZER, I. S.; SURUJBALLY, A. The effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT) on food intake in non-deprived C57BL6 mice. **European Journal of Pharmacology**, v.559, n.2-3, p.184-188. 2007.
- EBENEZER, I. S.; VELLUCCI, S. V.; PARROTT, R. F. The differential effects of intravenously administered 8-OH-DPAT on operant food intake in satiated and food-deprived pigs are mediated by central 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Physiology & behavior**, v.73, n.1, p.223-227. 2001.
- ECKEL, L. A. The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. **Physiology & Behavior**, v.104, n.4, p.517-524. 2011.
- ECKEL, L. A.; HOUP, T. A.; GEARY, N. Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. **Physiology & Behavior**, v.70, n.3-4, p.397-405. 2000.
- ELIAS, C. F.; ASCHKENASI, C.; LEE, C.; KELLY, J.; AHIMA, R. S.; BJORBÅK, C.; FLIER, J. S.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Leptin Differentially Regulates NPY and POMC Neurons Projecting to the Lateral Hypothalamic Area. **Neuron**, v.23, n.4, p.775-786. 1999.

- ELIAS, C. F.; SAPER, C. B.; MARATOS-FLIER, E.; TRITOS, N. A.; LEE, C.; KELLY, J.; TATRO, J. B.; HOFFMAN, G. E.; OLLMANN, M. M.; BARSH, G. S. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. **The Journal of comparative neurology**, v.402, n.4, p.442-459. 1998.
- ELMQUIST, J. K.; BJØRBÆK, C.; AHIMA, R. S.; FLIER, J. S.; SAPER, C. B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v.395, n.4, p.535-547. 1998.
- EVANS, H. M.; LONG, J. A. Characteristic Effects Upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.8, n.3, p.38-39. 1922.
- FAN, W.; ELLACOTT, K. L. J.; HALATCHEV, I. G.; TAKAHASHI, K.; YU, P.; CONE, R. D. Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. **Nat Neurosci**, v.7, n.4, p.335-336. 2004.
- FLETCHER, A.; CLIFFE, I. A.; DOURISH, C. T. Silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists: utility as research tools and therapeutic agents. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.14, n.12, p.441-448. 1993.
- FLETCHER, P. Increased food intake in satiated rats induced by the 5-HT antagonists methysergide, metergoline and ritanserin. **Psychopharmacology**, v.96, n.2, p.237-242. 1988.
- FU, L.-Y.; ACUNA-GOYCOLEA, C.; VAN DEN POL, A. N. Neuropeptide Y Inhibits Hypocretin/Orexin Neurons by Multiple Presynaptic and Postsynaptic Mechanisms: Tonic Depression of the Hypothalamic Arousal System. **The Journal of Neuroscience**, v.24, n.40, p.8741-8751. 2004.
- GARFIELD, A. S.; LAM, D. D.; MARSTON, O. J.; PRZYDZIAL, M. J.; HEISLER, L. K. Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.20, n.5, p.203-215. 2009.
- GEARY, N.; ASARIAN, L. Cyclic Estradiol Treatment Normalizes Body Weight and Test Meal Size in Ovariectomized Rats. **Physiology & Behavior**, v.67, n.1, p.141-147. 1999.
- GEARY, N.; SMITH, G. P.; CORP, E. S. The increased satiating potency of CCK-8 by estradiol is not mediated by upregulation of NTS CCK receptors. **Brain Research**, v.719, n.1-2, p.179-186. 1996.

- GEISLER, S.; ZAHM, D. S. Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. **Journal of Comparative Neurology**, v.490, n.3, p.270-294. 2005.
- GONG, E. J.; GARREL, D.; CALLOWAY, D. H. Menstrual cycle and voluntary food intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.49, n.2, p.252-8. 1989.
- GONZALES, K. L.; TETEL, M. J.; WAGNER, C. K. Estrogen Receptor (ER)  $\beta$  Modulates ER $\alpha$  Responses to Estrogens in the Developing Rat Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus. **Endocrinology**, v.149, n.9, p.4615-4621. 2008.
- GRAY, J. M.; WADE, G. N. Food intake, body weight, and adiposity in female rats: actions and interactions of progestins and antiestrogens. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.240, n.5, p.E474-E481. 1981.
- HALFORD, J.; BLUNDELL, J. The 5-HT 1B receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence. **Physiology & behavior**, v.60, n.3, p.933-939. 1996.
- HALFORD, J. C. G.; WANNINAYAKE, S. C. D.; BLUNDELL, J. E. Behavioral Satiety Sequence (BSS) for the Diagnosis of Drug Action on Food Intake. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.61, n.2, p.159-168. 1998.
- HANNON, J.; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behavioural Brain Research**, v.195, n.1, p.198-213. 2008.
- HAYNES, A. C.; JACKSON, B.; OVEREND, P.; BUCKINGHAM, R. E.; WILSON, S.; TADAYYON, M.; ARCH, J. R. S. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. **Peptides**, v.20, n.9, p.1099-1105. 1999.
- HEIDEL, E.; PLAGEMANN, A.; DAVIDOWA, H. Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. **NeuroReport**, v.10, n.9, p.1827-1831. 1999.
- HEINE, P. A.; TAYLOR, J. A.; IWAMOTO, G. A.; LUBAHN, D. B.; COOKE, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- $\alpha$  knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.23, p.12729-12734. 2000.
- HEISLER, L. K.; JOBST, E. E.; SUTTON, G. M.; ZHOU, L.; BOROK, E.; THORNTON-JONES, Z.; LIU, H. Y.; ZIGMAN, J. M.; BALTHASAR, N.; KISHI, T. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. **Neuron**, v.51, n.2, p.239-249. 2006.

- HELDRLING, N.; PIKE, A.; ANDERSSON, S.; MATTHEWS, J.; CHENG, G.; HARTMAN, J.; TUJAGUE, M.; STRÖM, A.; TREUTER, E.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.-Å. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. **Physiological Reviews**, v.87, n.3, p.905-931. 2007.
- HERVIEU, G. J.; CLUDERAY, J. E.; HARRISON, D.; MEAKIN, J.; MAYCOX, P.; NASIR, S.; LESLIE, R. A. The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, *slc-1*, in the central nervous system of the rat. **European Journal of Neuroscience**, v.12, n.4, p.1194-1216. 2000.
- HEWITT, K. N.; LEE, M. D.; DOURISH, C. T.; CLIFTON, P. G. Serotonin 2C receptor agonists and the behavioural satiety sequence in mice. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v.71, n.4, p.691-700. 2002.
- HIRSCHBERG, A. L. Sex hormones, appetite and eating behaviour in women. **Maturitas**, v.71, n.3, p.248-256. 2012.
- HJORTH, S.; SHARP, T. Effect of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis. **Life Sciences**, v.48, n.18, p.1779-1786. 1991.
- HORVATH, T. L.; DIANO, S.; VAN DEN POL, A. N. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. **The Journal of neuroscience**, v.19, n.3, p.1072-1087. 1999.
- HOYER, D.; CLARKE, D. E.; FOZARD, J. R.; HARTIG, P. R.; MARTIN, G. R.; MYLECHARANE, E. J.; SAXENA, P. R.; HUMPHREY, P. P. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). **Pharmacological Reviews**, v.46, n.2, p.157-203. 1994.
- HUSZAR, D.; LYNCH, C. A.; FAIRCHILD-HUNTRESS, V.; DUNMORE, J. H.; FANG, Q.; BERKEMEIER, L. R.; GU, W.; KESTERSON, R. A.; BOSTON, B. A.; CONE, R. D. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. **Cell**, v.88, n.1, p.131-141. 1997.
- JACKSON, A.; UPHOUSE, L. Prior Treatment with Estrogen Attenuates the Effects of the 5-HT<sub>1A</sub> Agonist, 8-OH-DPAT, on Lordosis Behavior. **Hormones and Behavior**, v.30, n.2, p.145-152. 1996.



- JACKSON, A.; UPHOUSE, L. Dose-dependent effects of estradiol benzoate on 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist action. **Brain Research**, v.796, n.1-2, p.299-302. 1998.
- JANKOWIAK, R.; STERN, J. J. Food intake and body weight modifications following medial hypothalamic hormone implants in female rats. **Physiology & Behavior**, v.12, n.5, p.875-879. 1974.
- JOBST, E. E.; ENRIORI, P. J.; COWLEY, M. A. The electrophysiology of feeding circuits. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.15, n.10, p.488-499. 2004.
- KALRA, S. P.; DUBE, M. G.; SAHU, A.; PHELPS, C. P.; KALRA, P. S. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.88, n.23, p.10931-10935. 1991.
- KASK, A.; MUTULIS, F.; MUCENIECE, R.; PÄHKLA, R.; MUTULE, I.; WIKBERG, J. E.; RÄGO, L.; SCHIÖTH, H. B. Discovery of a Novel Superpotent and Selective Melanocortin-4 Receptor Antagonist (HS024): Evaluation in Vitro and in Vivo 1. **Endocrinology**, v.139, n.12, p.5006-5014. 1998.
- KASTIN, A. J.; AKERSTROM, V.; PAN, W. Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. **Journal of Molecular Neuroscience**, v.18, n.1-2, p.7-14. 2002.
- KELLEY, A. E. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.27, n.8, p.765-776. 2004.
- KELLEY, A. E.; BALDO, B. A.; PRATT, W. E. A proposed hypothalamic-thalamic-striatal axis for the integration of energy balance, arousal, and food reward. **The Journal of Comparative Neurology**, v.493, n.1, p.72-85. 2005.
- KENNEDY, G. C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v.140, n.901, p.578-592. 1953.
- KIA, H. K.; MIQUEL, M. C.; BRISORGUEIL, M. J.; DAVAL, G.; RIAD, M.; MESTIKAWY, S. E.; HAMON, M.; VERGE, D. Immunocytochemical localization of serotonin<sub>1A</sub> receptors in the rat central nervous system. **Journal of Comparative Neurology**, v.365, n.2, p.289-305. 1996.
- KISS, J. Z.; CASSELL, M. D.; PALKOVITS, M. Analysis of the ACTH/ $\beta$ -End/ $\alpha$ -MSH-Immunoreactive afferent input to the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. **Brain Research**, v.324, n.1, p.91-99. 1984.

- KOWALSKI, T. J.; FARLEY, C.; COHEN-WILLIAMS, M. E.; VARTY, G.; SPAR, B. D. Melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonism decreases feeding by reducing meal size. **European Journal of Pharmacology**, v.497, n.1, p.41-47. 2004.
- KUIPER, G. G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, n.12, p.5925-5930. 1996.
- KUIPER, G. G. J. M.; GUSTAFSSON, J.-Å. The novel estrogen receptor- $\beta$  subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. **FEBS Letters**, v.410, n.1, p.87-90. 1997.
- LAGRANGE, A. H.; RØNNEKLEIV, O. K.; KELLY, M. J. Modulation of G Protein-Coupled Receptors by an Estrogen Receptor that Activates Protein Kinase A. **Molecular Pharmacology**, v.51, n.4, p.605-612. 1997.
- LI, Q.; MUMA, N. A. Estradiol potentiates 8-OH-DPAT-induced sumoylation of 5-HT1A receptor: Characterization and subcellular distribution of sumoylated 5-HT1A receptors. **Psychoneuroendocrinology**, v.38, n.11, p.2542-2553. 2013.
- LI, Q.; SULLIVAN, N. R.; MCALLISTER, C. E.; VAN DE KAR, L. D.; MUMA, N. A. Estradiol accelerates the effects of fluoxetine on serotonin 1A receptor signaling. **Psychoneuroendocrinology**, v.38, n.7, p.1145-1157. 2013.
- LIANG, Y.; AKISHITA, M.; KIM, S.; AKO, J.; HASHIMOTO, M.; IJIMA, K.; OHIKE, Y.; WATANABE, T.; SUDOH, N.; TOBA, K. Estrogen receptor beta is involved in the anorectic action of estrogen. **International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity**, v.26, n.8, p.1103-1109. 2002.
- LIEVERSE, R. J.; JANSEN, J. B.; MASCLÉE, A. A.; ROVATI, L. C.; LAMERS, C. B. Effect of a low dose of intraduodenal fat on satiety in humans: studies using the type A cholecystokinin receptor antagonist loxiglumide. **Gut**, v.35, n.4, p.501-505. 1994.
- LINDÉN, A.; UVNÄS-MOBERG, K.; FORSBERG, G.; BEDNAR, I.; SÖDERSTEN, P. Involvement of Cholecystokinin in Food Intake: III. Oestradiol Potentiates the Inhibitory Effect of Cholecystokinin Octapeptide on Food Intake in Ovariectomized Rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v.2, n.6, p.797-801. 1990.

- LIU, H.; KISHI, T.; ROSEBERRY, A. G.; CAI, X.; LEE, C. E.; MONTEZ, J. M.; FRIEDMAN, J. M.; ELMQUIST, J. K. Transgenic Mice Expressing Green Fluorescent Protein under the Control of the Melanocortin-4 Receptor Promoter. **The Journal of Neuroscience**, v.23, n.18, p.7143-7154. 2003.
- LONG, J. A.; EVANS, H. M. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Memories of University of California**, v.6, p.1-148. 1922.
- LÓPEZ-ALONSO, V. E.; MANCILLA-DÍAZ, J. M.; RITO-DOMINGO, M.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, B.; ESCARTÍN-PÉREZ, R. E. The effects of 5-HT 1A and 5-HT 2C receptor agonists on behavioral satiety sequence in rats. **Neuroscience letters**, v.416, n.3, p.285-288. 2007.
- LÓPEZ, M.; TENA-SEMPERE, M. Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.26, n.8, p.411-421. 2015.
- LU, N. Z.; BETHEA, C. L. Ovarian Steroid Regulation of 5-HT1A Receptor Binding and G protein Activation in Female Monkeys. **Neuropsychopharmacology**, v.27, n.1, p.12-24. 2002.
- LYONS, P. M.; TRUSWELL, A. S.; MIRA, M.; VIZZARD, J.; ABRAHAM, S. F. Reduction of food intake in the ovulatory phase of the menstrual cycle. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.49, n.6, p.1164-8. 1989.
- MALDONADO-IRIZARRY, C. S.; SWANSON, C. J.; KELLEY, A. E. Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus. **The Journal of neuroscience**, v.15, n.10, p.6779-6788. 1995.
- MALYALA, A.; ZHANG, C.; BRYANT, D. N.; KELLY, M. J.; RONNEKLEIV, O. K. PI3K signaling effects in hypothalamic neurons mediated by estrogen. **The Journal of Comparative Neurology**, v.506, n.6, p.895-911. 2008.
- MANDL, A. M. The Phases of the Oestrous Cycle in the Adult White Rat. **Journal of Experimental Biology**, v.28, n.4, p.576-584. 1951.
- MARCONDES, F.; BIANCHI, F.; TANNO, A. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v.62, n.4A, p.609-614. 2002.

- MARSH, D. J.; WEINGARTH, D. T.; NOVI, D. E.; CHEN, H. Y.; TRUMBAUER, M. E.; CHEN, A. S.; GUAN, X.-M.; JIANG, M. M.; FENG, Y.; CAMACHO, R. E. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n.5, p.3240-3245. 2002.
- MERCER, J. G.; HOGGARD, N.; WILLIAMS, L. M.; LAWRENCE, C. B.; HANNAH, L. T.; TRAYHURN, P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS Letters**, v.387, n.2-3, p.113-116. 1996.
- MESSINA, M. M.; BOERSMA, G.; OVERTON, J. M.; ECKEL, L. A. Estradiol decreases the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone in ovariectomized rats. **Physiology & Behavior**, v.88, n.4-5, p.523-528. 2006.
- MIZUNO, T. M.; MOBBS, C. V. Hypothalamic Agouti-Related Protein Messenger Ribonucleic Acid Is Inhibited by Leptin and Stimulated by Fasting. **Endocrinology**, v.140, n.2, p.814-817. 1999.
- MOKROSZ, J. L.; PALUCHOWSKA, M. H.; CHOJNACKA-WOJCIK, E.; FILIP, M.; CHARAKCHIEVA-MINOL, S.; DEREN-WESOLEK, A.; MOKROSZ, M. J. Structure-Activity Relationship Studies of Central Nervous System Agents. 13.4-[3-(Benzotriazol-1-yl) propyl]-1-(2-methoxyphenyl) piperazine, a New Putative 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Antagonist, and Its Analogs. **Journal of medicinal chemistry**, v.37, n.17, p.2754-2760. 1994.
- MONTGOMERY, A. M. J.; FLETCHER, P. J.; BURTON, M. J. Behavioural and pharmacological investigations of 5-HT hypophagia and hyperdipsia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.25, n.1, p.23-28. 1986.
- MORAN, T. H.; KINZIG, K. P. Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.286, n.2, p.183-188. 2004.
- MUSCHAMP, J. W.; HULL, E. M. Melanin concentrating hormone and estrogen receptor- $\alpha$  are coextensive but not coexpressed in cells of male rat hypothalamus. **Neuroscience Letters**, v.427, n.3, p.123-126. 2007.
- NOMURA, M.; KORACH, K. S.; PFAFF, D. W.; OGAWA, S. Estrogen receptor beta (ERbeta) protein levels in neurons depend on estrogen receptor alpha (ERalpha) gene expression and on its ligand in a brain region-specific manner. **Molecular Brain Research**, v.110, n.1, p.7-14. 2003.

- NONAKA, N.; SHIODA, S.; NIEHOFF, M. L.; BANKS, W. A. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.306, n.3, p.948-953. 2003.
- O'DONOHUE, T. L.; CHRONWALL, B. M.; PRUSS, R. M.; MEZEY, E.; KISS, J. Z.; EIDEN, L. E.; JOHN MASSARI, V.; TESSEL, R. E.; PICKEL, V. M.; DIMAGGIO, D. A.; HOTCHKISS, A. J.; CROWLEY, W. R.; ZUKOWSKA-GROJEC, Z. Neuropeptide Y and peptide YY neuronal and endocrine systems. **Peptides**, v.6, n.4, p.755-768. 1985.
- O'LONE, R.; FRITH, M. C.; KARLSSON, E. K.; HANSEN, U. Genomic Targets of Nuclear Estrogen Receptors. **Molecular Endocrinology**, v.18, n.8, p.1859-1875. 2004.
- OERTEL, W. H.; MUGNAINI, E. Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. **Neuroscience letters**, v.47, n.3, p.233-238. 1984.
- OKADA, K.; ISHII, S.; MINAMI, S.; SUGIHARA, H.; SHIBASAKI, T.; WAKABAYASHI, I. Intracerebroventricular administration of the growth hormone-releasing peptide KP-102 increases food intake in free-feeding rats. **Endocrinology**, v.137, n.11, p.5155-5158. 1996.
- ÖSTERLUND, M. K.; HURD, Y. L. Acute 17 $\beta$ -estradiol treatment down-regulates serotonin 5HT1A receptor mRNA expression in the limbic system of female rats. **Molecular Brain Research**, v.55, n.1, p.169-172. 1998.
- OTTONI, E. B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. **Behav Res Methods Instrum Comput** v.32, p.446-449. 2000.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press & Elsevier Inc., New York.**, 2007.
- PÉREZ, S. E.; CHEN, E.-Y.; MUFSON, E. J. Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. **Developmental brain research**, v.145, n.1, p.117-139. 2003.
- PETROV, T.; KRUKOFF, T. L.; JHAMANDAS, J. H. The hypothalamic paraventricular and lateral parabrachial nuclei receive collaterals from raphe nucleus neurons: a combined double retrograde and immunocytochemical study. **Journal of Comparative Neurology**, v.318, n.1, p.18-26. 1992.
- PEYRON, C.; TIGHE, D. K.; VAN DEN POL, A. N.; DE LECEA, L.; HELLER, H. C.; SUTCLIFFE, J. G.; KILDUFF, T. S. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. **The Journal of Neuroscience**, v.18, n.23, p.9996-10015. 1998.

- PHILLIPSON, O. Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v.187, n.1, p.117-143. 1979.
- POGGIOLI, R.; VERGONI, A. V.; BERTOLINI, A. ACTH-(1-24) and  $\alpha$ -MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. **Peptides**, v.7, n.5, p.843-848. 1986.
- POLLOCK, J. D.; ROWLAND, N. Peripherally administered serotonin decreases food intake in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.15, n.2, p.179-183. 1981.
- QIU, J.; BOSCH, M. A.; TOBIAS, S. C.; GRANDY, D. K.; SCANLAN, T. S.; RÄ, NNEKLEIV, O. K.; KELLY, M. J. Rapid Signaling of Estrogen in Hypothalamic Neurons Involves a Novel G-Protein-Coupled Estrogen Receptor that Activates Protein Kinase C. **The Journal of Neuroscience**, v.23, n.29, p.9529-9540. 2003.
- QIU, J.; BOSCH, M. A.; TOBIAS, S. C.; KRUST, A.; GRAHAM, S. M.; MURPHY, S. J.; KORACH, K. S.; CHAMBON, P.; SCANLAN, T. S.; RÄ, NNEKLEIV, O. K.; KELLY, M. J. A G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Is Involved in Hypothalamic Control of Energy Homeostasis. **The Journal of Neuroscience**, v.26, n.21, p.5649-5655. 2006.
- QU, D.; LUDWIG, D. S.; GAMMELTOFT, S.; PIPER, M.; PELLEYMOUNTER, M. A.; CULLEN, M. J.; MATHES, W. F.; PRZYPEK, J.; KANAREK, R.; MARATOS-FLIER, E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. **Nature**, v.380, n.6571, p.243-247. 1996.
- RAAP, D. I. K.; DONCARLOS, L.; GARCIA, F.; MUMA, N. A.; WOLF, W. A.; BATTAGLIA, G.; VAN DE KAR, L. D. Estrogen desensitizes 5-HT<sub>1A</sub> receptors and reduces levels of G $\alpha$ , G $\beta$ 1 and G $\beta$ 3 proteins in the hypothalamus. **Neuropharmacology**, v.39, n.10, p.1823-1832. 2000.
- REVANKAR, C. M.; CIMINO, D. F.; SKLAR, L. A.; ARTERBURN, J. B.; PROSSNITZ, E. R. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. **Science**, v.307, n.5715, p.1625-1630. 2005.
- RIOS, M.; FAN, G.; FEKETE, C.; KELLY, J.; BATES, B.; KUEHN, R.; LECHAN, R. M.; JAENISCH, R. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. **Molecular endocrinology**, v.15, n.10, p.1748-1757. 2001.

- ROEPKE, T. A.; RONNEKLEIV, O. K.; KELLY, M. J. Physiological consequences of membrane-initiated estrogen signaling in the brain. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v.16, p.1560-1573. 2011.
- ROESCH, D. M. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. **Physiology & Behavior**, v.87, n.1, p.39-44. 2006.
- ROSSI, D. V.; DAI, Y.; THOMAS, P.; CARRASCO, G. A.; DONCARLOS, L. L.; MUMA, N. A.; LI, Q. Estradiol-induced desensitization of 5-HT1A receptor signaling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus is independent of estrogen receptor-beta. **Psychoneuroendocrinology**, v.35, n.7, p.1023-1033. 2010a.
- ROSSI, M.; CHOI, S. J.; O'SHEA, D.; MIYOSHI, T.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Melanin-Concentrating Hormone Acutely Stimulates Feeding, But Chronic Administration Has No Effect on Body Weight. **Endocrinology**, v.138, n.1, p.351-355. 1997.
- ROSSI, M.; KIM, M.; MORGAN, D.; SMALL, C.; EDWARDS, C.; SUNTER, D.; ABUSNANA, S.; GOLDSTONE, A.; RUSSELL, S.; STANLEY, S. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. **Endocrinology**, v.139, n.10, p.4428-4431. 1998.
- SAKURAI, T.; AMEMIYA, A.; ISHII, M.; MATSUZAKI, I.; CHEMELLI, R. M.; TANAKA, H.; WILLIAMS, S. C.; RICHARDSON, J. A.; KOZLOWSKI, G. P.; WILSON, S. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. **Cell**, v.92, n.4, p.573-585. 1998.
- SALAMANCA, S.; UPHOUSE, L. Estradiol modulation of the hyperphagia induced by the 5-HT1A agonist, 8-OH-DPAT. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.43, n.3, p.953-955. 1992.
- SANTOLLO, J.; DANIELS, D. Multiple estrogen receptor subtypes influence ingestive behavior in female rodents. **Physiology & Behavior**, v.152, Part B, p.431-437. 2015.
- SANTOLLO, J.; ECKEL, L. A. Estradiol decreases the orexigenic effect of neuropeptide Y, but not agouti-related protein, in ovariectomized rats. **Behavioural Brain Research**, v.191, n.2, p.173-177. 2008.

- SANTOLLO, J.; ECKEL, L. A. Oestradiol decreases melanin-concentrating hormone (MCH) and MCH receptor expression in the hypothalamus of female rats. **Journal of neuroendocrinology**, v.25, n.6, p.570-579. 2013.
- SANTOLLO, J.; TORREGROSSA, A.-M.; ECKEL, L. A. Estradiol acts in the medial preoptic area, arcuate nucleus, and dorsal raphe nucleus to reduce food intake in ovariectomized rats. **Hormones and Behavior**, v.60, n.1, p.86-93. 2011.
- SANTOLLO, J.; WILEY, M. D.; ECKEL, L. A. Acute activation of ER $\alpha$  decreases food intake, meal size, and body weight in ovariectomized rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.293, n.6, p.R2194-R2201. 2007.
- SAWCHENKO, P.; SWANSON, L.; STEINBUSCH, H.; VERHOFSTAD, A. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **Brain research**, v.277, n.2, p.355-360. 1983.
- SCHWARTZ, M. W.; SIPOLS, A. J.; MARKS, J. L.; SANACORA, G.; WHITE, J. D.; SCHEURINK, A.; KAHN, S. E.; BASKIN, D. G.; WOODS, S. C.; FIGLEWICZ, D. P. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. **Endocrinology**, v.130, n.6, p.3608-3616. 1992.
- SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v.404, n.6778, p.661-671. 2000.
- SHIMADA, M.; TRITOS, N. A.; LOWELL, B. B.; FLIER, J. S.; MARATOS-FLIER, E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. **Nature**, v.396, n.6712, p.670-674. 1998.
- SHIMIZU, H.; SHIMOMURA, Y.; NAKANISHI, Y.; FUTAWATARI, T.; OHTANI, K.; SATO, N.; MORI, M. Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. **Journal of Endocrinology**, v.154, n.2, p.285-292. 1997.
- SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V.; MERCHENTHALER, I. Comparative Distribution of Estrogen Receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNA in the Rat Central Nervous System. **The Journal of Comparative Neurology**, v.388, p.507-525. 1997.
- SILVA, L. E. C. M.; CASTRO, M.; AMARAL, F. C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. K. Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, p.759-766. 2010.



- SIMANSKY, K. J.; VAIDYA, A. Behavioral mechanisms for the anorectic action of the serotonin (5-HT) uptake inhibitor sertraline in rats: comparison with directly acting 5-HT agonists. **Brain research bulletin**, v.25, n.6, p.953-960. 1990.
- SKULADOTTIR, G. V.; JONSSON, L.; SKARPHEDINSSON, J. O.; MUTULIS, F.; MUCENIECE, R.; RAINE, A.; MUTULE, I.; HELGASON, J.; PRUSIS, P.; WIKBERG, J. E. Long term orexigenic effect of a novel melanocortin 4 receptor selective antagonist. **British journal of pharmacology**, v.126, n.1, p.27-34. 1999.
- SMALL, C. J.; BLOOM, S. R. Gut hormones as peripheral anti obesity targets. **Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders**, v.3, n.5, p.379-388. 2004.
- SMITH, A. W.; BOSCH, M. A.; WAGNER, E. J.; RĂ, NNEKLEIV, O. K.; KELLY, M. J. The membrane estrogen receptor ligand STX rapidly enhances GABAergic signaling in NPY/AgRP neurons: role in mediating the anorexigenic effects of 17 $\beta$ -estradiol. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.305, n.5, p.E632-E640. 2013.
- SOARES, V. D. P.; ZANGROSSI JR, H. Involvement of 5-HT1A and 5-HT2 receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. **Brain Research Bulletin**, v.64, n.2, p.181-188. 2004.
- SPARY, E. J.; CHAPMAN, S. E.; SINFIELD, J. K.; MAQBOOL, A.; KAYE, J.; BATTEN, T. F. C. Novel G Protein-Coupled Oestrogen Receptor GPR30 Shows Changes in mRNA Expression in the Rat Brain over the Oestrous Cycle. **Neurosignals**, v.21, n.1-2, p.14-27. 2013.
- SRIVASTAVA, D. P.; EVANS, P. D. G-Protein Oestrogen Receptor 1: Trials and Tribulations of a Membrane Oestrogen Receptor. **Journal of Neuroendocrinology**, v.25, n.11, p.1219-1230. 2013.
- STANLEY, B. G.; LEIBOWITZ, S. F. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.82, n.11, p.3940-3943. 1985.
- STANLEY, S.; WYNNE, K.; MCGOWAN, B.; BLOOM, S. Hormonal regulation of food intake. **Physiological reviews**, v.85, n.4, p.1131-1158. 2005.
- STEFFENS, S. Ingestão de alimento após a ativação de receptores 5-HT1A no núcleo arqueado do hipotálamo e da área hipotalâmica lateral de ratas em duas fases do ciclo estral. **Tese de Doutorado**, p.101p. 2009.

- STEFFENS, S. M.; BECKMAN, D.; FARIA, M. S.; MARINO-NETO, J.; PASCHOALINI, M. A. WAY100635 blocks the hypophagia induced by 8-OH-DPAT in the hypothalamic nuclei. **Physiology & Behavior**, v.99, n.5, p.632-637. 2010.
- STEFFENS, S. M.; DA CUNHA, I. C.; BECKMAN, D.; LOPES, A. P. F.; FARIA, M. S.; MARINO-NETO, J.; PASCHOALINI, M. A. The effects of metergoline and 8-OH-DPAT injections into arcuate nucleus and lateral hypothalamic area on feeding in female rats during the estrous cycle. **Physiology & Behavior**, v.95, n.3, p.484-491. 2008.
- STRADER, A. D.; WOODS, S. C. Gastrointestinal hormones and food intake. **Gastroenterology**, v.128, n.1, p.175-191. 2005.
- STRATFORD, T. R.; KELLEY, A. E. Evidence of a Functional Relationship between the Nucleus Accumbens Shell and Lateral Hypothalamus Subserving the Control of Feeding Behavior. **The Journal of Neuroscience**, v.19, n.24, p.11040-11048. 1999.
- STUART, R. C.; BJØRBÆK, C.; MÜNZZBERG, H.; NILLNI, E. A. N-acetylation of hypothalamic  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone and regulation by leptin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.32, p.11797-11802. 2004.
- SUZUKI, K.; JAYASENA, C. N.; BLOOM, S. R. The gut hormones in appetite regulation. **Journal of obesity**, v.11, p.10. 2011.
- THAMMACHAROEN, S.; LUTZ, T. A.; GEARY, N.; ASARIAN, L. Hindbrain Administration of Estradiol Inhibits Feeding and Activates Estrogen Receptor- $\alpha$ -Expressing Cells in the Nucleus Tractus Solitarius of Ovariectomized Rats. **Endocrinology**, v.149, n.4, p.1609-1617. 2008.
- THOMAS, P.; PANG, Y.; FILARDO, E. J.; DONG, J. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, v.146, n.2, p.624-632. 2005.
- TITOLO, D.; CAI, F.; BELSHAM, D. D. Coordinate Regulation of Neuropeptide Y and Agouti-Related Peptide Gene Expression by Estrogen Depends on the Ratio of Estrogen Receptor (ER) $\alpha$  to ER $\beta$  in Clonal Hypothalamic Neurons. **Molecular Endocrinology**, v.20, n.9, p.2080-2092. 2006.
- TITOLO, D.; MAYER, C. M.; DHILLON, S. S.; CAI, F.; BELSHAM, D. D. Estrogen Facilitates both Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and ERK1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Membrane Signaling Required for Long-Term Neuropeptide Y Transcriptional Regulation in Clonal, Immortalized Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v.28, n.25, p.6473-6482. 2008.

- TURENIUS, C. I.; CHARLES, J. R.; TSAI, D. H.; EBERSOLE, P. L.; HTUT, M. H.; NGO, P. T.; LARA, R. N.; STANLEY, B. G. The tuberal lateral hypothalamus is a major target for GABA A-but not GABA B-mediated control of food intake. **Brain research**, v.1283, p.65-72. 2009.
- UPHOUSE, L.; SALAMANCA, S.; CALDAROLA-PASTUSZKA, M. Gender and estrous cycle differences in the response to the 5-HT 1A agonist 8-OH-DPAT. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.40, n.4, p.901-906. 1991.
- URSTADT, K. R.; COOP, S. H.; BANUELOS, B. D.; STANLEY, B. G. Behaviorally specific versus non-specific suppression of accumbens shell-mediated feeding by ipsilateral versus bilateral inhibition of the lateral hypothalamus. **Behavioural Brain Research**, v.257, p.230-241. 2013.
- URSTADT, K. R.; KALLY, P.; ZAIDI, S. F.; STANLEY, B. G. Ipsilateral feeding-specific circuits between the nucleus accumbens shell and the lateral hypothalamus: Regulation by glutamate and GABA receptor subtypes. **Neuropharmacology**, v.67, p.176-182. 2013.
- USUDA, I.; TANAKA, K.; CHIBA, T. Efferent projections of the nucleus accumbens in the rat with special reference to subdivision of the nucleus: biotinylated dextran amine study. **Brain Research**, v.797, n.1, p.73-93. 1998.
- VAISSE, C.; CLEMENT, K.; GUY-GRAND, B.; FROGUEL, P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. **Nature genetics**, v.20, n.2, p.113-114. 1998.
- VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, v.18, n.2, p.158-168. 2008.
- VANDESANDE, F.; MEY, J.; DIERICKX, K. Identification of neurophysin producing cells. **Cell and Tissue Research**, v.151, n.2, p.187-200. 1974.
- VARMA, M.; CHAI, J.-K.; MEGUID, M. M.; LAVIANO, A.; GLEASON, J. R.; YANG, Z.-J.; BLAHA, V. Effect of estradiol and progesterone on daily rhythm in food intake and feeding patterns in Fischer rats. **Physiology & Behavior**, v.68, n.1-2, p.99-107. 1999.
- VONG, L.; YE, C.; YANG, Z.; CHOI, B.; CHUA JR, S.; LOWELL, BRADFORD B. Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. **Neuron**, v.71, n.1, p.142-154. 2011.

- WADE, G. N. Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats. **Journal of comparative and physiological psychology**, v.88, n.1, p.183. 1975.
- WANG, L.; SAINT-PIERRE, D. H.; TACHÉ, Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y – synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. **Neuroscience Letters**, v.325, n.1, p.47-51. 2002.
- WESOLOWSKA, A.; PALUCHOWSKA, M.; CHOJNACKA-WÓJCIK, E. Involvement of presynaptic 5-HT<sub>1A</sub> and benzodiazepine receptors in the anticonflict activity of 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists. **European Journal of Pharmacology**, v.471, n.1, p.27-34. 2003.
- WHITNALL, M. H. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. **Progress in neurobiology**, v.40, n.5, p.573-629. 1993.
- WILLOUGHBY, J.; BLESSING, W. Origin of serotonin innervation of the arcuate and ventromedial hypothalamic region. **Brain research**, v.418, n.1, p.170-173. 1987.
- WONG, D. T.; REID, L. R.; THRELKELD, P. G. Suppression of food intake in rats by fluoxetine: Comparison of enantiomers and effects of serotonin antagonists. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.31, n.2, p.475-479. 1988.
- WOODS, S. C.; D'ALESSIO, D. A. Central control of body weight and appetite. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.93, n.11\_supplement\_1, p.37-50. 2008.
- WOODS, S. C.; SEELEY, R. J.; PORTE, D.; SCHWARTZ, M. W. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. **Science**, v.280, n.5368, p.1378-1383. 1998.
- XU, B.; GOULDING, E. H.; ZANG, K.; CEPOI, D.; CONE, R. D.; JONES, K. R.; TECOTT, L. H.; REICHARDT, L. F. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. **Nature neuroscience**, v.6, n.7, p.736-742. 2003.

## ANEXO 1

### Protocolo de aprovação do comitê de ética no uso de animais.

**Protocolo**

PP00755

**Título**

Metodologias utilizadas no Laboratório de Neurobiologia da Ingestão de Alimento para a avaliação da ingestão de alimento e sua associação com comportamentos relacionado com medo/ansiedade

**Data de Entrada**

21/05/2012

**Resultado:**

Aprovado

**Data / Prazo**

25/02/2015

**Considerações**

Ofício nº 001/CEUA/PROPEQ/2015

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a), Marta Aparecida Paschaolini

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO AD REFERENDUM o adendo com as novas metodologias e suplementação de dois mil e quinhentos ratos (*Rattus Norvegicus*).

Adita-se o Ofício nº Ofício nº 52/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Marta Aparecida Paschaolini, Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no parecer final estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: quatro mil ratos (*Rattus Norvegicus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)****Data 05/06/2016**

Data 25/02/20: ~

**Parecer(es):**

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE