

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

**MODIFICAÇÕES NA NEUROTRANSMISSÃO ADRENÉRGICA NO**  
**NÚCLEO DORSAL DA RAPE E SEUS EFEITOS SOBRE OS**  
**COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À INGESTÃO DE**  
**ALIMENTOS EM RATOS**

**RAFAEL APPEL FLORES**

**Florianópolis**

**2018**



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

**MODIFICAÇÕES NA NEUROTRANSMISSÃO ADRENÉRGICA NO**  
**NÚCLEO DORSAL DA RAPE E SEUS EFEITOS SOBRE OS**  
**COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À INGESTÃO DE**  
**ALIMENTOS EM RATOS**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra: Marta Aparecida Paschoalini**

**Aluno: Rafael Appel Flores**

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

**Florianópolis**

**2018**

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

Flores, Rafael Appel  
Modificações na neurotransmissão adrenérgica no  
núcleo dorsal da rafe e seus efeitos sobre os  
comportamentos relacionados à ingestão de alimentos  
em ratos / Rafael Appel Flores ; orientadora, Marta  
Aparecida Paschoalini, 2018.  
122 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

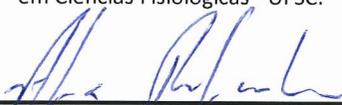
1. Ciências Fisiológicas. 2. Núcleo dorsal da  
rafe. 3. serotonina. 4. ingestão de alimentos. 5.  
receptores adrenérgicos. I. Paschoalini, Marta  
Aparecida . II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em  
Ciências Fisiológicas. III. Título.

**“Modificações na neurotransmissão adrenérgica no núcleo dorsal da rafe e seus efeitos sobre os comportamentos relacionados à ingestão de alimentos em ratos”**

Por

**Rafael Appel Flores**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (005/2018/PPGMCF) do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - UFSC.



Prof.(a) Dr.(a) Alex Rafacho

Coordenador(a) do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Banca examinadora:



Dr.(a) Marta Aparecida Paschoalini (Universidade Federal de Santa Catarina)

Orientador(a)



**Alex Rafacho**

Coordenador do PPG

Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

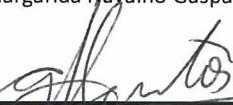
Dr.(a) José Donato Junior (Universidade de São Paulo) –  
participação por videoconferência



Dr.(a) Fernanda Barbosa Lima Christian (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Joana Margarida Nayalho Gaspar (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Gustavo Jorge dos Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 13 de julho de 2018.



## AGRADECIMENTOS

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

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

Agradeço a minha “segunda” família, por todo apoio, força e carinho dados aos longos desses anos. Obrigado Luiz, Rossi, Letícia e Luiz Henrique.

Gostaria de fazer um agradecimento especial a minha noiva Renata, pois sem ela nada disso seria possível. Obrigado pelas tardes que você me fez companhia no laboratório. Obrigada por você estar sempre ao meu lado, me apoiando e confiando em mim. Sem você nada disso teria sentido! Obrigado por tudo meu amor!

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Aparecida Paschoalini pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório, por todo o conhecimento que adquiri e pela confiança em mim depositada.

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

Agradeço ao Prof. Dr. Martin Andreas Metzger, da Universidade de São Paulo, por todo apoio e ajudas nas quantificações imunoistoquímicas e por disponibilizar os equipamentos de seu laboratório necessários para as análises.

À técnica de laboratório Ana Maria Peracoli Campos, pela sua amizade e por toda a ajuda e conhecimento compartilhado.

Agradeço a todos os amigos(as) e colegas de laboratório que de alguma forma participaram dessa jornada. E agradeço também por aqueles os quais acabei me afastando, principalmente pela compreensão dos mesmos de que um doutorado exige certos sacrifícios e horas extras.

Ao Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – UFSC e aos professores do programa, que possibilitaram e ajudaram a construir este trabalho.

Aos colaboradores do nosso departamento Dona Vilma e Carlos.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

## EPÍGRAFE

“...Life's a journey, not a destination  
And I just can't tell just what tomorrow brings  
You have to learn to crawl  
Before you learn to walk...”

Trecho da música “Amazing” de Aerosmith.



## Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da injeção de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos no núcleo dorsal da rafe (DRN) sobre os comportamentos relacionados à ingestão de alimentos em ratos saciados e submetidos o jejum noturno. Ratos wistar, machos e adultos, com cânulas-guia implantadas cronicamente no DRN foram injetados com adrenalina (AD) (doses de 6, 20 e 60 nmol) ou com noradrenalina (NA) nas mesmas doses, além de agonista  $\alpha$ -1 adrenérgico Fenilefrina (FEN) e agonista  $\alpha$ -2 adrenérgico Clonidina (CLO) seguida pela avaliação de parâmetros comportamentais ingestivos. O comportamento foi monitorado durante 60 minutos e a quantidade de alimento e água ingerida foi avaliada. Os tratamentos com AD e NA na dose de 60 nmol e com CLO na dose de 20 nmol aumentaram a ingestão de alimento em ratos saciados, aumentando também a duração e a frequência e diminuindo a latência para iniciar o consumo. Em ratos submetidos ao jejum noturno, a dose de 60 nmol de AD e NA e a dose de 20 nmol de FEN diminuíram a ingestão alimentar quando comparado ao grupo controle. Este efeito veio acompanhado também de queda na duração do comportamento ingestivo. A ingestão hídrica foi alterada apenas nos animais submetidos ao jejum noturno, ocorrendo uma diminuição na quantidade de água consumida. As análises imunistoquímicas revelaram que houve um aumento de atividade neuronal no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e um aumento de atividade de neurônios  $\alpha$ -MSH+ no núcleo arqueado (ARC) após a injeção de CLO 20 nmol no DRN de ratos saciados. Em contrapartida, houve uma diminuição da atividade neuronal no PVN e uma diminuição da atividade de neurônios  $\alpha$ -MSH+ no ARC após a injeção de FEN 20 nmol no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Em conclusão, os resultados indicam uma ativação diferencial dos receptores  $\alpha$  adrenérgicos do DRN, que parece

ser dependente da disponibilidade do alimento. Além disso, as modificações na atividade neuronal encontradas no PVN e em neurônios POMC do ARC após as modificações na neurotransmissão adrenérgica no DRN sugere que este núcleo atue através de mecanismos homeostáticos no controle da ingestão alimentar.

Palavras Chave: Núcleo dorsal da rafe, serotonina, ingestão de alimentos, receptores adrenérgicos, núcleo paraventricular, núcleo arqueado.

## **Abstract**

The present study aimed to evaluate the effects of the injection of  $\alpha$ -adrenergic agonists into the dorsal raphe nucleus (DRN) on behaviors related to food intake in free-feeding rats and and fasted. Adult male wistar rats with chronically implanted cannulae in the DRN were injected with adrenaline (AD) or noradrenaline (NA) (both at doses of 6, 20 and 60 nmol), or  $\alpha$ -1 adrenergic agonist Phenylephrine (FEN) or  $\alpha$ -2 adrenergic agonist Clonidine (CLO) (both at doses of 6 and 20 nmol). The injection were followed by the evaluation of ingestive behavioral parameters. Food and water intake was evaluated for 60 minutes. Administration of AD and NA at 60 nmol and CLO at 20 nmol increased food intake and decreased latency to start consumption in free-feeding rats. AD, NA (both at dose of 60 nmol) and FEN (20 nmol) decreased food intake in fasted rats when compared to the controle group. This effect was followed by a decrease in the duration of ingestive behavior. Water intake was decreased only in fasted animals. Immunohistochemical analyzes revealed an increase in Fos positive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and an increase of  $\alpha$ -MSH + neurons activity in the arcuate nucleus (ARC) after injection of CLO 20 nmol in the DRN of free-feeding rats. In contrast, there was a decrease in neuronal activity in the PVN and a decrease in  $\alpha$ -MSH + neurons activity in the ARC after the injection of FEN 20 nmol in the DRN of fasted. In conclusion, these results highlight the functional role of DRN adrenergic receptors in the control of food intake and indicate a differential activation of the DRN adrenergic receptors, which appears to be dependent on food availability. In addition, the modifications in neuronal activity found in PVN and in POMC neurons of the ARC after the modifications in adrenergic neurotransmission in DRN suggest that this nucleus controls food intake through homeostatic mechanisms.

Keywords: Dorsal Raphe Nucleus, serotonin, food intake, adrenergic receptors, paraventricular nucleus, arcuate nucleus.

## LISTA DE ABREVIATURAS

3V – Terceiro ventrículo

5-HT – Serotonina

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

AD – Adrenalina

AgRP – Peptídeo relacionado ao Agouti

LHA – Área Hipotlâmica Lateral

ANOVA – Análise de variância

ARC – Núcleo Arqueado

BLA – Amígdala basolateral

CART – Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina

CCK – Colecistocinina

CLO – Clonidina

DAB - Tetrahydro Cloridrato Diaminobenzidina

DR – Dorsal da rafe

EPM – Erro padrão da média

FEN – Fenilefrina

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GI – Trato Gastrointestinal

GLP – Glucagon like peptide

GRI – Genes de resposta imediata

HTL – Áreas hipotalâmicas

VMH – Hipotálamo Ventromedial

ICV – Intracerebroventricular

ip. - intraperitoneal

KPBS – Tampão Salina Fostato Potássio

KPBS-T – KPBS + TRITON

LC – Locus Coeruleus

LHb – Habenula lateral

MCH – Hormônio concentrador de melanina

MnR – Mediano da rafe

mPFC – Córtex prefrontal medial

$\alpha$ -MSH – Homônio estimulador de alfa melanócitos

MO – Microscópio Óptico

NA – Noradrenalina

DRN – Núcleo Dorsal da Rafe

MRN – Núcleo Mediano da Rafe

NPY – Neuropeptídeo Y

NTS – Núcleo do Trato Solitário

PAG – Substância cinzenta  
periaquedutal

PBS – Tampão Fosfato Salina

PFA – Paraformaldeído

POMC – Pró-opimelanocortina

pons – Núcleo pontino

PVN – Núcleo Paraventricular

PYY – Peptídeo YY

SAL – Salina

SN – Substância nigra

SNC – Sistema Nervoso Central

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Desenho esquemático representando a localização dos núcleos da rafe de uma secção sagital do encéfalo de rato e as suas projeções. Abreviaturas: C. Put = caudado putamen (Adaptado de Frazer e Hensler, 1999).....8
- Figura 2:** Representação esquemática de estruturas e neurotransmissores envolvidos na regulação de neurônios 5-HT. Os principais neurotransmissores envolvidos são noradrenalina, glutamato e GABA. As siglas apresentadas são: núcleo pontino (pons) (incluindo o locus coeruleus, LC), córtex prefrontal medial (mPFC), habenula lateral (LHb), substância nigra (SN), substância cinzenta periaquedutal (PAG), bem como as diferentes áreas hipotalâmicas (HTL), dorsal da rafe (DR), mediano da rafe (MnR) (Adaptado Adell et al., 2002).....10
- Figura 3:** Aparelho estereotáxico.....20
- Figura 4:** Sistema de injeção das drogas.....22
- Figura 5:** Caixa experimental.....23
- Figura 6:** Registro digital da sessão.....24
- Figura 7:** Desenhos esquemáticos representando os locais das microinjeções em três níveis diferentes no DRN e fotomicrografia de um corte coronal de mesencéfalo, demonstrando o local de injeção no DRN. DRN = núcleo dorsal da rafe; Aq = aqueduto. (Adaptado de Paxinos e Watson, 2007).....31
- Figura 8:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou adrenalina (AD) nas doses de 6 nmol (n = 8), 20 nmol (n = 8) e 60 nmol (n = 8) no DRN de ratos saciados. Os dados representam a média ± EPM \**p* < 0,05 quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.....33
- Figura 9:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou

noradrenalina (NA) nas doses de 6 nmol (n = 8), 20 nmol (n = 8) e 60 nmol (n = 8) no DRN de ratos saciados. Os dados representam a média ± EPM \**p* < 0,05 quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.....35

**Figura 10:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou fenilefrina (FEN) nas doses de 6 nmol (n = 8) e 20 nmol (n = 8) no DRN de ratos saciados. Os dados representam a média ± EPM. ANOVA de uma via.....37

**Figura 11:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou clonidina (CLO) nas doses de 6 nmol (n = 8) e 20 nmol (n = 8) no DRN de ratos saciados. Os dados representam a média ± EPM \**p* < 0,05 quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.....39

**Figura 12:** A) Desenho esquemático e corte histológico demonstrando os núcleos PVN e LHA. B) Desenho esquemático e corte histológico demonstrando os núcleos ARC e VMH C) Desenho esquemático e corte histológico demonstrando a BLA. Para abreviações consultar lista de abreviaturas (Adaptado de Paxinos e Watson, 2007).....41

**Figura 13:** A) Gráfico representando o número de células Fos + nos diferentes núcleos hipotalâmicos estudados (n = 4 - 5 por grupo) após a injeção de CLO 20 no DRN de ratos saciados. Os dados representam a média ± EPM \**p* < 0,05 quando comparado ao grupo SAL. Teste T de Student não pareado. B) Gráfico de correlação entre consumo alimentar e o número de células Fos + no PVN dos grupos SAL e CLO 20nmol. C) Gráfico de correlação entre consumo alimentar e o número de células Fos + no ARC dos grupos SAL e CLO 20nmol. Teste de correlação de Pearson \**p* < 0,05. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.....42

**Figura 14:** Fotomicrografias ilustrando a expressão de Fos em núcleos hipotalâmicos após a administração de CLO 20 nmol no DRN. A – B) Expressão de Fos no PVN. C – D) Expressão de Fos no ARC. Barra de escala = 200µm. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.....43

**Figura 15:** A) Porcentagem de células  $\alpha$ -MSH +/- Fos + após a injeção de Clonidina 20 nmol no DRN de ratos saciados. Test T não pareado.  $*p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. B) Gráfico de correlação entre consumo alimentar e a porcentagem de células  $\alpha$ -MSH +/- Fos + no ARC dos grupos SAL e CLO 20nmol. Teste de correlação de Pearson  $*p < 0,05$ . Para abreviações consultar lista de abreviaturas.....44

**Figura 16:** Fotomicrografias de imunofluorescência ilustrando a colocalização da proteína Fos em neurônios  $\alpha$ -MSH + localizados no ARC após a administração de CLO 20 nmol no DRN de ratos saciados. Em vermelho, células  $\alpha$ -MSH + e em verde, células Fos +. Em detalhes no insert, as duplas marcações  $\alpha$ -MSH + /Fos +. Barra de escala = 200 $\mu$ m e 100  $\mu$ m para o *insert*. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.....45

**Figura 17:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou adrenalina (AD) nas doses de 6 nmol (n = 8), 20 nmol (n = 8) e 60 nmol (n = 8) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM  $*p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.....47

**Figura 18:** A) Alterações na quantidade da ingestão de água durante 1 hora após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou adrenalina (AD) nas doses de 6 nmol (n = 8), 20 nmol (n = 8) e 60 nmol (n = 8) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM  $*p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey. B) Gráfico de correlação entre a quantidade de água e a quantidade de alimento ingerido após administração de AD 60 nmol ou SAL no DRN. Teste de correlação de Pearson  $*p < 0,05$ .....48

**Figura 19:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou noradrenalina (NA) nas doses de 6 nmol (n = 8), 20 nmol (n = 8) e 60 nmol (n = 8) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM  $*p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.....50

**Figura 20:** A) Alterações na quantidade da ingestão de água durante 1 hora após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou noradrenalina (NA) nas doses de 6 nmol (n = 8), 20 nmol (n = 8) e 60 nmol (n = 8) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média ± EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey. B) Gráfico de correlação entre a quantidade de água e a quantidade de alimento ingerido após administração de NA 60 nmol ou SAL no DRN. Teste de correlação de Pearson \* $p < 0,05$ .....51

**Figura 21:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou fenilefrina (FEN) nas doses de 6 nmol (n = 8) e 20 nmol (n = 8) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média ± EPM \* $p < 0,05$ . ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey....53

**Figura 22:** A) Alterações na quantidade da ingestão de água durante 1 hora após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou fenilefrina (FEN) nas doses de 6 nmol (n = 8) e 20 nmol (n = 8) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média ± EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey. B) Gráfico de correlação entre a quantidade de água e a quantidade de alimento ingerido após administração de FEN 6, 20 nmol ou SAL no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Teste de correlação de Pearson \* $p < 0,05$ .....54

**Figura 23:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou clonidina (CLO) nas doses de 6 nmol (n = 8) e 20 nmol (n = 8) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média ± EPM. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.....56

**Figura 24:** Alterações na quantidade da ingestão de água durante 1 hora após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou clonidina (CLO) nas doses de 6 nmol (n = 8) e 20 nmol (n = 8) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média ± EPM. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.....57

**Figura 25:** A) Gráfico representando o número de células Fos + nos diferentes núcleos hipotalâmicos estudados (n = 4 - 5 por grupo) após a injeção de FEN 20 nmol no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média ± EPM \*p < 0,05 quando comparado ao grupo SAL. Teste T de Student não pareado. B) Gráfico de correlação entre consumo alimentar e o número de células Fos + no PVN dos grupos SAL e FEN 20nmol. Teste de correlação de Pearson \*p < 0,05. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.....59

**Figura 26:** Fotomicrografias ilustrando a expressão de Fos em núcleos hipotalâmicos após a administração de FEN 20 nmol no DRN. A - B) Expressão de Fos no PVN. Barra de escala = 200µm. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.....59

**Figura 27:** A) Porcentagem de células α-MSH +/- Fos + após a injeção de Fenilefrina 20 nmol no DRN de ratos saciados (n = 4 - 5 por grupo). Test T não pareado. \*p < 0,05 quando comparado ao grupo SAL. B) Gráfico de correlação entre consumo alimentar e a porcentagem de células α-MSH +/- Fos + no ARC dos grupos SAL e FEN 20nmol. Teste de correlação de Pearson \*p < 0,05. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.....60

**Figura 28:** Fotomicrografias de imunofluorescência ilustrando a co-localização da proteína Fos em neurônios α-MSH + localizados no ARC após a administração de FEN 20 nmol no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Em vermelho, células α-MSH + e em verde, células Fos +. Em detalhes no insert, as duplas marcações α-MSH + /Fos +. Barra de escala = 200µm e 100 µm para o insert. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.....61

**Figura 29:** Desenho esquemático ilustrando a hipótese de funcionamento diferencial de receptores α-adrenérgicos no DRN em ratos saciados e submetidos ao jejum. A) Animais saciados. Neste caso, a injeção de AD, NA ou CLO atuariam o receptor α-2 levando a uma diminuição na liberação de NA endógena e conseqüente diminuição na liberação de serotonina no hipotálamo. B) Animais de submetidos ao jejum. Neste caso, a injeção de AD, NA ou FEN atuariam o receptor α-1 levando a uma maior liberação de serotonina no hipotálamo. Fonte: adaptado de Schwartz et al., 2000.....65



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos saciados durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), AD 6 nmol (n = 8), AD 20 nmol (n = 8) e AD 60 nmol (n = 8).....34
- Tabela 2:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos saciados durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), NA 6 nmol (n = 8), NA 20 nmol (n = 8) E NA 60 nmol (n = 8).....36
- Tabela 3:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos saciados durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), FEN 6 nmol (n = 8) e FEN 20 nmol (n = 8).....38
- Tabela 4:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos saciados durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), CLO 6 nmol (n = 8) e CLO 20 nmol (n = 8).....40
- Tabela 5:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos submetidos ao jejum noturno durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), AD 6 nmol (n = 8), AD 20 nmol (n = 8), AD 60 nmol (n = 8).....49
- Tabela 6:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos submetidos ao jejum noturno durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), NA 6 nmol (n = 8), NA 20 nmol (n = 8), NA 60 nmol (n = 8).....52
- Tabela 7:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos submetidos ao jejum noturno durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), FEN 6 nmol (n = 8) e FEN 20 nmol (n = 8)..... 55
- Tabela 8:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos submetidos ao jejum noturno durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), CLO 6 nmol (n = 8) e CLO 20 nmol (n = 8).....57



## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1 O controle da ingestão alimentar.....	1
1.2 O núcleo dorsal da rafe, a serotonina e sua participação no controle da ingestão de alimentos.....	6
1.3 Relação entre o comportamento de ingestão alimentar, o sistema noradrenérgico e a serotonina.....	10
1.4 A proteína Fos como marcador de atividade neuronal.....	13
<b>2. Justificativa</b> .....	15
<b>3. Objetivos</b> .....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	19
4.1 Animais.....	19
4.2 Procedimentos cirúrgicos.....	19
4.3 Soluções e doses administradas.....	21
4.4 Grupos Experimentais.....	21
4.5 Injeções das drogas.....	22
4.6 Caixa de registro comportamental.....	22
4.7 Procedimentos experimentais.....	23
4.8 Confirmação histológica do correto local de injeção das drogas (DRN).....	25
4.9 Imunoistoquímica Peroxidase.....	26
4.10 Imunofluorescência.....	27
4.11 Contagem das células.....	28
4.12 Análise estatística.....	29
<b>5. Resultados</b> .....	31

5.1	Efeitos da injeção de AD no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos em ratos saciados.....	32
5.2	Efeitos da injeção de NA no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos em ratos saciados.....	34
5.3	Efeitos da injeção de FEN no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos em ratos saciados.....	36
5.4	Efeitos da injeção de CLO no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos em ratos saciados.....	38
5.5	Efeitos da injeção de CLO 20 nmol no DRN sobre a expressão da proteína Fos em núcleo hipotalâmicos de ratos saciados.....	40
5.6	Efeitos da injeção de AD no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratos submetidos ao jejum noturno.....	46
5.7	Efeitos da injeção de NA no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratos submetidos ao jejum noturno.....	49
5.8	Efeitos da injeção de FEN no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos.....	52
5.9	Efeitos da injeção de CLO no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos.....	55
5.10	Efeitos da injeção de FEN 20 nmol no DRN sobre a expressão da proteína Fos em núcleo hipotalâmicos de ratos submetidos ao jejum noturno.....	58
<b>6.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>Referências.....</b>	<b>75</b>

## **1. Introdução**

### **1.1 O controle da ingestão alimentar.**

O interesse pelo estudo dos mecanismos envolvidos no controle da ingestão alimentar cresceu bastante nos últimos tempos na tentativa de controlar o aumento da grande prevalência da obesidade na população mundial. O aumento da ingestão alimentar envolve uma intersecção de fatores ambientais, fisiológicos e genéticos, que são amplamente integrados por circuitos neurais no cérebro. Devido ao papel privilegiado do sistema nervoso no controle de diversos tipos de comportamentos, a neurobiologia do apetite é fundamental para entender como a aquisição e ingestão de alimentos é regulada (Sternson e Eisel, 2017).

O controle do comportamento alimentar envolve vários níveis de organização, tais como o homeostático e o hedonístico (Antunes-Rodrigues et al., 2002). O controle homeostático do apetite tende a manter as reservas energéticas do corpo constantes por meio de mecanismos de curto e longo prazo. Os mecanismos de curto prazo são mediados pelas informações que tem origem no trato digestório induzidas pelo consumo de alimento. As informações do trato digestório chegam ao sistema nervoso central (SNC) por vias vagais ou através da liberação de hormônios endócrinos de origem intestinal. Durante o processo de ingestão alimentar, o SNC recebe sinais sensoriais pós-ingestivos do trato gastrointestinal (GI), por exemplo. Existem mecanorreceptores que sinalizam a distensão gástrica causada pela presença do alimento, fornecendo uma indicação da quantidade de alimento consumido. Além disso, quimiorreceptores detectam a presença de nutrientes fornecendo informações sobre a composição nutricional dos alimentos consumidos através da liberação de CCK, GLP ou Grelina, por exemplo,

transmitindo a informação via nervo vago para o SNC ou através da corrente sanguínea atravessando a barreira hematoencefálica (Harrold, et al., 2012). Os sinais do trato GI são transmitidos ao cérebro, principalmente via nervo vago, para o núcleo do trato solitário (NTS; Smith, 1996), localizado no tronco encefálico, onde podem ser repassados diretamente para núcleos hipotalâmicos, ou indiretamente para o córtex através de estruturas do tronco cerebral, como o locus coeruleus e os núcleos da rafe (Berthoud, 2002; Schwartz et al., 2000).

Os mecanismos de longo prazo são mediados pelas informações periféricas sobre o armazenamento das calorias ingeridas do organismo que chegam ao SNC, onde atuam estimulando ou inibindo a ingestão alimentar (Harrold, et al., 2012). Essas informações partem do tecido adiposo e a informação chega ao hipotálamo, principalmente, por meio da liberação de um hormônio produzido pelos adipócitos, denominado leptina. Além disso, a concentração de insulina no sangue também é um importante sinal que informam o SNC sobre o estado nutricional do organismo (Schwartz et al., 2000). O controle hedônico do apetite é mediado através dos sistemas de recompensa. Tais sistemas são ativados, por exemplo, por alimentos altamente palatáveis, mantendo o estímulo para comer baseado no prazer sensorial e na recompensa, em vez da necessidade biológica. É neste nível de controle que avaliamos as características de um alimento, como sua palatabilidade, seus aspectos nutricionais e o quão prazeroso é este alimento (Saper et al., 2002; Harrold, et al., 2012).

A sinalização periférica gerada como consequência da ingestão alimentar, pode ser classificada em sinais episódicos e tônicos, de acordo com a duração do seu efeito sobre a ingestão alimentar (Halford e Blundell, 2000). Acerca dos sinais episódicos, estes são sinais de curto prazo gerados pelo consumo recente de alimento, como a colecistocinina (CCK), um

hormônio liberado por células intestinais em resposta a presença de ácidos graxos livres e proteínas no duodeno. A atuação da CCK no comportamento alimentar já é bem descrita na literatura, atuando como um hormônio que medeia a interrupção da refeição e, possivelmente, as fases iniciais do processo de saciedade (Moran e Dailey, 2011; Moran e Schwartz, 1994). A principal via de comunicação da CCK com o cérebro é através de aferências neuronais via nervo vago até o tronco encefálico, com os sinais sendo retransmitidos para o hipotálamo (Beglinger et al., 2001). No entanto, a redução da ingestão alimentar através de infusão de CCK intravenosa é apenas parcialmente atenuada pela vagotomia, sugerindo que a CCK podem não depender totalmente dessa via para exercer seus efeitos anoréxicos (Zhang e Ritter, 2011). Além disso, receptores do tipo CCK-1 podem ser encontrados em núcleos hipotalâmicos, sugerindo que a CCK também possa atuar diretamente nesta região (Blevins et al., 2000).

Além da CCK, existem outros hormônios e peptídeos liberados em resposta a presença de alimento no trato GI, como o GLP-1, O PYY e a Grelina. O GLP-1 é um hormônio secretado por células duodenais do tipo L em resposta a presença de carboidratos (Lavin et al., 1998). O papel principal do GLP-1 na regulação do apetite é estimular a liberação de insulina, retardar o esvaziamento gástrico (Näslund et al., 1999), além de inibir a ingestão de alimentos (Flint et al., 1998). Assim como o GLP-1, o peptídeo YY (PYY) também é liberado por células L duodenais, porém em resposta a presença de ácidos graxos livres e ácidos biliares no intestino (Onaga et al., 2002).

A liberação do PYY parece estar limitada ao final da refeição, provocando uma diminuição no esvaziamento gástrico e conseqüentemente uma redução na ingestão de alimentos (Batterham et al., 2002). A Grelina é um hormônio com ação diferenciada dos demais, pois estimula a ingestão alimentar ao invés de inibir. É encontrada no cérebro e em toda a periferia, principalmente

no estômago. A grelina responde ao estado nutricional, com concentrações que atingem picos máximos imediatamente antes do início da refeição, e queda após a ingestão, dependente do valor energético dos alimentos consumidos (Cummings et al., 2001; Callahan et al., 2004). Além disso, a administração periférica e central da grelina estimula a ingestão alimentar em ratos e camundongos (Wren et al., 2000). A ação da grelina pode ser mediada através do nervo vago ou diretamente sobre o SNC, estimulando principalmente neurônios que expressam o neuropeptídeo Y (NPY) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC; Nakazato et al., 2001; Shintani et al., 2001).

O hipotálamo foi a primeira estrutura cerebral reconhecida por exercer o controle da ingestão de alimentos através da descoberta de que lesões no eixo hipotálamo-hipófise resultavam em obesidade em animais (Brobeck, 1946). Além disso, a estimulação elétrica do hipotálamo induz comportamentos motivacionais como sede e fome em ratos (Valenstein et al., 1968). Estudos posteriores de lesão e estimulação elétrica identificaram vários núcleos hipotalâmicos que são importantes na regulação do comportamento alimentar, como o núcleo paraventricular (PVN), núcleo arqueado (ARC), área hipotalâmica lateral (LHA), hipotálamo ventromedial (VMH) (Adan et al., 2008; Berthoud, 2002).

O ARC é um dos principais locais de entrada de sinais oriundos da periferia que indicam o estado nutricional do organismo. Recebe informações de longo prazo sobre o estado energético do tecido adiposo via leptina, de forma intermediária através da insulina, grelina e aferências vagais do GI e de forma imediata através da glicose (Berthould, 2002). O ARC possui neurônios orexigênicos e anorexigênicos. A população neuronal orexígena NPY e o peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), enquanto que a anorexígena expressa o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), o hormônio estimulador de  $\alpha$ -melanócitos ( $\alpha$ -MSH) e a pró-opiomelanocortina

(POMC; Elias et al., 1998). O ARC também tem extensas conexões recíprocas com outros núcleos hipotalâmicos reguladores do apetite, incluindo o PVN, VHM e LHA (Collin et al., 2002; Currie et al., 2002; De Vry e Schreiber, 2000; Leibowitz e Alexander, 1998).

O PVN funciona como um centro integrador de diversos sinais de vias neuronais importantes na regulação da ingestão alimentar. Estas vias incluem os neurônios do ARC NPY/AgRP e POMC/CART e os neurônios orexinérgicos da AHL (neurônios que expressam o hormônio concentrador de melanina (MCH) e a orexina; Elmquist et al., 1998). Lesões no PVN de ratos resultam em hiperfagia e obesidade (Leibowitz et al., 1981). Injeções de noradrenalina (NA) (Leibowitz, 1978) e adrenalina (AD) (Leibowitz, et al., 1988) no PVN mostraram que essas catecolaminas estimulam o consumo de alimentos. Por outro lado, o PVN é particularmente sensível ao efeito inibitório induzido por agonistas de receptores 5-HT sobre a ingestão de alimentos (Hutson et al., 1988). O PVN também se comunica com áreas do tronco encefálico que desempenham papel no controle alimentar. Neurônios do PVN projetam-se para o NTS (Blevins et al., 2003) e para os núcleos da rafe, como o Núcleo Dorsal da Rafe (DRN) por exemplo (Vertes e Linley, 2008).

O VMH é uma das principais estruturas cerebrais envolvidas no controle do apetite e da saciedade (Schwartz et al., 2000). Lesões eletrolíticas no VMH resultam em aumento na ingestão alimentar e obesidade (Hetherington e Ranson, 1940; Hoebel e Teitelbaum, 1966), sendo assim considerado um importante centro de saciedade (Schwartz et al., 2000). Além disso, o VMH possui receptores  $\alpha$  adrenérgicos (Leibowitz, 1970) e injeções de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos no VMH mostraram-se capazes de aumentar a ingestão alimentar em ratos (Leibowitz, 1978).

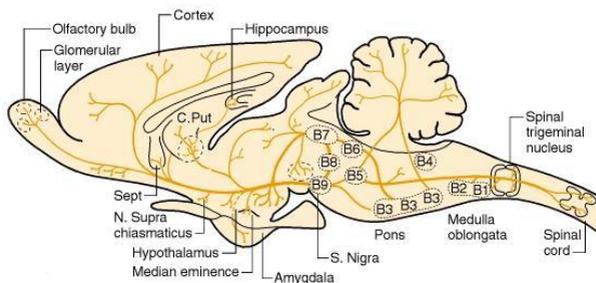
A LHA, desde os estudos iniciais de lesão de Anand e Brobeck (1951), vem sendo implicada na regulação do comportamento ingestivo. A estimulação elétrica da LHA aumenta a ingestão de alimentos em ratos, efeito este encontrado até mesmo em animais saciados (Herberg e Blundell, 1967). A LHA possui neurônios que expressam o hormônio concentrador de melanina (MCH) e a orexina (Bittencourt et al., 1992; De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998), dois peptídeos importantes para o desempenho de suas funções sobre a regulação da ingestão alimentar. Injeções intracerebroventriculares de MCH aumentam a ingestão de alimentos em ratos (Qu et al., 1996), enquanto que camundongos nocaute para a expressão de MCH são hipofágicos e tem baixo peso corporal (Shimada et al., 1998). Já camundongos que expressam MCH de modo excessivo são obesos e hiperleptinêmicos (Ludwig et al., 2001). Injeções ICV de orexina também aumentam a ingestão de alimentos em ratos e a restrição alimentar aumenta a expressão de RNAm de orexina (Clegg et al., 2002; Sakurai et al., 1998). Além disso, propõe-se que a LHA seja um local de integração para informações relacionadas à recompensa e homeostase energética através de conexões neuronais com núcleos importantes relacionados à aprendizagem motivacional, como a amígdala basolateral (Petrovich et al., 2002). Estudos de lesões neste núcleo já demonstraram sua influência sobre os comportamentos ingestivos, produzindo aumento da ingestão de alimentos e ganho de peso corporal em ratos (Fonberg, 1971; Ganaraj e Jeganathan, 1998; Korszynski e Fonberg, 1979).

## **1.2 O núcleo dorsal da rafe, a serotonina e sua participação no controle da ingestão de alimentos.**

Os núcleos da rafe são considerados como a principal fonte de 5-HT (serotonina) encefálica e constituem uma população neuronal heterogênea

localizada na linha média do tronco encefálico, exibindo diversidade morfológica e característica funcional (Azmitia e Segal, 1978; Jacobs e Azmitia, 1992; Takase e Nogueira, 2008). Os núcleos da rafe foram identificados e organizados em nove grupos de células serotonérgicas por Dahlstrom e Fuxe (B1 a B9) (Vertes e Linley, 2007). Ao longo do bulbo localizam-se os núcleos da rafe caudais, denominados pálido (B1), obscuro (B2) e magno (B3) tendo suas projeções para o tronco encefálico inferior. Na ponte e mesencéfalo estão os núcleos da rafe rostrais, denominados pontino (B5), dorsal (B7) e mediano (B8) ascendendo o tronco encefálico superior e prosencéfalo basal pelo feixe prosencefálico medial (Jacobs e Azmitia, 1992; Vertes e Linley, 2007). O núcleo dorsal da rafe (DRN) e o núcleo mediano da rafe (MNR) dão origem a quase totalidade das projeções serotonérgicas para o prosencéfalo (Lucki, 1998; Adell et al., 2002).

Os axônios originários do DRN representam distintos sistemas de projeção serotonérgica e cada via predomina em uma determinada estrutura terminal (Mokler et al., 2009). Os neurônios serotonérgicos presentes do DRN enviam projeções para o estriado dorsal e ventral, o hipocampo ventral, amígdala, núcleo accumbens, substância nigra, córtex cerebral, septo lateral e diversas estruturas hipotalâmicas (Moore et al., 1978; Azmitia e Segal, 1978; Vertes e Linley, 2007; Lechin et al., 2006). O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) é extensamente inervado pelo DRN, sendo também um dos principais locais onde a 5-HT atua modulando a ingestão de alimento em mamíferos (Berthoud, 2002; Vertes e Linley, 2007). Além disso, o DRN recebe aferências neuronais diretas provenientes do PVN e VMH (Vertes e Linley, 2008). Os núcleos da rafe e suas projeções estão representados na figura 1.



**Figura 1:** Desenho esquemático representando a localização dos núcleos da rafe de uma seção sagital do encéfalo de rato e as suas projeções. Abreviaturas: C. Put = caudado putamen (Adaptado de Frazer e Hensler, 1999).

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

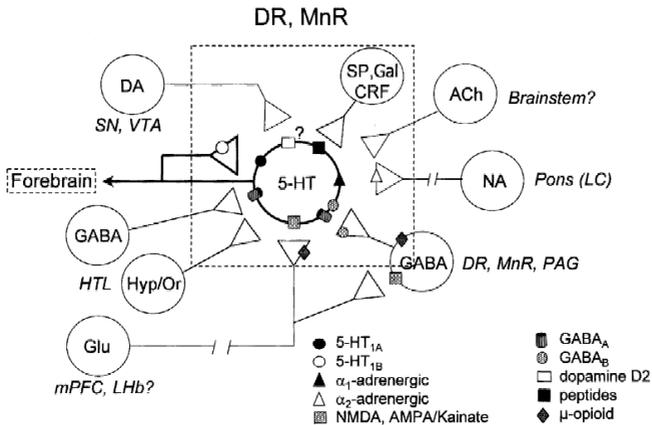
A 5-HT é um neurotransmissor que compõe o grupo das aminas biogênicas, incluindo ainda as catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina; Kandel et al., 2000). A 5-HT influencia uma variedade de sistemas fisiológicos, tais como o sistema cardiovascular, respiração e termoregulação, e uma variedade de funções comportamentais como ritmo circadiano, ciclo sono-vigília, apetite, agressividade, comportamento sexual, sensibilidade à dor e aprendizado (Lucki, 1998). Diversas pesquisas

demonstraram que a manipulação farmacológica de 5-HT, especialmente em centros do controle do apetite no hipotálamo, pode culminar em alterações sobre a ingestão de alimentos (Blundell e Latham, 1979). O efeito da 5-HT na regulação alimentar é associado à saciedade e sua supressão provoca aumento da alimentação (Blundell, 1991). A administração de 5-HT ou de seus precursores (triptofano ou 5-hidroxitriptofano) em ratos, diminui significativamente a quantidade, a frequência e a duração da ingestão de alimentos (Blundell e Latham, 1979; Halford et al., 2007; Montgomery et al., 1985). Inibidores seletivos da recaptção de 5-HT, como a fluoxetina, sertralina e sibutramina têm demonstrado serem potenciais redutores da ingestão de alimento e indutores da perda de peso em mamíferos (Halford et al., 2007). Já o uso de drogas que bloqueiam síntese neuronal de 5-HT, induz aumento na ingestão alimentar (Mackenzie et al., 1979).

O DRN é uma das áreas do cérebro com a mais alta densidade de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Adell et al., 2002; Chalmers e Watson, 1991; Kia et al., 1996). Estes receptores atuam como autorreceptores somatodendríticos em neurônios serotoninérgicos, sendo este mecanismo chamado de autorregulação de células serotoninérgicas. Agonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, como a 8-hidroxi-2 (di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT) quando injetados no DRN, estimulam a ingestão de alimento (Bendotti e Samanin, 1986; Currie e Coscina, 1993; Fletcher e Coscina, 1993) por intermédio da inibição da atividade neuronal serotoninérgica e redução na liberação de 5-HT em regiões prosencefálicas terminais.

### 1.3 Relações entre o comportamento de ingestão alimentar, o sistema noradrenérgico e a serotonina.

Além da 5-HT, noradrenalina (NA), glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina, glicina, óxido nítrico e também neuropeptídeos, podem influenciar a ação dos neurônios 5-HT do DRN e MNR, alterando a frequência de disparos e, conseqüentemente, os comportamentos ingestivos (Adell et al., 2002; Wirtshafter, 2001), mecanismo este denominado de heterorregulação (Figura 2).



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

Sistemas adrenérgicos são circuitos neurais que utilizam NA ou adrenalina (AD) como neurotransmissores e têm funções importantes na ingestão de alimentos, cognição, reprodução, emoção, entre outros. (Marino-

Neto et al., 2004). O locus coeruleus (LC) é a principal fonte de noradrenalina (NA) no sistema nervoso central (Kandel et al., 2000) e o DRN recebe projeções aferentes noradrenérgicas deste núcleo (Adell et al., 2002). Estudos apontaram a presença de níveis relativamente elevados de RNAm para a expressão de receptores  $\alpha$ -1 (Day et al., 2004) e receptores  $\alpha$ -2 (Rosin et al., 1993; Talley et al., 1996; Unnerstall et al., 1985) no DRN e no MRN. Os receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos parecem estar situados no corpo celular de células 5-HT (Gallagher e Aghajanian, 1976), enquanto que os receptores  $\alpha$ -2 estão localizados nas terminações nervosas noradrenérgicas (Haddjeri et al., 1996; Yoshioka et al., 1992).

As aferências noradrenérgicas exercem um controle facilitatório na liberação de 5-HT, agindo através de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos (Adell et al., 2002). Estudos eletrofisiológicos demonstram que a ativação de receptores  $\alpha$ -1 aumenta a taxa de disparo de neurônios serotonérgicos no NDR (Baraban e Aghajanian, 1980; Marwaha e Aghajanian, 1982; Vandermaelen e Aghajanian, 1983). Além disso, antagonistas  $\alpha$ -1 diminuem a liberação de 5-HT nas áreas de projeção (Bortolozzi and Artigas, 2003; Hjorth et al., 1995; Rouquier et al., 1994). Contrariamente aos receptores  $\alpha$ -1, os receptores  $\alpha$ -2 exercem um papel inibitório sobre a liberação de 5-HT (Adell et al., 2002). A ativação de receptores  $\alpha$ -2 diminui a taxa de disparos em neurônios 5-HT do DRN (Haddjeri et al., 1996; Svensson et al., 1975). A injeção de clonidina, um agonista de receptor  $\alpha$ -2 adrenérgico, diminui a liberação de 5-HT em torno de 60% no DRN dos valores basais, enquanto que um antagonista  $\alpha$ -2 aumenta a liberação (Adell et al., 2002). Estes resultados sugerem que a ativação dos receptores  $\alpha$ -2 inibe a liberação de NA em terminais pré-sinápticos noradrenérgicos, eliminando assim o tônus estimulante dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos sobre os neurônios serotonérgicos, o que resulta em diminuição da liberação de 5-HT (Bortolozzi

e Artigas, 2003). Assim como ocorre no NDR, os neurônios serotoninérgicos do MRN também parecem sofrer influência regulatória através do sistema noradrenérgico. Estudos de microdiálise demonstraram que a administração de um agonista  $\alpha$ -1adrenérgico pode aumentar a liberação de 5-HT no NMR, enquanto que um antagonista  $\alpha$ -1 adrenérgico suprime essa liberação (Adell e Artigas, 1999).

Ao longo dos últimos anos, nosso laboratório têm realizado diversos trabalhos com foco no MRN e sua possível participação no controle da ingestão alimentar. A injeção de adrenalina (AD) no MRN diminui o consumo alimentar em ratos submetidos ao jejum noturno (Maidel et al., 2007), mas aumenta a ingestão de alimentos em ratos saciados (dos Santos et al., 2009). Estes efeitos duais da AD sobre a ingestão de alimento foram atribuídos à ativação diferencial de receptores adrenérgicos pré- ( $\alpha$ -2) e pós-sinápticos ( $\alpha$ -1) no MRN dependente do estado alimentar do animal. Ao injetar a AD em animais saciados, sua ação ocorre através de receptores  $\alpha$ -2, que atuam como auto receptores que controlam a liberação de NA endógena (Adell e Artigas, 1999), diminuindo a atividade neuronal e a liberação de NA. Com isso, ocorre uma diminuição da atividade neuronal, possivelmente serotoninérgica, e uma diminuição da liberação de 5-HT nas áreas de projeção, suprimindo assim a ação inibitória da 5-HT sobre o comportamento ingestivo. Em contrapartida, sugere-se que em animais submetidos ao jejum a atividade neuronal serotoninérgica endógena seja reduzida, predominando o efeito das catecolaminas mediado através dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos. O resultado é a redução da ingestão de alimento por meio da ativação destes receptores e o conseqüente aumento na liberação de 5-HT em áreas hipotalâmicas provocando hipofagia.

Experimentos com agonistas adrenérgicos específicos  $\alpha$ -1 (fenilefrina) e  $\alpha$ -2 (clonidina) reforçam a hipótese. A injeção de clonidina, que reduz a

liberação da catecolamina na sinapse por meio da ativação do receptor  $\alpha$ -2, no MRN de ratos saciados causou uma resposta hiperfágica que pode ser comparada à resposta induzida pela AD (Mansur et al., 2010). Enquanto a injeção de fenilefrina não afetou o comportamento ingestivo (Mansur et al., 2011a), a injeção de prazosin, um antagonista  $\alpha$ -1, aumentou a ingestão de alimentos em ratos saciados (Mansur et al., 2011b). A hipótese é que, em animais saciados, a atividade adrenérgica endógena mediada por receptores  $\alpha$ -1 no MRN seja elevada e o consequente tônus inibitório da 5-HT sobre a ingestão de alimento também elevado devido a uma maior liberação do neurotransmissor nas áreas de projeção. Desse modo, a fenilefrina não consegue se ligar aos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos do MRN por estes já estarem previamente ocupados pela NA endógena. No entanto, a injeção de fenilefrina no MRN diminui a ingestão de alimentos em ratos submetidos ao jejum (Ribas et al., 2012), possivelmente através da ativação dos receptores  $\alpha$ -1 e consequente aumento na liberação de 5-HT nas áreas de projeção. Já a injeção de clonidina não modifica o consumo (Ribas et al., 2012), sugerindo que em animais privados de alimento a atividade adrenérgica endógena mediada por receptores  $\alpha$ -1 esteja diminuída assim como o tônus inibitório serotoninérgico sobre a ingestão alimentar (Levone et al., 2015).

#### **1.4 A Proteína Fos como marcador de atividade neuronal**

Uma maneira de estudar as alterações no padrão de atividade de diferentes tipos neuronais é através dos genes de resposta imediata (GRI). Eles foram descritos como uma classe de genes expressos de forma rápida e transitória em diferentes áreas do sistema nervoso após estimulação específica (Morgan e Curran, 1991; Sng et al., 2004). A proteína Fos, produto do GRI c-fos, tem por funções alterar rapidamente a transcrição de genes, positivamente ou negativamente, em resposta a sinais da superfície celular (Hoffmam et al., 1993). Em condições normais ou basais, a expressão de Fos

é reduzida ou ausente, porém é rapidamente induzida nos núcleos neuronais em resposta a estímulos eficazes, atingindo o pico máximo de seus níveis dentro de 90 a 120 minutos (Herdegen and Leah, 1998; Hoffman and Lyo, 2002). Além disso, sua expressão pode ser combinada com outras técnicas de imunistoquímica para demonstrar a co-localização com um antígeno citoplasmático, podendo ser um neurotransmissor (ex. serotonina) ou uma enzima (ex. triptofano-hidroxilase) (Takase e Nogueira, 2008). A proteína Fos tem sido aplicada com sucesso na verificação das alterações neuronais relacionadas aos diferentes aspectos do comportamento alimentar em roedores (Franchini et al., 2002; Olson, 1993; Takase e Nogueira, 2008), sendo uma importante ferramenta metodológica utilizada no presente estudo.

## 2. Justificativa

Apesar de diversos estudos mostrarem a influência dos receptores adrenérgicos sobre o funcionamento dos neurônios 5-HT do DRN (Bortolozzi e Artigas, 2003; Haddjeri et al., 1996 Svensson et al., 1975) existem poucas evidências mostrando como o sistema adrenérgico desse núcleo influencia a ingestão de alimentos. No entanto, em um estudo recente demonstramos que o DRN está sob influência de sinais pós-prandiais gerados durante a alimentação. A injeção intracerebroventricular de AD em ratos saciados resultou em aumento na expressão de Fos e sua co-localização com neurônios 5-HT no DRN de ratos que tiveram acesso ao alimento durante o registro comportamental, fato que não ocorreu em animais que não tiveram acesso à dieta durante o experimento (Flores et al., 2018). Comparações entre animais com livre acesso ao alimento e com animais em jejum ou submetidos a uma restrição alimentar, mostraram que o número de neurônios imunorreativos para Fos aumentou no DRN após a ingestão alimentar (Takase e Nogueira, 2008; Wu et al., 2014). Estes resultados sugerem que os neurônios serotoninérgicos do DRN podem ser ativados por sinais pós-prandiais em resposta à alimentação. Dessa forma, formulamos a hipótese que, assim como ocorre no MRN, a ativação diferencial de receptores  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2 adrenérgicos no DRN repercutirá em respostas ingestivas dependentes do estado alimentar do animal. Além disso, acreditamos que as respostas ingestivas após a ativação  $\alpha$  adrenérgica no DRN poderão envolver a participação de núcleos hipotalâmicos importantes para a regulação da ingestão alimentar, como o PVN e o ARC. A partir destas informações, torna-se de grande relevância estudar a neurotransmissão adrenérgica no DRN e seus efeitos sobre os comportamentos ingestivos.



### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar os efeitos da injeção de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos no DRN sobre os comportamentos relacionados à ingestão de alimentos e sobre a atividade neuronal de núcleos hipotalâmicos envolvidos com controle do apetite e da saciedade em ratos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos da injeção de Adrenalina (AD) e Noradrenalina (NA) no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos em ratos saciados e submetidos ao jejum noturno.
- Avaliar os efeitos da injeção de agonista de receptor  $\alpha$ -1 adrenérgico Fenilefrina (FEN) e agonista de receptor  $\alpha$ -2 adrenérgico Clonidina (CLO) no DRN em ratos saciados e submetidos ao jejum noturno.
- Avaliar a expressão da proteína Fos no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN), Núcleo Ventromedial do Hipotálamo (VMH), Núcleo Arqueado (ARC), Área Hipotalâmica Lateral (LHA ) e Amígdala basolateral (BLA) após injeção de agonista adrenérgico em ratos saciados e submetidos ao jejum noturno.



## **4. Materiais e métodos**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com peso corporal entre 280 e 300g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm), forradas com maravalha, dispondo de água e alimento granulado (CR-1, Nuvilab) *ad libitum*. Ficaram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, com temperatura controlada em  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo o início do período de luz às 07:00h e término às 19:00h. Todos os procedimentos experimentais desse estudo foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (protocolo CEUA: PP0075).

### **4.2 Procedimentos cirúrgicos**

Os animais foram submetidos ao processo de cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas guias e posterior microinjeção da droga no DRN. Para implantação da cânula guia, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina/cloridrato de cetamina (13 mg/Kg de xilazina; 87 mg/Kg de cloridrato de cetamina) injetada por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram adaptados ao aparelho estereotáxico (Marca Insight, Ribeirão Preto, Brasil) tendo a cabeça fixada por intermédio de barras posicionadas nos condutos auditivos e incisivos superiores. Foi realizada tricotomia da área desejada, assepsia e incisão longitudinal para exposição da calota craniana. Após esse procedimento foi feita a raspagem do periósteo para melhor visualização das estruturas de referência. A seguir, uma cânula guia

feita a partir de segmento de agulha hipodérmica 11 (23G BD®), com 0,6 mm de diâmetro externo e 16 mm de comprimento, foi posicionada 2 mm acima do DRN para não lesionar o núcleo. As coordenadas para o DRN foram: antero-posterior ao bregma: -7,9 mm; deslocamento lateral: +2,2 mm; dorsoventral -4,8 mm (Paxinos e Watson, 2007). Para evitar o rompimento do seio sagital superior e obstrução do aqueduto cerebral durante a cirurgia estereotáxica, a haste foi inclinada 20°.

A cânula foi fixada à calota craniana por meio de um parafuso de aço inoxidável e envolvido por acrílico autopolimerizável. Um mandril de aço inoxidável foi introduzido no interior da cânula para evitar seu entupimento. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, os animais retornaram ao biotério onde foram mantidos individualmente, com água e ração *ad libitum*, sendo manipulados para verificação das cânulas guias e para limpeza das caixas de hospedagem a cada dois dias. Após o período de uma semana para recuperação da cirurgia, os procedimentos experimentais foram iniciados.



**Figura 3:** Aparelho estereotáxico.

### 4.3 Soluções e doses administradas

As seguintes drogas e doses foram utilizadas:

- Adrenalina (AD, Sigma-Aldrich) nas doses de 6, 20 e 60 nmol;
- Noradrenalina (NA, Sigma-Aldrich) nas doses de 6, 20 e 60 nmol;
- Agonista adrenérgico  $\alpha$ -1 Fenilefrina (FEN, Tocris) nas doses de 6 e 20 nmol;
- Agonista adrenérgico  $\alpha$ -2 Clonidina (CLO, Tocris) nas doses de 6 e 20 nmol;
- Veículo (SAL): solução de NaCl 0,9% estéril, pH 7.4.

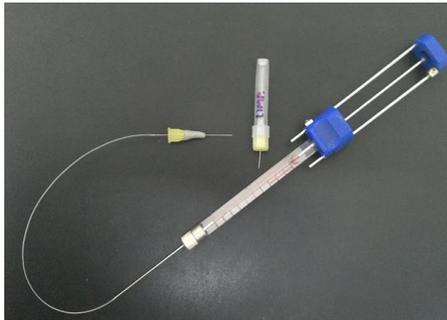
### 4.4 Grupos experimentais

Durante uma semana após o procedimento cirúrgico, os ratos permaneceram no biotério setorial com livre acesso a alimento e água. Após esse período os ratos foram mantidos em caixas individuais e separados em dois grupos experimentais:

- Ratos saciados: Neste grupo, os animais receberam ração e água *ad libitum* até o momento do experimento;
- Jejum Noturno: Neste grupo, no dia que antecedeu o experimento, 30 minutos antes do desligamento das luzes do biotério o alimento de cada animal foi totalmente retirado de sua caixa hospedagem. Os ratos deste grupo permaneceram aproximadamente 12-13 h sem acesso ao alimento, mas com livre acesso a água em todos os momentos.

#### 4.5 Injeções das drogas

A administração do veículo ou das drogas foi realizada através de agulha injetora confeccionada a partir de uma agulha gengival odontológica, 30G (Injex, Industrias Cirúrgicas LTDA; Brasil). A agulha injetora mede 18 mm de comprimento, conectada por um tubo de polietileno (PE 10) a uma microsseringa SGE® de 1µL. O comprimento da agulha injetora excedeu o comprimento da cânula guia em 2 mm. As soluções foram administradas ao longo de 1 minuto, seguido de mais 1 minuto de espera para melhor difusão da solução. O volume injetado foi sempre o mesmo (0,2µL) nos animais despertos.

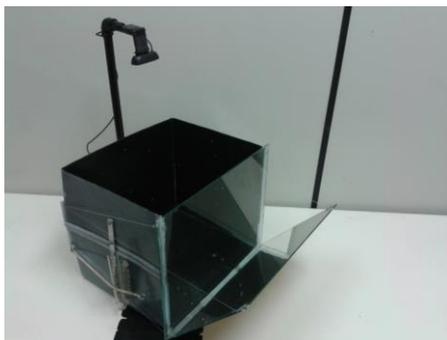


**Figura 4:** Sistema de injeção das drogas.

#### 4.6 Caixa de registro comportamental

A caixa de registro comportamental é confeccionada em 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 fugas. O chão da caixa e as três paredes laterais são cobertas com adesivo plástico preto. Uma parede lateral da caixa é mantida com vidro transparente onde está colocado um espelho em

uma angulação que não permite ao animal visualizar sua imagem refletida durante o experimento, mas que possibilita ao experimentador a visualização lateral dos seus comportamentos e o registro digitalizado dos mesmos. O registro do comportamento animal durante o experimento foi realizado através de uma webcam posicionada sobre a caixa experimental.



**Figura 5:** Caixa experimental.

#### **4.7 Procedimentos experimentais**

No dia do experimento o animal foi retirado da sua caixa de hospedagem e tratado com uma injeção de veículo (solução NaCl 0,9%) ou droga. Imediatamente após a microinjeção, o animal foi colocado na caixa de registro experimental onde estava depositada ração granulada em uma placa de petri e água em um bebedouro. Em seguida, o registro digital da sessão (60 minutos) foi iniciado. Ao término da sessão, a ração restante na caixa experimental foi recolhida e pesada, sendo o consumo de alimento avaliado pela diferença entre a quantidade de ração inicial e final. O animal foi ambientado no período de dois dias antecedentes a data de experimento. A ambientação consiste na simulação de todos os eventos que serão feitos no dia de experimento. Posteriormente os vídeos foram analisados em um

microcomputador e as categorias comportamentais registradas através do programa Etholog 2.2 (Ottoni, 2000). As categorias comportamentais que foram analisadas foram as previamente descritas por Halford et al., 1998.

As categorias são:

- Ingestão de alimento: Quando o animal se aproxima do comedouro e ingere alimento;
- Ingestão de água: Quando o animal se aproxima do bico do bebedouro e lambe a sua ponta;
- Exploração vertical: Exploração do ambiente apoiado somente nas patas traseiras (ereto);
- Autolimpeza: Comportamentos típicos de autolimpeza como: limpar a cabeça com as patas, limpar as unhas, coçar o corpo ou genitais, morder a cauda;
- Locomoção: Qualquer deslocamento pela caixa, sem apresentar outro comportamento citado;
- Imobilidade: O animal permanece imóvel, sem apresentar outros comportamentos.



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

As variáveis analisadas para os comportamentos de ingestão alimentar foram a quantidade de alimento, a latência para iniciar o comportamento (em segundos), a frequência (número de episódios que o animal exibe tal comportamento ao longo dos 60 minutos de experimento) e a duração total da execução do comportamento (em segundos) no decorrer dos 60 minutos de gravação. Para a ingestão hídrica foi analisado somente a quantidade de água ingerida. Para os comportamentos não ingestivos foi analisado apenas a duração do comportamento.

#### **4.8 Confirmação histológica do local de injeção das drogas (DRN)**

Ao final do experimento os animais foram anestesiados com uretana e foi realizada a perfusão transcardíaca com solução salina 0,9%, seguida por solução de formalina 10%. Depois de dissecados, os cérebros foram retirados do crânio do animal e mantidos em formol 10% por 48 horas. Os cortes foram realizados em um criostato da marca Leica, modelo CM 1850 UV, à temperatura de -25°C. Para isso, um dia antes do corte, os encéfalos foram mergulhados em solução crioprotetora (tampão fosfato e sacarose 10, 20 e 30%, progressivamente), sendo posteriormente cortados em fatias de 50 µm no plano coronal. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e permaneceram secando por 24 horas. Em seguida foram coradas pelo método de Nissl e permaneceram secando por igual período de tempo antes de serem analisadas ao Microscópio Óptico (MO). A reprodução gráfica dos cortes e dos pontos de injeção analisados ao MO foi realizada a partir do Atlas do cérebro do rato Paxinos e Watson (2007). Somente dados de animais com as cânulas corretamente posicionadas foram incluídos no estudo.

#### 4.9 Imunoistoquímica Peroxidase

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

Todos os passos de lavagens e incubações a seguir foram feitos sob agitação suave. Para a imunoistoquímica para proteína Fos, os cortes foram lavados em uma solução de 0,02M de tampão salina fostato potássio (KPBS, pH 7,4) durante 30 minutos, em seis trocas para completa remoção da solução anti-congelante. Em seguida, os cortes foram incluídos em uma solução de Triton X-100 (0,3%; Sigma Chemical, St. 19 Louis, MO) em KPBS 0,02M (KPBS-T), contendo nesta solução 0,3% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os cortes foram incubados nesta solução durante 30 minutos para inibir a atividade da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados novamente em KPBS 0,02M até que todas as bolhas da reação anterior sumissem e ficaram incubados durante 60 minutos em KPBS-T contendo 3% de soro normal de burro, para bloquear ligações inespecíficas. Imediatamente após, os cortes foram incubados overnight em anticorpo primário anti-Fos (1:20000; Calbiochem, EMD Chemicals Inc., San Diego,

USA) feito em coelho contendo KPBS-T com azida e soro normal de burro a 3%. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados durante 30 minutos em seis trocas com solução de KPBS 0,02M. Incubou-se os cortes durante 60 minutos com uma solução contendo anticorpo secundário biotilado anti-coelho, feito em burro (1:1000; Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) em KPBS-T, seguido de novas lavagens durante 30 minutos em 3 trocas com KPBS 0,02M. Então, os cortes foram incubados durante 60 minutos com o complexo ABC (complexo avidina-biotina) (1:500; Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) em KPBS 0,02M, que foi preparado com no mínimo 60 minutos de antecedência. Lavou-se as secções durante 20 minutos em duas trocas com KPBS 0,02M. Em seguida, os cortes foram submetidos a uma rápida reação (2 a 3 minutos) com DAB (tetrahydro cloridrato diaminobenzidina; Sigma) contendo tampão acetado 0,1M, solução de sulfato de níquel (5%) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3%). O sulfato de níquel e o DAB funcionam como um cromógeno, corando de marrom escuro o núcleo da célula Fos +. Para terminar a reação, lavou-se as secções em tampão acetato 0,1M durante 10 minutos e em KBPS 0,02M durante 30 minutos em 3 trocas.

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

#### **4.10 Imunofluorescência**

Todos os passos de lavagens e incubações a seguir foram feitos sob agitação suave e protegidos de iluminação. Com o intuito de identificar a assinatura química dos neurônios que expressaram Fos em núcleos hipotalâmicos, realizou-se imunofluorescência para o hormônio estimulador

de  $\alpha$ -melanócito ( $\alpha$ -MSH) e proteína Fos ( $\alpha$ -MSH+/ Fos +). Os cortes foram lavados KPBS 0,02M durante 30 minutos, em 6 trocas para completa remoção da solução anti-congelante. As secções foram incubadas durante 60 minutos em KPBS-T contendo 3% de soro normal de burro (Jackson Immunoresearch), para bloquear ligações não específicas. Imediatamente após, os cortes foram incubados durante 48 horas em um coquetel de 2 anticorpos primários: 1) anti-Fos feito em coelho (1:10000; Calbiochem, EMD Chemicals Inc., San Diego, USA) 2) anti  $\alpha$ -MSH feito em ovelha (1:2000; Chemicon, Cat. AB5087) contendo KPBS-T + azida e soro normal de burro a 3%, em geladeira 4°C. Após a incubação com os anticorpos primários, foram feitas 3 lavagens de 10 minutos cada em KPBS 0,02M. Incubou-se os cortes durante 60 minutos com um coquetel de 2 anticorpos secundários fluorescentes, Alexa Fluor 488 (verde; 1:500; anti-coelho) e Alexa Fluor 594 (vermelho; 1:500; anti-ovelha). Após a incubação, os cortes foram lavados em 3 lavagens de 10 minutos cada em KPBS 0,02M. Após os procedimentos de imunofluorescência, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, secas por 24 horas protegidas de iluminação e cobertas por lamínula com DPX (Sigma Chemical, St. Louis, MO).

#### **4.11 Contagem das células**

As reações de imunoperoxidase e imunofluorescência foram analisadas em um microscópio Zeiss Axioimager A1 (Zeiss, Muenchen, Germany) para identificação de células Fos + para peroxidase utilizando campo claro e  $\alpha$ -MSH+ e  $\alpha$ -MSH+/ Fos + para imunofluorescência. Fotomicrografias digitais foram feitas das secções representativas utilizando uma câmera Zeiss AxioCam HRc (Zeiss). As imagens de duplas marcações imunofluorescentes foram adquiridas com o auxílio do software Axiovision (Zeiss), que permite a aquisição de imagens a partir de canais fluorescentes

diferentes, assim como a sobreposição das imagens. Três cortes representativos do núcleo analisado de cada animal foram selecionados para as contagens e a marcação celular foi quantificada com o auxílio do software Image J 1.46r, considerando toda a área do núcleo no corte. Foram quantificados o número de células Fos + nos núcleos hipotalâmicos PVN, VHM, ARC, LHA e o número de células  $\alpha$ -MSH+/ Fos + apenas no ARC em secções aos níveis: Bregma -1,32 mm a Bregma -1,92 mm para PVN e LHA; Bregma -2,04 a Bregma -3,00 mm para VMH; Bregma -1,92 a -3,60 para ARC. Os núcleos quantificados foram identificados, nomeados e tiveram seus limites estabelecidos de acordo com o atlas de encéfalo de rato Paxinos e Watson (2007). O processamento das imagens foi feito utilizando o software Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA, versão 2015) ajustando apenas o balanço de cores, contraste e brilho das imagens.

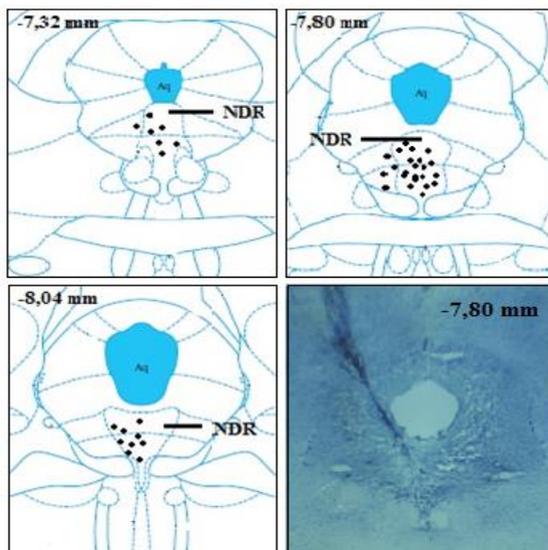
#### **4.12 Análise estatística**

Os dados obtidos referentes aos comportamentos ingestivos e não ingestivos foram analisados por intermédio de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de post hoc de Tukey. Correlações entre a quantidade de alimento ingerido e a quantidade água ingerida foram realizadas através do coeficiente de correlação paramétrico de Pearson. O número de células marcadas para proteína Fos ou duplas marcações  $\alpha$ -MSH+/ Fos + foram analisados separadamente, primeiramente pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Depois de verificada a normalidade na distribuição da amostra, foi utilizado o Teste T de Student não pareado para comparações entre grupos. Correlações entre comportamentos ingestivos e os diferentes índices de marcação celular foram realizadas através do coeficiente de correlação paramétrico de Pearson. Em todas as análises estatísticas foram aceitos apenas os valores de  $p < 0,05$  como sendo

estatisticamente significativos. Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do software Statistica 8.0 (Statsoft).

## 5. Resultados

A figura 7 representa os locais das microinjeções no DRN em ratos saciados e submetidos ao jejum noturno. O número de pontos tende a ser menor devido à sobreposição de pontos.



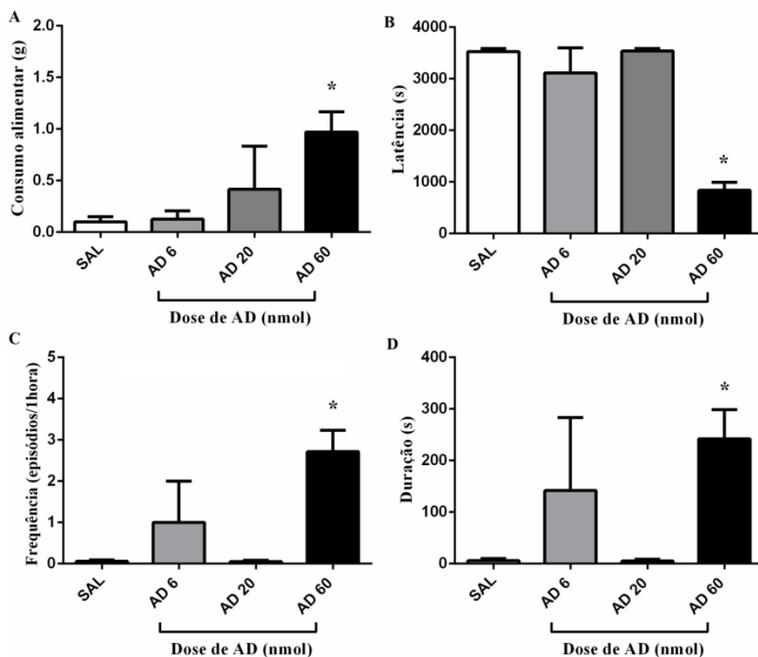
**Figura 7:** Desenhos esquemáticos representando os locais das microinjeções em três níveis diferentes no DRN e fotomicrografia de um corte coronal de mesencéfalo, demonstrando o local de injeção no DRN. DRN = núcleo dorsal da rafe; Aq = aqueduto. (Adaptado de Paxinos e Watson, 2007).

Os resultados a seguir serão apresentados de forma dividida, em dois grandes grupos experimentais: **animais saciados e submetidos ao jejum noturno.**

- **Resultados experimentais obtidos com a utilização de animais saciados**

### **5.1 Efeitos da injeção de AD no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratos saciados.**

A análise através do teste de ANOVA revelou que a quantidade de alimento ingerido [ $F(3, 24) = 4,45$   $p = 0,013$ ], a frequência dos episódios de ingestão de alimento [ $F(3, 24) = 6,81$   $p < 0,01$ ], a duração [ $F(3, 24) = 3,88$   $p = 0,02$ ] e a latência para iniciar o consumo [ $F(3, 24) = 36,47$   $p < 0,01$ ] em ratos saciados foram alteradas após o tratamento com AD no DRN. A quantidade, a frequência e a duração da ingestão de alimento aumentaram após a administração apenas da dose de 60 nmol em comparação com o grupo controle (Figura 8). A latência para iniciar o consumo diminuiu após a administração da dose de 60 nmol (Figura 8). As demais doses de AD não alteraram os comportamentos ingestivos. Não ocorreu ingestão de água nos animais tratados com AD ou veículo (dados não mostrados). Os comportamentos não ingestivos não foram significativamente alterados pela injeção de AD no DRN (Tabela 1).



**Figura 8:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL,  $n = 8$ ) ou adrenalina (AD) nas doses de 6 nmol ( $n = 8$ ), 20 nmol ( $n = 8$ ) e 60 nmol ( $n = 8$ ) no DRN de ratos saciados. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.

**Tabela 1:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos saciados durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), AD 6 nmol (n = 8), AD 20 nmol (n = 8) e AD 60 nmol (n = 8).

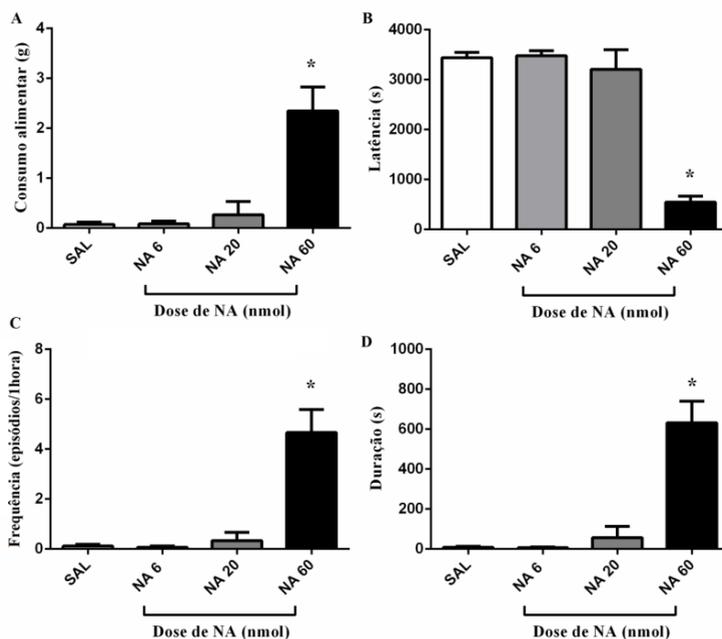
Comportamento	Dose (nmol)	Duração Total (s)	ANOVA
Locomoção	SAL	282 ± 25	F(3, 24) = 0,04 p = 1,0
	6	287 ± 43	
	20	295 ± 32	
	60	279 ± 43	
Exploração Vertical	SAL	88 ± 9	F(3, 24) = 0,68 p = 0,57
	6	103 ± 10	
	20	92 ± 9	
Autolimpeza	SAL	223 ± 33	F(3, 24) = 0,08 p = 0,97
	6	242 ± 28	
	20	234 ± 21	
	60	230 ± 25	
Imobilidade	SAL	2101 ± 67	F(3, 24) = 0,86 p = 0,48
	6	1976 ± 164	
	20	1962 ± 136	
	60	1831 ± 89	

Os dados representam a média ± EPM. ANOVA de uma via.

## 5.2 Efeitos da injeção de NA no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratos saciados.

A análise de variância revelou que a quantidade de alimento ingerido [F(3, 21) = 18,50, p < 0,01], a frequência dos episódios de ingestão de alimento [F(3, 21) = 23,28 p < 0,01], a duração [F(3, 21) = 27,97, p < 0,01] e a latência para iniciar o consumo [F(3, 21) = 54,91 p < 0,01] em ratos saciados foram alteradas após o tratamento com NA no DRN. A quantidade, a frequência e a duração da ingestão de alimento aumentaram após a administração da maior dose de NA (60 nmol) em comparação com o grupo controle (Figura 9). A latência para iniciar o consumo diminuiu após a administração das doses de 60 nmol (Figura 9). As demais doses de NA não

alteraram os comportamentos ingestivos. Não ocorreu ingestão de água nos animais tratados com NA ou veículo (dados não mostrados). O comportamento não ingestivo de imobilidade [ $F(3, 21) = 15,21$   $p < 0,01$ ] foi alterado pelo tratamento com NA, tendo sua duração diminuída após a administração da dose de 60 nmol (Tabela 2). Os demais comportamentos não ingestivos não foram significativamente alterados (Tabela 2).



**Figura 9:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL,  $n = 8$ ) ou noradrenalina (NA) nas doses de 6 nmol ( $n = 8$ ), 20 nmol ( $n = 8$ ) e 60 nmol ( $n = 8$ ) no DRN de ratos saciados. Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.

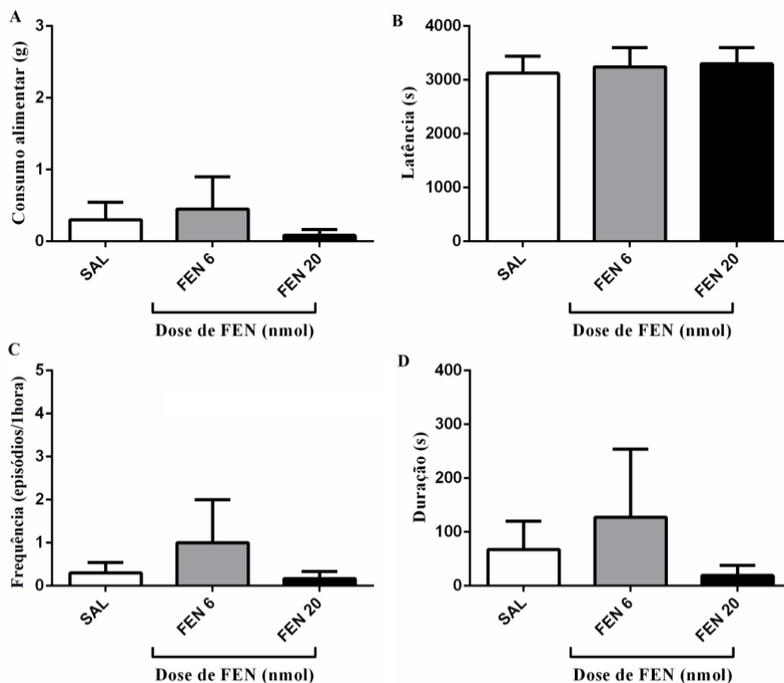
**Tabela 2:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos saciados durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), NA 6 nmol (n = 8), NA 20 nmol (n = 8) E NA 60 nmol (n = 8).

Comportamento	Dose (nmol)	Duração Total (s)	ANOVA
Locomoção	SAL	282 ± 25	F(3, 21) = 0,02 p = 0,10
	6	277 ± 91	
	20	381 ± 38	
	60	270 ± 48	
Exploração Vertical	SAL	88 ± 9	F(3, 21) = 1,38 p = 0,26
	6	108 ± 16	
	20	123 ± 18	
	60	111 ± 16	
Autolimpeza	SAL	223 ± 33	F(3, 21) = 0,41 p = 0,75
	6	267 ± 33	
	20	233 ± 24	
	60	250 ± 30	
Imobilidade	SAL	2101 ± 67	F(3, 21) = 15,21 p < 0,01
	6	2267 ± 91	
	20	2182 ± 182	
	60	1360 ± 153*	

Os dados representam a média ± EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.

### 5.3 Efeitos da injeção de FEN no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratos saciados.

Os comportamentos ingestivos (Figura 10) e não ingestivos (Tabela 3) não foram significativamente alterados pelo tratamento com FEN no DRN em ambas as doses de 6 e 20 nmol (Figura 6). Não ocorreu ingestão de água nos animais tratados com FEN ou veículo (dados não mostrados).



**Figura 10:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL,  $n = 8$ ) ou fenilefrina (FEN) nas doses de 6 nmol ( $n = 8$ ) e 20 nmol ( $n = 8$ ) no DRN de ratos saciados. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. ANOVA de uma via.

**Tabela 3:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos saciados durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), FEN 6 nmol (n = 8) e FEN 20 nmol (n = 8).

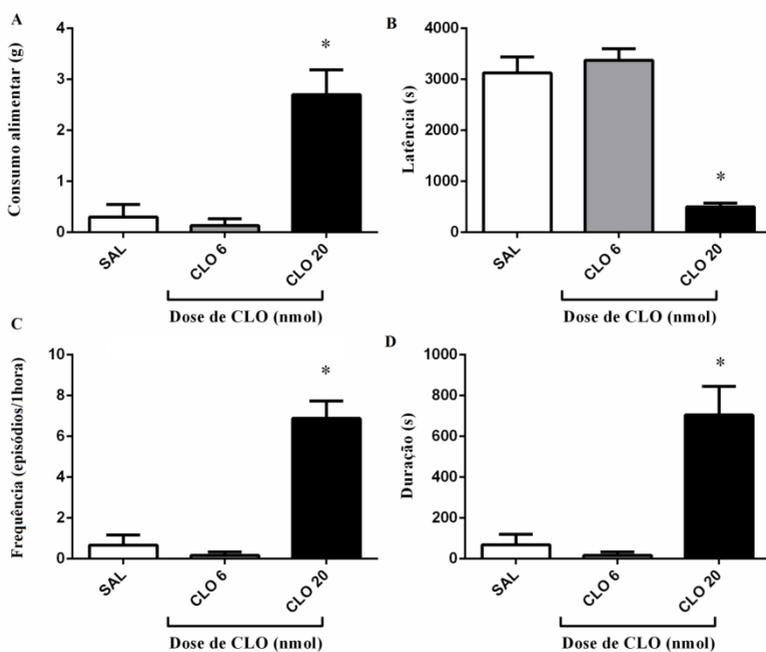
Comportamento	Dose (nmol)	Duração Total (s)	ANOVA
Locomoção	SAL	310 ± 23	F(2, 15) = 0,07 p = 0,93
	6	287 ± 44	
	20	300 ± 68	
Exploração Vertical	SAL	99 ± 13	F(2, 15) = 0,22 p = 0,80
	6	112 ± 20	
	20	109 ± 10	
Autolimpeza	SAL	322 ± 31	F(2, 15) = 0,25 p = 0,78
	6	250 ± 30	
	20	266 ± 31	
Imobilidade	SAL	1985 ± 128	F(2, 15) = 0,26 p = 0,78
	6	1882 ± 160	
	20	2006 ± 97	

Os dados representam a média ± EPM. ANOVA de uma via.

#### 5.4 Efeitos da injeção de CLO no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratos saciados.

A análise de variância revelou que a quantidade de alimento ingerido [F(2, 17) = 16,31 p < 0,01], a frequência dos episódios de ingestão de alimento [F(2, 17) = 34,83 p < 0,01], a duração [F(2, 17) = 17,962, p < 0,01] e a latência para iniciar o consumo [F(2, 17) = 65,58 p < 0,01] em ratos saciados foram alteradas após o tratamento com CLO no DRN. A quantidade, a frequência e a duração da ingestão de alimento aumentaram após a administração da maior dose de CLO (60 nmol) em comparação com o grupo controle (Figura 11). A latência para iniciar o consumo diminuiu após a administração das doses de 60 nmol (Figura 11). As demais doses de CLO não alteraram os comportamentos ingestivos. Não ocorreu ingestão de água

nos animais tratados com CLO ou veículo (dados não mostrados). O comportamento não ingestivo de imobilidade [ $F(2, 17) = 34,52$   $p < 0,01$ ] foi alterado pelo tratamento com CLO, tendo sua duração diminuída após a administração da dose de 60 nmol (Tabela 4). Os demais comportamentos não ingestivos não foram significativamente alterados (Tabela 4).



**Figura 11:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL,  $n = 8$ ) ou clonidina (CLO) nas doses de 6 nmol ( $n = 8$ ) e 20 nmol ( $n = 8$ ) no DRN de ratos saciados. Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.

**Tabela 4:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos saciados durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), CLO 6 nmol (n = 8) e CLO 20 nmol (n = 8).

Comportamento	Dose (nmol)	Duração Total (s)	ANOVA
Locomoção	SAL	310 ± 23	F(2, 17) = 0,13 p = 0,88
	6	299 ± 48	
	20	370 ± 35	
Exploração Vertical	SAL	99 ± 13	F(2, 17) = 0,28 p = 0,76
	6	108 ± 22	
	20	115 ± 13	
Autolimpeza	SAL	322 ± 31	F(2, 17) = 0,99, p = 0,39
	6	269 ± 56	
	20	335 ± 59	
Imobilidade	SAL	1985 ± 128	F(2, 17) = 34,52 p < 0,01
	6	2117 ± 88	
	20	1075 ± 87*	

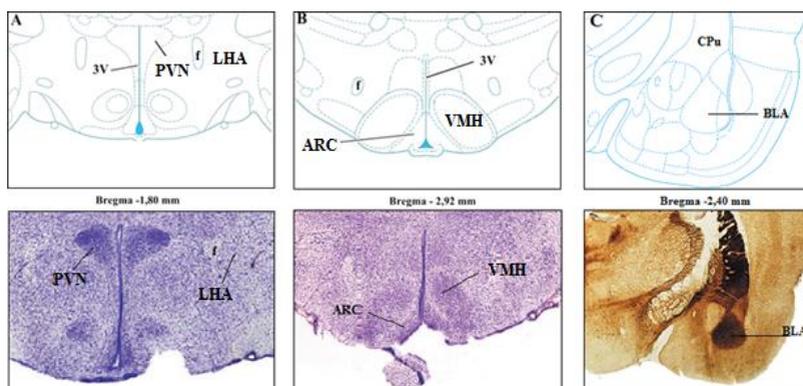
Os dados representam a média ± EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.

### 5.5 Efeitos da injeção de CLO 20 nmol no DRN sobre a expressão da proteína Fos em núcleo hipotalâmicos de ratos saciados.

Depois de realizadas as curvas dose/resposta, escolheu-se o agonista específico  $\alpha$ -2 adrenérgico Clonidina na dose de 20 nmol (dose efetiva) e novos grupos experimentais foram feitos, analisando os comportamentos ingestivos na caixa de registro comportamental. Tais comportamentos foram semelhantes àqueles encontrados nos experimentos anteriores (dados não mostrados). Após a análise comportamental, realizaram-se análises imunoistoquímicas nos núcleos hipotalâmicos paraventricular (PVN), ventromedial (VMH), arqueado (ARC) e a área hipotalâmica lateral (LHA),

além da amígdala basolateral (BLA), para verificar o padrão de atividade neuronal nestas regiões.

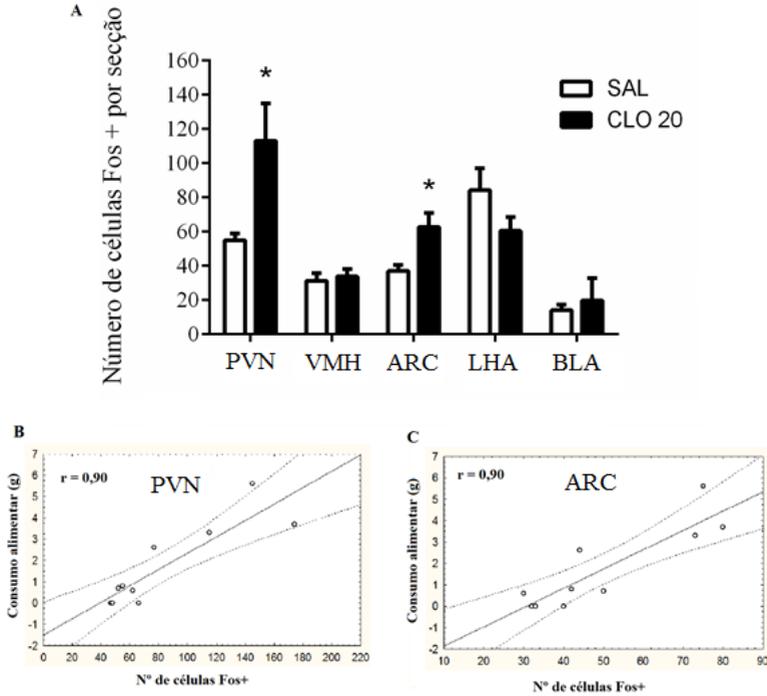
A figura 12 representa desenhos e cortes coronais das áreas de contagem hipotalâmicas, esquematizando suas localizações no cérebro do rato.



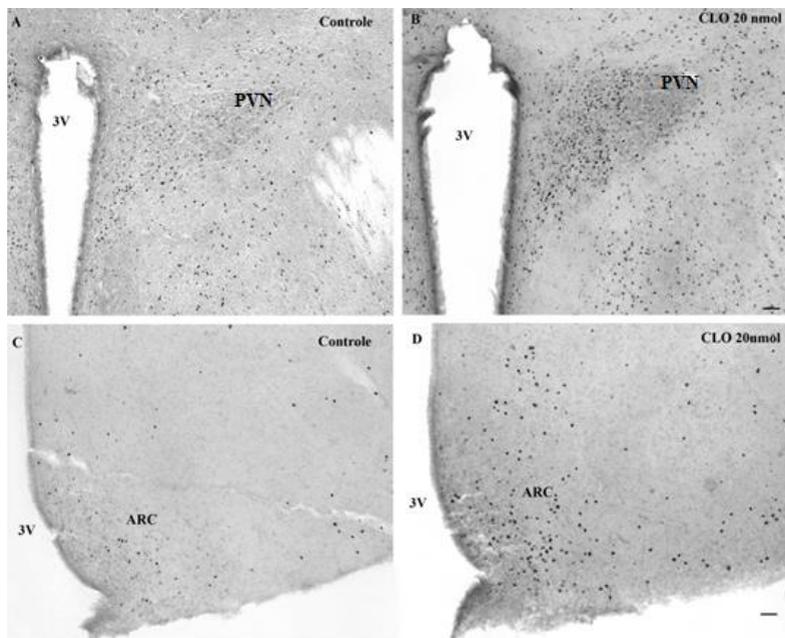
**Figura 12:** A) Desenho esquemático e corte histológico demonstrando os núcleos PVN e LHA. B) Desenho esquemático e corte histológico demonstrando os núcleos ARC e VMH C) Desenho esquemático e corte histológico demonstrando a BLA. Para abreviações consultar lista de abreviaturas (Adaptado de Paxinos e Watson, 2007).

A análise estatística através do Teste T de Student revelou que a injeção de CLO 20 nmol aumentou o número de células Fos + no NPV em comparação ao grupo controle ( $p = 0,03$ ), efeito este também encontrado no ARC ( $p = 0,02$ ) (Figura 13A). As marcações no PVN apareceram de forma irregular ao longo do núcleo entre os grupos experimentais, não sendo possível delimitar uma sub-região específica do PVN que estava ativada. A LHA, o VMH e a BLA não apresentaram modificações estatisticamente significantes na expressão de Fos nos grupos analisados (Figura 8A). Os testes de correlação indicaram que no PVN a quantidade de células Fos + nos

animais tratados com CLO 20 nmol ou veículo foi positivamente correlacionado com a quantidade de alimento ingerido ( $r = 0,90$ , Figura 13B), sendo observada a mesma correlação positiva para o ARC ( $r = 0,90$ , Figura 13C).



**Figura 13:** A) Gráfico representando o número de células Fos + nos diferentes núcleos hipotalâmicos estudados ( $n = 4 - 5$  por grupo) após a injeção de CLO 20 no DRN de ratos saciados. Os dados representam a média  $\pm$  EPM  $*p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. Teste T de Student não pareado. B) Gráfico de correlação entre consumo alimentar e o número de células Fos + no PVN dos grupos SAL e CLO 20nmol. C) Gráfico de correlação entre consumo alimentar e o número de células Fos + no ARC dos grupos SAL e CLO 20nmol. Teste de correlação de Pearson  $*p < 0,05$ . Para abreviações consultar lista de abreviaturas.

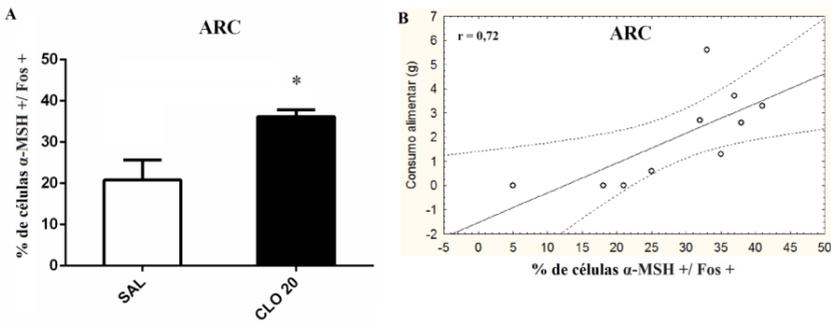


**Figura 14:** Fotomicrografias ilustrando a expressão de Fos em núcleos hipotalâmicos após a administração de CLO 20 nmol no DRN. A – B) Expressão de Fos no PVN. C – D) Expressão de Fos no ARC. Barra de escala = 200 $\mu$ m. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.

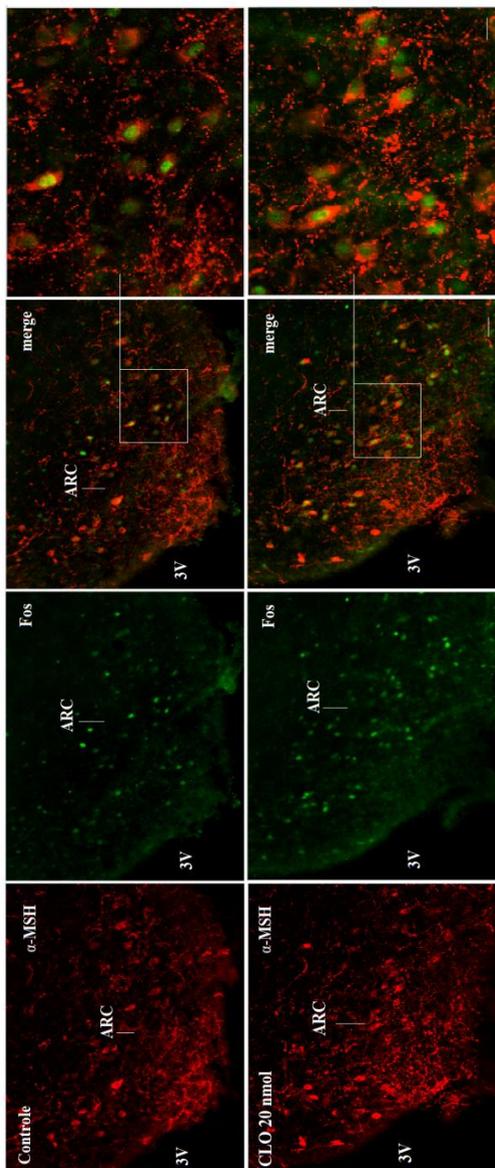
Com o objetivo de identificar a assinatura química dos neurônios ativados no ARC, realizaram-se duplas marcações através da técnica de imunofluorescência utilizando o anticorpo para o hormônio estimulante de alfa-melanócitos ( $\alpha$ -MSH), que identifica neurônios POMC presentes neste núcleo, e o anticorpo para proteína Fos ( $\alpha$ -MSH +/- Fos +). A análise estatística revelou que a injeção de CLO 20 nmol aumentou a porcentagem de células  $\alpha$ -MSH +/- Fos + em comparação ao grupo controle ( $p = 0,02$ , Figura 15A). O teste de correlação indicou que no ARC a porcentagem de células  $\alpha$ -MSH +/- Fos + nos animais tratados com CLO 20 nmol ou veículo

foi positivamente correlacionado com a quantidade de alimento ingerido ( $r = 0,72$ , Figura 15B).

Como já é bem descrito na literatura, o PVN possui sub-regiões com populações neuronais distintas. Dessa forma, a característica irregular de distribuição das marcações para Fos encontradas no experimento anterior, impossibilitou que fizéssemos a identificação destes neurônios através de duplas marcações.



**Figura 15:** A) Porcentagem de células  $\alpha$ -MSH +/ Fos + após a injeção de Clonidina 20 nmol no DRN de ratos saciados. Test T não pareado.  $*p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. B) Gráfico de correlação entre consumo alimentar e a porcentagem de células  $\alpha$ -MSH +/ Fos + no ARC dos grupos SAL e CLO 20nmol. Teste de correlação de Pearson  $*p < 0,05$ . Para abreviações consultar lista de abreviaturas.

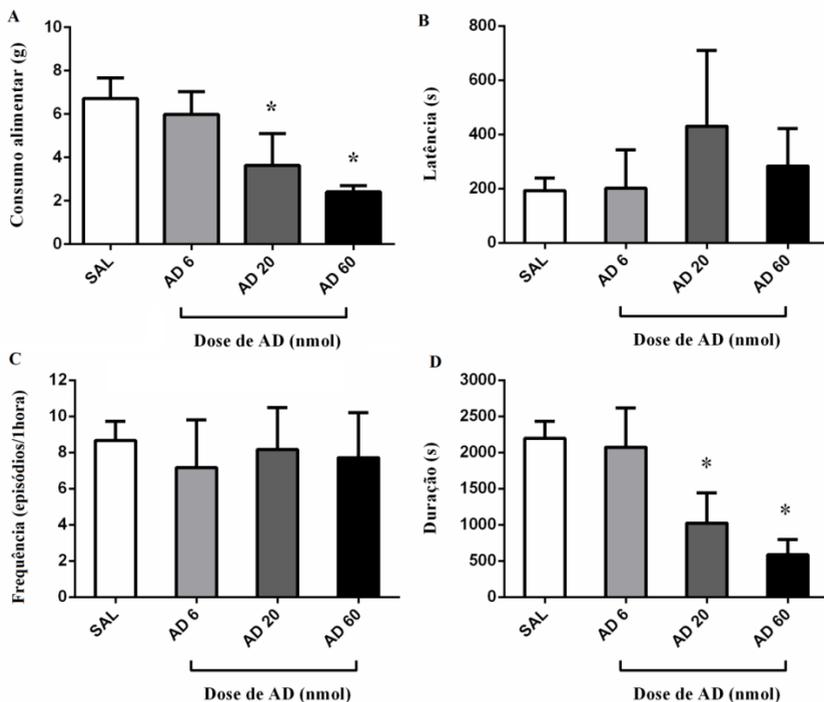


**Figura 16:** Fotomicrografias de imunofluorescência ilustrando a co-localização da proteína Fos em neurônios  $\alpha$ -MSH + localizados no ARC após a administração de CLO 20 nmol no DRN de ratos saciados. Em vermelho, células  $\alpha$ -MSH + e em verde, células Fos +. Em detalhes no insert, as duplas marcações  $\alpha$ -MSH + /Fos +. Barra de escala = 200 $\mu$ m e 100  $\mu$ m para o *insert*. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.

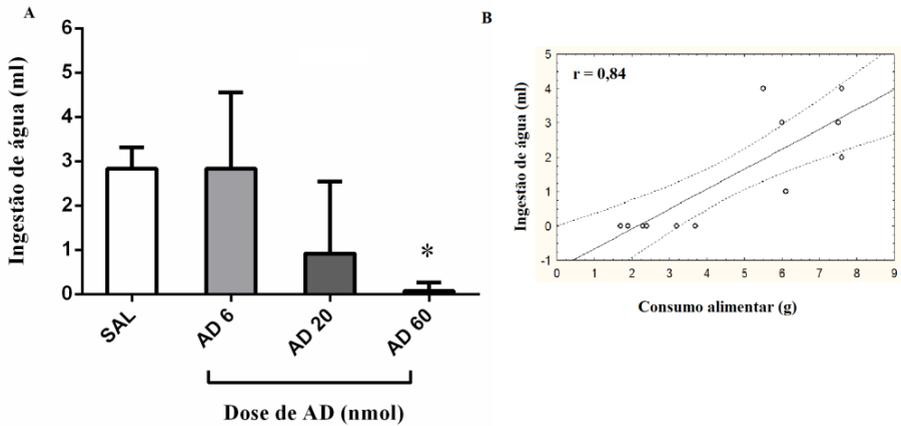
- **Resultados experimentais obtidos com a utilização de animais submetidos ao jejum noturno**

### **5.6 Efeitos da injeção de AD no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratos submetidos ao jejum noturno.**

O teste de ANOVA indicou que apenas a quantidade de alimento ingerido [ $F(3, 21) = 22,26$   $p < 0,01$ ] e a duração do comportamento ingestivo [ $F(3, 21) = 19,30$   $p < 0,01$ ] foram alteradas após o tratamento com AD no DRN. A quantidade e a duração da ingestão de alimento diminuíram após a administração das doses de 20 e 60 nmol em comparação com o grupo controle (Figura 17). A dose de 6 nmol de AD não alterou os comportamentos ingestivos. Com relação à ingesta hídrica, houve uma diminuição na quantidade de água ingerida [ $F(3, 21) = 7,82$   $p < 0,01$ ] (Figura 18A) após a administração da dose de 60 nmol de AD. Além disso, houve correlação positiva ( $r = 0,84$ , Figura 18B) entre a quantidade de água ingerida e a quantidade de alimento consumida. Apenas o comportamento não ingestivo de imobilidade foi alterado, tendo sua duração aumentada após a administração das doses de 20 e 60 nmol de AD. Os demais comportamentos não foram significativamente alterados pela injeção de AD (Tabela 5).



**Figura 17:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora após o tratamento com salina (SAL,  $n = 8$ ) ou adrenalina (AD) nas doses de 6 nmol ( $n = 8$ ), 20 nmol ( $n = 8$ ) e 60 nmol ( $n = 8$ ) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.



**Figura 18:** A) Alterações na quantidade da ingestão de água durante 1 hora após o tratamento com salina (SAL,  $n = 8$ ) ou adrenalina (AD) nas doses de 6 nmol ( $n = 8$ ), 20 nmol ( $n = 8$ ) e 60 nmol ( $n = 8$ ) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM  $*p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey. B) Gráfico de correlação entre a quantidade de água e a quantidade de alimento ingerido após administração de AD 60 nmol ou SAL no DRN. Teste de correlação de Pearson  $*p < 0,05$ .

**Tabela 5:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos submetidos ao jejum noturno durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), AD 6 nmol (n = 8), AD 20 nmol (n = 8), AD 60 nmol (n = 8).

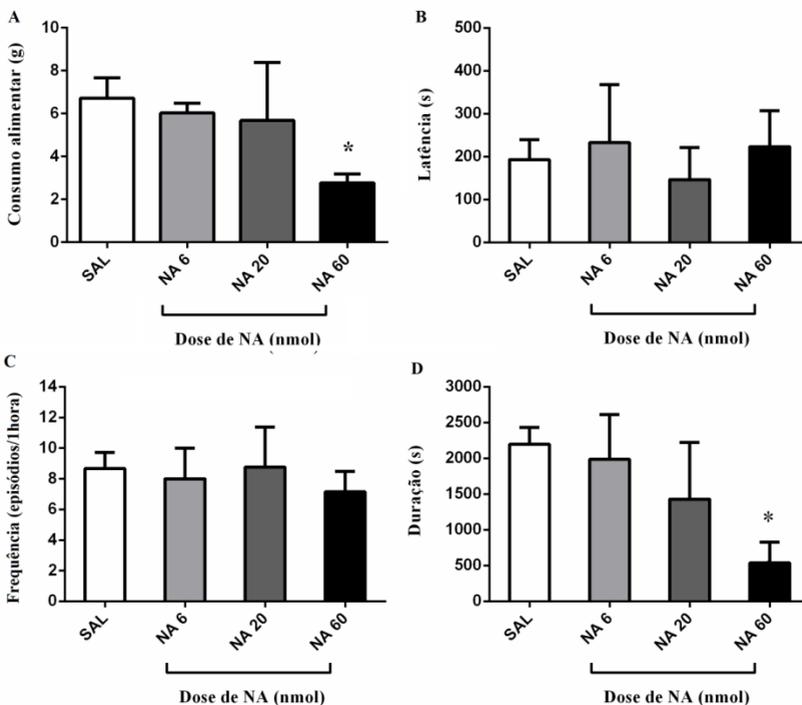
Comportamento	Dose (nmol)	Duração Total (s)	ANOVA
Locomoção	SAL	319 ± 64	F(3, 21) = 4,28 p = 0,1
	6	322 ± 47	
	20	386 ± 34	
	60	428 ± 46	
Exploração Vertical	SAL	95 ± 24	F(3, 21) = 0,71 p = 0,55
	6	148 ± 43	
	20	129 ± 18	
	60	137 ± 16	
Autolimpeza	SAL	143 ± 46	F(3, 21) = 2,14 p = 0,13
	6	218 ± 38	
	20	233 ± 64	
	60	307 ± 38	
Imobilidade	SAL	390 ± 108	F(3, 21) = 26,40 p < 0,01
	6	508 ± 114	
	20	1158 ± 147*	
	60	1754 ± 127*	

Os dados representam a média ± EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.

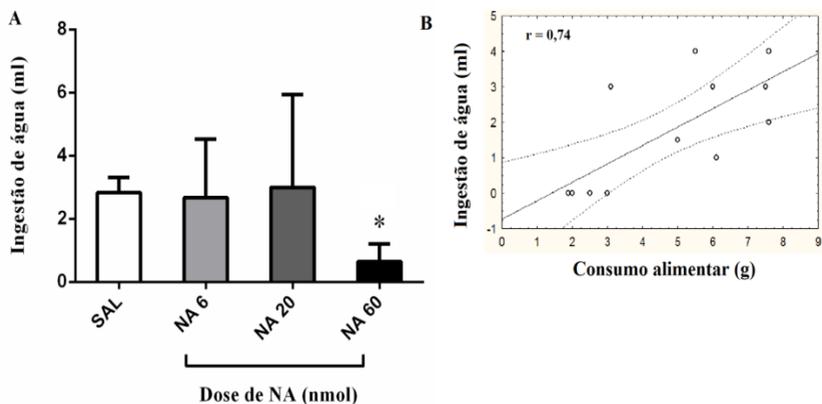
### 5.7 Efeitos da injeção de NA no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos de ratos submetidos ao jejum noturno.

A análise estatística revelou que apenas a quantidade de alimento ingerido [F(3, 19) = 9,57  $p < 0,01$ ] e a duração do comportamento ingestivo [F(3, 19) = 11,31  $p < 0,01$ ] foram alteradas após o tratamento com NA no DRN. A quantidade e a duração da ingestão de alimento diminuíram após a administração apenas da dose de 60 nmol em comparação com o grupo controle (Figura 19). As demais doses de NA não alteraram os comportamentos ingestivos. Com relação à ingesta hídrica, houve uma diminuição na quantidade de água ingerida [F(3, 21) = 4,52  $p = 0,03$ ] (Figura

20A) após a administração da dose de 60 nmol de AD. Além disso, houve correlação positiva ( $r = 0,74$ , Figura 20B) entre a quantidade de água ingerida e a quantidade de alimento consumida. Os comportamentos não ingestivos de imobilidade e autolimpeza foram alterados [ $F(3, 19) = 22,26$   $p < 0,01$ ], tendo suas durações aumentadas após a administração da dose de 60 nmol de NA. Os demais comportamentos não foram significativamente alterados pela injeção de NA (Tabela 6).



**Figura 19:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL,  $n = 8$ ) ou noradrenalina (NA) nas doses de 6 nmol ( $n = 8$ ), 20 nmol ( $n = 8$ ) e 60 nmol ( $n = 8$ ) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.



**Figura 20:** A) Alterações na quantidade da ingestão de água durante 1 hora após o tratamento com salina (SAL,  $n = 8$ ) ou noradrenalina (NA) nas doses de 6 nmol ( $n = 8$ ), 20 nmol ( $n = 8$ ) e 60 nmol ( $n = 8$ ) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM  $*p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey. B) Gráfico de correlação entre a quantidade de água e a quantidade de alimento ingerido após administração de NA 60 nmol ou SAL no DRN. Teste de correlação de Pearson  $*p < 0,05$ .

**Tabela 6:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos submetidos ao jejum noturno durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), NA 6 nmol (n = 8), NA 20 nmol (n = 8), NA 60 nmol (n = 8).

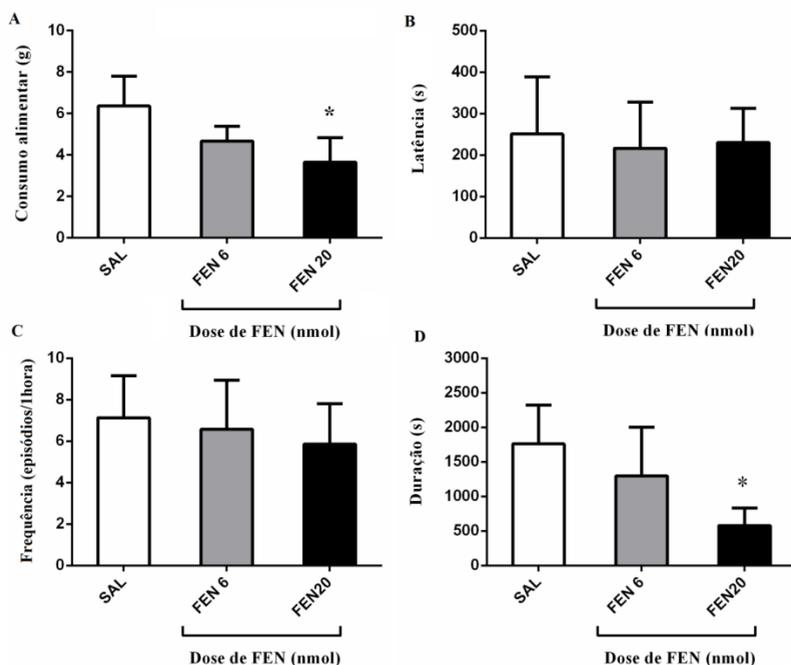
Comportamento	Dose (nmol)	Duração Total (s)	ANOVA
Locomoção	SAL	334 ± 70	F(3, 19) = 0,44 p = 0,73
	6	290 ± 47	
	20	401 ± 102	
	60	371 ± 25	
Exploração Vertical	SAL	110 ± 30	F(3, 19) = 0,72 p = 0,55
	6	120 ± 43	
	20	163 ± 59	
	60	132 ± 9	
Autolimpeza	SAL	150 ± 39	F(3, 19) = 5,56, p = 0,006
	6	245 ± 38	
	20	210 ± 35	
	60	333 ± 46 *	
Imobilidade	SAL	365 ± 90	F(3, 19) = 22,26 p < 0,01
	6	610 ± 114	
	20	615 ± 182	
	60	1718 ± 101*	

Os dados representam a média ± EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.

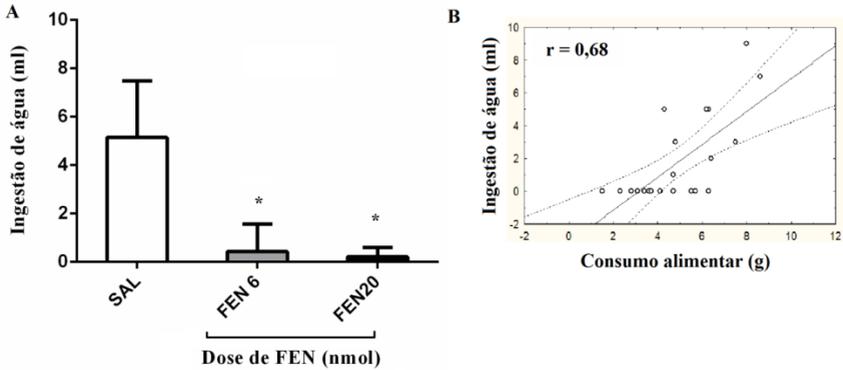
### 5.8 Efeitos da injeção de FEN no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos.

A quantidade de alimento ingerido [F(3, 19) = 9,57 p < 0,01] e a duração do comportamento ingestivo [F(3, 19) = 11,31 p < 0,01] foram alteradas após o tratamento com FEN no DRN. A quantidade e a duração da ingestão de alimento diminuíram após a administração apenas da dose de 20 nmol em comparação com o grupo controle (Figura 21). A dose de 6 nmol de FEN não alterou os comportamentos ingestivos. Com relação à ingesta hídrica, houve uma diminuição na quantidade de água ingerida [F(3, 21) = 4,52 p = 0,03] (Figura 22A) após a administração da dose de 6 e 20 nmol de FEN. O teste

de correlação indicou que houve correlação positiva ( $r = 0,68$ , Figura 22B) entre a quantidade de água ingerida e a quantidade de alimento consumida. Apenas o comportamento não ingestivo de imobilidade foi alterado [ $F(3, 19) = 22,26$   $p < 0,01$ ], tendo sua duração aumentada após a administração da dose de 20 nmol de FEN. Os demais comportamentos não foram significativamente alterados pela injeção de FEN (Tabela 7).



**Figura 21:** Alterações no consumo, latência, frequência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL,  $n = 8$ ) ou fenilefrina (FEN) nas doses de 6 nmol ( $n = 8$ ) e 20 nmol ( $n = 8$ ) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.



**Figura 22:** A) Alterações na quantidade da ingestão de água durante 1 hora após o tratamento com salina (SAL,  $n = 8$ ) ou fenilefrina (FEN) nas doses de 6 nmol ( $n = 8$ ) e 20 nmol ( $n = 8$ ) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey. B) Gráfico de correlação entre a quantidade de água e a quantidade de alimento ingerido após administração de FEN 6, 20 nmol ou SAL no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Teste de correlação de Pearson \* $p < 0,05$ .

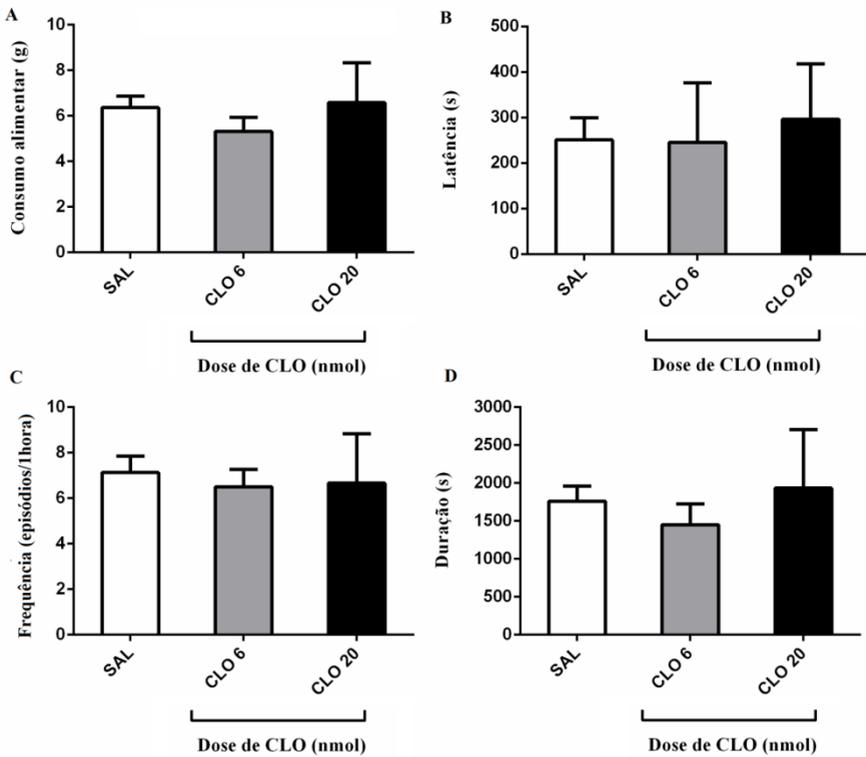
**Tabela 7:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos submetidos ao jejum noturno durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), FEN 6 nmol (n = 8) e FEN 20 nmol (n = 8).

Comportamento	Dose (nmol)	Duração Total (s)	ANOVA
Locomoção	SAL	426 ± 58	F(2, 19) = 0,08 p = 0,92
	6	400 ± 61	
	20	403 ± 21	
Exploração Vertical	SAL	119 ± 14	F(2, 19) = 0,33 p = 0,72
	6	115 ± 18	
	20	132 ± 9	
AutoLimpeza	SAL	209 ± 42	F(2, 19) = 2,30 p = 0,07
	6	287 ± 159	
	20	397 ± 63	
Imobilidade	SAL	438 ± 87	F(2, 19) = 31,49 p < 0,01
	6	831 ± 159	
	20	1718 ± 101*	

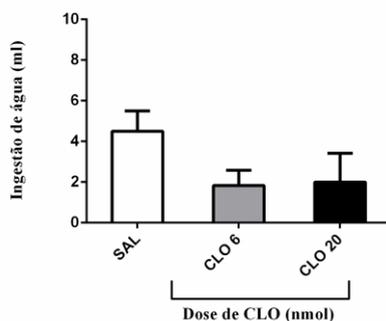
Os dados representam a média ± EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.

### 5.9 Efeitos da injeção de CLO no DRN sobre os comportamentos ingestivos e não ingestivos.

Os comportamentos ingestivos (Figura 23) e não ingestivos (Tabela 8) não foram significativamente alterados pela injeção de CLO no DRN em ambas as doses de 6 e 20 nmol. A ingestão hídrica também não foi alterada após o tratamento com CLO (Figura 24).



**Figura 23:** Alterações no consumo, latência, freqüência e duração da ingestão de alimento durante 1 hora, após o tratamento com salina (SAL,  $n = 8$ ) ou clonidina (CLO) nas doses de 6 nmol ( $n = 8$ ) e 20 nmol ( $n = 8$ ) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.



**Figura 24:** Alterações na quantidade da ingestão de água durante 1 hora após o tratamento com salina (SAL, n = 8) ou clonidina (CLO) nas doses de 6 nmol (n = 8) e 20 nmol (n = 8) no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey.

**Tabela 8:** Alterações na duração dos comportamentos não ingestivos de ratos submetidos ao jejum noturno durante 1 hora de registro após administração de salina (SAL, n = 8), CLO 6 nmol (n = 8) e CLO 20 nmol (n = 8).

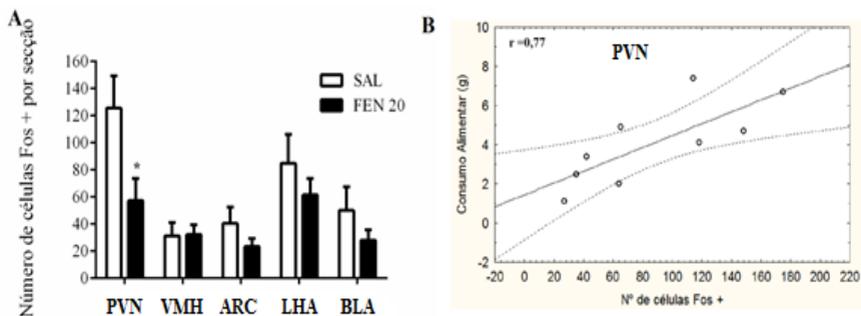
Comportamento	Dose (nmol)	Duração Total (s)	ANOVA
Locomoção	SAL	450 $\pm$ 78	F(2, 17) = 2,36 p = 0,12
	6	412 $\pm$ 46	
	20	287 $\pm$ 23	
Exploração Vertical	SAL	103 $\pm$ 21	F(2, 17) = 0,13 p = 0,88
	6	113 $\pm$ 13	
	20	109 $\pm$ 18	
Autolimpeza	SAL	230 $\pm$ 26	F(2, 17) = 0,12 p = 0,88
	6	200 $\pm$ 38	
	20	229 $\pm$ 36	
Imobilidade	SAL	482 $\pm$ 67	F(2, 17) = 0,43, p = 0,65
	6	495 $\pm$ 60	
	20	381 $\pm$ 19	

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. ANOVA de uma via.

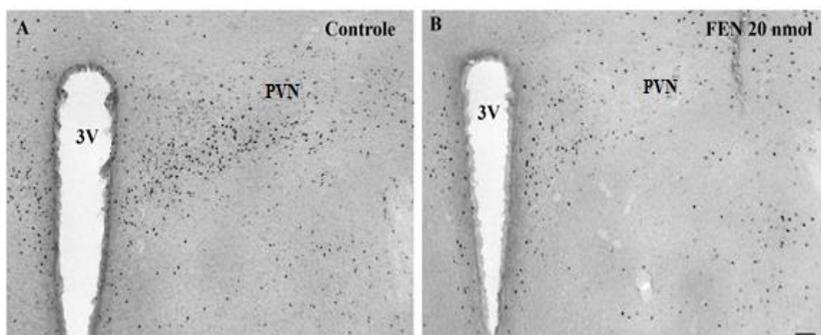
### **5.10 Efeitos da injeção de FEN 20 nmol no DRN sobre a expressão da proteína Fos em núcleo hipotalâmicos de ratos submetidos ao jejum noturno.**

Depois de finalizada as curvas dose/resposta, escolheu-se o agonista específico  $\alpha$ -1 adrenérgico Fenilefrina na dose de 20 nmol (dose efetiva) e novos grupos experimentais foram feitos, analisando os comportamentos ingestivos na caixa de registro comportamental. Tais comportamentos foram semelhantes àqueles encontrados nos experimentos anteriores (dados não mostrados). Após a análise comportamental, realizaram-se novamente análises imunoistoquímicas nos núcleos hipotalâmicos paraventricular (PVN), ventromedial (VMH), arqueado (ARC) e a área hipotalâmica lateral (LHA), além da amígdala basolateral (BLA), para verificar o padrão de atividade neuronal nestas regiões.

O Teste T de Student revelou que a injeção de FEN 20 nmol diminuiu o número de células Fos + no PVN em comparação ao grupo controle ( $p = 0,04$ , Figura 25A). Novamente, as marcações no PVN apareceram de forma irregular ao longo do núcleo entre os grupos experimentais, não sendo possível delimitar uma sub-região específica do PVN que estava ativada. O ARC, LHA, o VMH e a BLA não apresentaram modificações estatisticamente significantes na expressão de Fos nos grupos analisados (Figura 25A). Os testes de correlação indicaram que no PVN a quantidade de células Fos + nos animais tratados com FEN 20 nmol ou veículo foi positivamente correlacionado com a quantidade de alimento ingerido ( $r = 0,77$ , Figura 25B).



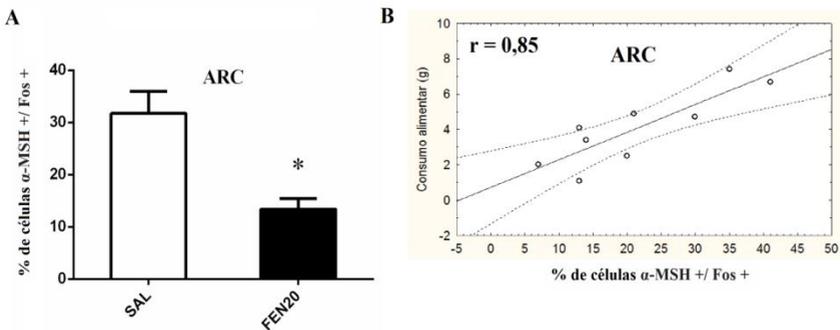
**Figura 25:** A) Gráfico representando o número de células Fos + nos diferentes núcleos hipotalâmicos estudados ( $n = 4 - 5$  por grupo) após a injeção de FEN 20 nmol no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. Teste T de Student não pareado. B) Gráfico de correlação entre consumo alimentar e o número de células Fos + no PVN dos grupos SAL e FEN 20nmol. Teste de correlação de Pearson \* $p < 0,05$ . Para abreviações consultar lista de abreviaturas.



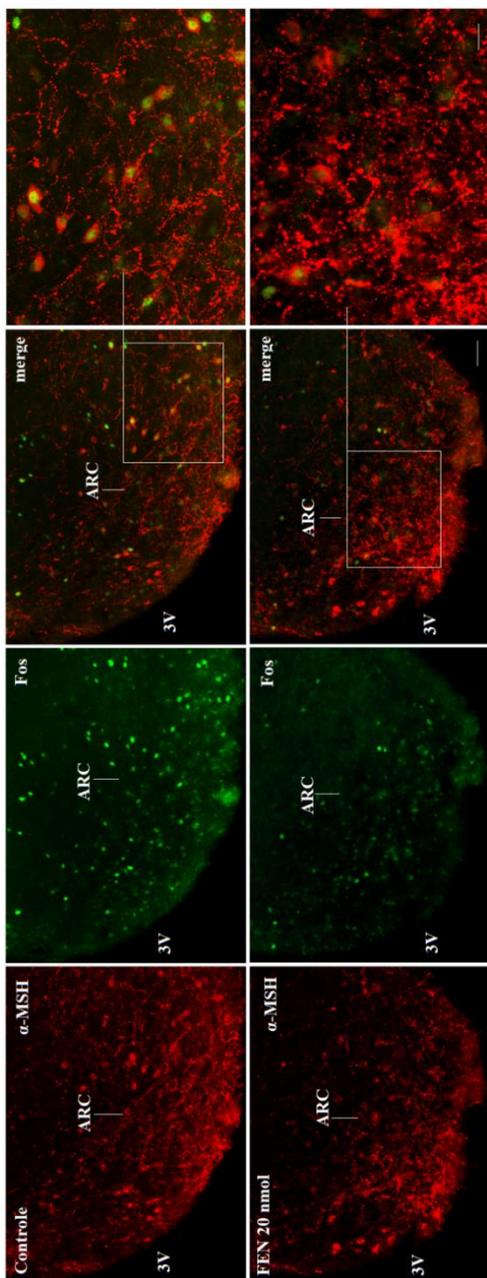
**Figura 26:** Fotomicrografias ilustrando a expressão de Fos em núcleos hipotalâmicos após a administração de FEN 20 nmol no DRN. A – B) Expressão de Fos no PVN. Barra de escala = 200 $\mu$ m. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.

Embora não tenhamos encontrado diferenças estatisticamente significativas no ARC quanto à expressão de Fos nos animais submetidos ao jejum noturno, decidimos realizar duplas marcações para  $\alpha$ -MSH +/ Fos + para verificar o padrão de ativação dos neurônios  $\alpha$ -MSH +. A análise estatística revelou que a injeção de FEN 20 nmol diminuiu a porcentagem de células  $\alpha$ -MSH +/ Fos + em comparação ao grupo controle (Figura 27A). O teste de correlação indicou que no ARC a porcentagem de células  $\alpha$ -MSH +/ Fos + nos animais tratados com CLO 20 nmol ou veículo foi positivamente correlacionado com a quantidade de alimento ingerido ( $r = 0,72$ , Figura 27B).

De maneira semelhante ao encontrado nos experimentos com animais saciados, a distribuição irregular das marcações Fos + no PVN ao longo dos grupos experimentais impossibilitou a identificação da assinatura química destes neurônios ativados.



**Figura 27:** A) Porcentagem de células  $\alpha$ -MSH +/ Fos + após a injeção de Fenilefrina 20 nmol no DRN de ratos saciados ( $n = 4 - 5$  por grupo). Test T não pareado.  $*p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. B) Gráfico de correlação entre consumo alimentar e a porcentagem de células  $\alpha$ -MSH +/ Fos + no ARC dos grupos SAL e FEN 20nmol. Teste de correlação de Pearson  $*p < 0,05$ . Para abreviações consultar lista de abreviaturas.



**Figura 28:** Fotomicrografias de imunofluorescência ilustrando a co-localização da proteína Fos em neurônios  $\alpha$ -MSH + localizados no ARC após a administração de FEN 20 nmol no DRN de ratos submetidos ao jejum noturno. Em vermelho, células  $\alpha$ -MSH + e em verde, células Fos +. Em detalhes no insert, as duplas marcações  $\alpha$ -MSH + /Fos +. Barra de escala = 200 $\mu$ m e 100  $\mu$ m para o *insert*. Para abreviações consultar lista de abreviaturas.



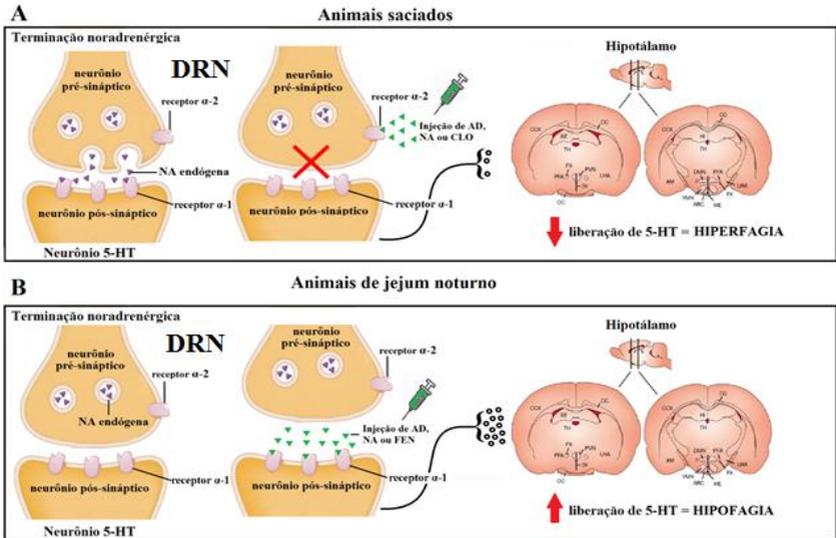
## 5. Discussão

Os resultados do presente estudo revelaram que a administração de AD ou NA no DRN aumentou a ingestão de alimento em ratos saciados. Além disso, tanto a AD quanto a NA afetaram outros aspectos da ingestão alimentar, como a diminuição na latência para iniciar a alimentação, o aumento na frequência dos episódios ingestivos, além da duração total do comportamento. Em ratos submetidos ao jejum noturno a administração de AD ou NA no DRN diminuiu o consumo alimentar, diminuindo também a duração do comportamento ingestivo.

Consistente com dados na literatura que apontam que o sistema noradrenérgico atua regulando a atividade neuronal serotoninérgica no DRN através de receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2 (Adell et al., 2002), a resposta hiperfágica encontrada em animais saciados pode ser devida a uma diminuição na atividade dos neurônios serotoninérgicos através de receptores  $\alpha$ -2 presentes nas terminações noradrenérgicas, diminuindo sua taxa de disparo e consequentemente diminuindo a liberação de 5-HT nas áreas de projeção (Figura 29A). Deste modo, nossa hipótese é que em ratos saciados a ativação da influência inibitória, possivelmente serotoninérgica, seja elevada de modo que predomine a ação da AD ou NA no DRN sobre os receptores  $\alpha$ -2, atuando como auto receptores que controlam a liberação de noradrenalina endógena (Bortolozzi e Artigas, 2003) e suprimindo assim a ação inibitória da 5-HT sobre o comportamento ingestivo. Em contrapartida, sugere-se que em animais submetidos ao jejum essa ativação da influência inibitória esteja reduzida, predominando o efeito das catecolaminas mediado através do receptor  $\alpha$ -1 adrenérgico (Figura 29B). O resultado é a redução da ingestão de alimento por meio da ativação de um tônus inibitório serotoninérgico sobre o consumo alimentar. Neste caso, a AD ou NA injetada no DRN poderia

estar atuando em receptores  $\alpha$ -1, estimulando a liberação de 5-HT nas áreas de projeção e conseqüentemente diminuindo a ingestão alimentar.

Experimentos com agonistas adrenérgicos específicos  $\alpha$ -1 (fenilefrina) e  $\alpha$ -2 (clonidina) reforçam a hipótese. Em animais saciados, a hiperfagia encontrada após a injeção de clonidina no DRN pode ser explicada pela ativação dos receptores adrenérgicos do tipo  $\alpha$ -2, diminuindo a liberação de NA endógena e conseqüentemente diminuindo o tônus inibitório serotoninérgico (Figura 29A). No entanto, as injeções do agonista adrenérgico  $\alpha$ -1 fenilefrina não produziram quaisquer efeitos sobre a ingestão de alimentos. A sugestão é que, em animais saciados, a atividade adrenérgica endógena mediada por receptores  $\alpha$ -1 no DRN esteja elevada e o conseqüente tônus inibitório da 5-HT sobre a ingestão de alimento também elevado devido a uma maior liberação do neurotransmissor nas áreas de projeção. Desse modo, a fenilefrina não consegue se ligar aos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos do DRN por estes já estarem previamente ocupados pela NA endógena. Reforçando esta hipótese, a injeção de fenilefrina em animais submetidos ao jejum noturno, leva a uma hipofagia possivelmente induzida através da ativação dos receptores  $\alpha$ -1 e conseqüente aumento na liberação de 5-HT nas áreas de projeção, inibindo a ingestão alimentar (Figura 29B). Já a injeção de clonidina não produz alterações no comportamento ingestivo quando comparados ao grupo controle, sugerindo que em animais privados de alimento a atividade adrenérgica mediada por receptores  $\alpha$ -1 esteja diminuída assim como o tônus inibitório serotoninérgico sobre a ingestão alimentar.



**Figura 29:** Desenho esquemático ilustrando a hipótese de funcionamento diferencial de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos no DRN em ratos saciados e submetidos ao jejum. A) Animais saciados. Neste caso, a injeção de AD, NA ou CLO ativarão o receptor  $\alpha-2$  levando a uma diminuição na liberação de NA endógena e consequente diminuição na liberação de serotonina no hipotálamo. B) Animais de submetidos ao jejum. Neste caso, a injeção de AD, NA ou FEN ativarão o receptor  $\alpha-1$  levando a uma maior liberação de serotonina no hipotálamo. Fonte: adaptado de Schwartz et al., 2000.

Ao analisarmos os resultados do presente estudo no DRN, encontramos respostas comparáveis àquelas encontradas no MNR sobre a ingestão alimentar (Mansur et al., 2010; Mansur, et al., 2011a; Mansur, et al., 2011b; Ribas, 2012). No entanto, as respostas encontradas no DRN parecem ser mais robustas quando comparas àquelas encontradas no MNR. Ao compararmos a quantidade de alimento ingerido após o tratamento com clonidina 20 nmol no DRN em animais saciados, podemos observar que a quantidade total dobra quando comparada aos experimentos realizados no MNR com a mesma dose da droga (Mansur et al., 2010). Além disso, como mencionado anteriormente, a injeção de NA no DRN provoca uma hiperfagia

significativa em animais saciados, o que curiosamente não é encontrado nos estudos envolvendo o MNR (dos Santos et al., 2009). Um estudo recente de nosso grupo de pesquisa mostrou que a injeção de prazosina, um antagonista  $\alpha$ -1 adrenérgico, no DRN aumentou a expressão da proteína Fos na amígdala basolateral (BLA) e em neurônios orexinérgicos da área hipotalâmica lateral (LHA) (da Silva et al., 2017). No entanto, ao analisarmos no presente estudo o perfil de ativação neuronal hipotalâmico através da expressão de Fos após as injeções de clonidina no DRN em animais saciados, encontramos um aumento de atividade neuronal no ARC e PVN. Por outro lado, não houve diferenças estatisticamente significativas no VMH, na LHA e na BLA. Em conjunto, esses dados indicam que parece existir uma diferença de atuação no controle da ingestão alimentar pelo DRN e o MNR, sendo o primeiro mais relacionado com o controle homeostático do apetite, enquanto que o segundo mais relacionado a aspectos hedonísticos.

Ao identificarmos a assinatura química dos neurônios ativados do ARC, encontramos um aumento na porcentagem de neurônios  $\alpha$ -MSH +/Fos + após a injeção de clonidina em ratos saciados. Como já bem descrito na literatura, o ARC possui neurônios pro-opiomelanocortina (POMC) que produzem o hormônio estimulante de  $\alpha$ -melanócitos ( $\alpha$ -MSH), um agonista endógeno de receptores MC-3/4 que estão amplamente relacionados a efeitos inibitórios sobre o comportamento alimentar (Cone, 2005; Elmquist et al., 1999; Williams e Schwartz, 2005). Além disso, os neurônios POMC do ARC expressam receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>2C</sub> (Heisler et al., 2002) e recebem projeções neuronais oriundas dos núcleos da rafe (Sim e Joseph, 1991, Vertes et al., 1999).

Os receptores 5-HT<sub>2C</sub> exercem um papel crítico na regulação da homeostase energética, onde camundongos deficientes neste tipo de receptor desenvolvem hiperfagia e obesidade (Nonogaki et al., 1998; Tecott et al.,

1995). Estudos eletrofisiológicos dão ainda mais suporte a esta hipótese mostrando que drogas serotoninérgicas, como a d-Fenfluramina, ativam os neurônios POMC via receptores 5-HT<sub>2C</sub> (Heisler, et al., 2002; Qiu et al., 2007; Xu et al., 2008). Além disso, a 5-HT causa a liberação direta de  $\alpha$ -MSH em fatias hipotalâmicas (Tiligada e Wilson, 1989), efeito este desencadeado através de receptores 5-HT<sub>2C</sub> (Heisler et al., 2003). Como já mencionado anteriormente, os efeitos alimentares provocados pela injeção de clonidina no DRN de ratos saciados podem estar ligados a uma diminuição do tônus inibitório serotoninérgico sobre a ingestão alimentar e por consequência uma diminuição na liberação de 5-HT no hipotálamo. Neste caso, esperaríamos encontrar uma menor atividade neuronal no ARC. Porém, o aumento da atividade dos neurônios POMC parece estar ligado ao fato do animal ter ingerido alimento durante o período experimental e não por uma influência direta da droga. A correlação positiva entre a porcentagem de neurônios  $\alpha$ -MSH +/Fos + e a quantidade de alimento ingerido reforça ainda mais essa hipótese.

Em relação aos animais submetidos ao jejum, a injeção de fenilefrina no DRN provocou uma diminuição na expressão de Fos no PVN, sem provocar alterações estatisticamente significativas na expressão de Fos no ARC, mas apresentando uma diminuição na porcentagem de células  $\alpha$ -MSH +/Fos + neste mesmo núcleo. De maneira similar ao encontrado nos animais saciados, a diminuição na atividade de neurônios POMC também parece estar ligada ao consumo alimentar do animal já que a injeção de FEN aumenta o tônus inibitório serotoninérgico. Entretanto, não podemos excluir a hipótese de que as modificações na circuitaria adrenérgica do DRN estejam influenciando as alterações na atividade neuronal nos núcleos hipotalâmicos. Para melhor elucidar essas questões, novos experimentos estão sendo conduzidos em nosso laboratório através de injeções de CLO e FEN no DRN

de ratos saciados e submetidos ao jejum alimentar respectivamente, porém sem que os animais tenham acesso ao alimento no momento do registro comportamental. Desse modo, conseguiremos isolar os efeitos da droga e da ingestão do alimento sobre a atividade neuronal.

Uma importante estrutura hipotalâmica para o controle da ingestão alimentar é o PVN, sendo um dos locais onde a 5-HT atua reduzindo a ingestão de alimentos (Leibowitz e Alexander, 1998; Voigt e Fink, 2015). Assim como o ARC, o PVN também possui receptores serotoninérgicos e injeções de agonistas de receptor 5-HT<sub>1B</sub> no PVN reduzem a ingestão de alimentos (Grignaschi, et al.,1995; Fletcher et al., 1993). Novamente, os efeitos encontrados na expressão de Fos nos animais saciados e de jejum noturno no PVN parecem estar ligados à ingestão alimentar e não ao efeito da injeção das drogas no DRN. Por outro lado, o PVN recebe projeções oriundas do núcleo arqueado (Atasoy et al., 2012; Cone et al., 2001) assim como possui receptores do tipo MC3/MC4 (Kishy et al.,2003; Siljee, et al, 2013). A administração local de agonistas de MC3/MC4 no NPV reduz a ingestão de alimentos, enquanto que a injeção de antagonistas aumenta (Giraud et al., 1998; Kask e Schioth, 2000; Wirth et al., 2001). Baseado nestas informações, o diferente padrão de atividade de neurônios POMC no ARC em animais saciados e de jejum noturno poderiam explicar as alterações de atividade neuronal encontradas no PVN, já que este constitui um circuito neuronal importante na regulação da ingestão alimentar. Ainda que tenhamos encontrado resultados estatisticamente significativos na expressão de Fos no PVN, a distribuição irregular das marcações dentro do núcleo ao longo dos grupos experimentais dificultou a delimitação de uma sub-região específica para estudo. É importante ressaltar que o PVN possui sub-regiões com populações neuronais distintas (Sawchenko et al., 2000), impossibilitando

ainda mais identificação da natureza química da atividade neuronal encontrada.

Nos núcleos da rafe, neurônios serotonérgicos são apenas uma das várias populações de células neuroquímicas observadas. Apesar de um número substancial de neurônios no DNR conter serotonina, a maioria das células são não serotonérgicas (Adell et al, 2002; Leger e Wiklund, 1982; Vertes e Crane, 1997). Um número grande de outros neurotransmissores, tais como GABA, dopamina e glutamato estão presentes nestes núcleos (Adell et al., 2002; Commons et al, 2003; ; Day et al, 2004; Jacobs e Azmitia, 1992). Estudos mostram que neurônios GABAérgicos inibem os neurônios serotonérgicos, diminuindo a liberação de 5-HT (Adell et al., 2002; Forchetti e Meek, 1981). Portanto, não podemos descartar a hipótese de que os efeitos desencadeados através da injeção de agonistas adrenérgicos no DRN possam ser devidos a outros tipos de neurônios não serotonérgicos. Estudos demonstram a presença de receptores adrenérgicos em neurônios GABAérgicos em outras regiões, como no prosencéfalo basal (Holmberg et al., 1999; Midirrousta et al., 2004), e na área tegmental ventral, onde a liberação de glutamato é controlada pré-sinápticamente pelo receptor  $\alpha$ -2 (Jiménez-Rivera, et al., 2012). Além disso, um recente estudo mostrou que neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos do DRN são reciprocamente ativados por mudanças no balanço energético e que a modulação de sua atividade tem efeitos opostos sobre a ingestão alimentar - neurônios GABA aumentam a ingestão, enquanto que neurônios glutamatérgicos suprimem - (Nectow, et al., 2017). No entanto, não existem ainda evidências que mostrem a presença destes receptores adrenérgicos em neurônios GABAérgicos ou glutamatérgicos do DRN.

Os sinais de saciedade de curto prazo oriundos do trato gastrointestinal, como a distensão estomacal e os hormônios intestinais

liberados em resposta as características do bolo alimentar (CCK, PYY, GLP-1), ativam receptores em fibras vagais aferentes e suas projeções terminam em neurônios no NTS (Schwartz et al., 2000). O NTS funciona com um centro integrador de sinais da periferia, redistribuindo essas informações diretamente para outros núcleos envolvidos com o controle da ingestão alimentar, como o ARC e o PVN, ou de forma indireta até o córtex através de estruturas do tronco encefálico como o LC e os núcleos da rafe (Berthoud, 2002; Schwartz et al., 2000). A associação entre os sinais de curto prazo e o tronco encefálico parece estar intimamente relacionada, pois a secção do nervo vago resulta em aumento no tamanho e frequência da ingestão de alimento (Adan et al., 2008; Yang et al 1992). A resposta hipofágica nos animais em jejum noturno foi bem caracterizada, pois houve diminuição da quantidade de alimento ingerido e diminuição na duração da ingestão de alimento. Dessa forma, sugerimos que os adrenocéptores presentes no DRN podem estar associados a circuitos neurais ligados a regulação de curto prazo da ingestão alimentar (Grill, 2010; Smith, 1996), podendo mediar a saciedade induzida por sinais sensoriais ativados durante a passagem dos alimentos ingeridos pelo trato gastrointestinal, caracterizada no presente estudo por uma redução do tamanho e antecipação do término da refeição.

A ingestão de alimento, a distensão gástrica, assim como a saciedade induzida pela CCK, por exemplo, aumentam a expressão da proteína Fos de neurônios catecolaminérgicos no NTS (Monnikes et al., 1997; Willing e Berthoud, 1997) e estimulam a liberação de catecolaminas em áreas de projeção (Buller and Day, 1996). Além disso, estudos mostraram um aumento da expressão da proteína Fos em grupamentos neuronais catecolaminérgicos A2/C2 no tronco encefálico em resposta a peptídeos anoréxicos como a CCK e o PYY (Blevins et al., 2003; Rinaman et al., 1993). Dados recentes de nosso laboratório sugerem que o DRN esteja sob

influência de sinais pós-prandiais gerados durante a alimentação. A injeção intracerebroventricular de AD em ratos saciados resultou em aumento na expressão de Fos e sua co-localização com neurônios 5-HT no DRN de ratos que tiveram acesso ao alimento durante o registro comportamental, fato que não ocorreu nos animais que não tiveram acesso a comida durante o experimento (Flores et al., 2018). Estes resultados sugerem que os neurônios serotonérgicos e não serotonérgicos do DRN são ativados por sinais pós-prandiais em resposta à alimentação. Reforçando essa hipótese, um trabalho recentemente publicado mostrou a atuação do GLP-1 e seus análogos atuando no DRN, induzindo hipofagia e aumentando a atividade elétrica de neurônios serotonérgicos deste núcleo (Anderberg et al., 2017). Neste caso, o circuito neural do DRN poderia estar recebendo sinais de saciedade de curto prazo provenientes da periferia controlando o término da refeição.

A ingestão de água foi significativamente diminuída após a injeção de AD, NA ou FEN no DRN em animais submetidos ao jejum noturno. Estudos mostram que lesões excitotóxicas de neurônios do DRN e MNR aumentam a ingestão hídrica em ratos (Cavalcante-Lima et al., 2005; Olivares et al. 2003), destacando o papel inibitório da 5-HT sobre a ingestão hídrica. Além disso, a depleção específica de serotonina através do uso de PCPA induz efeito dipsogênico em ratos (Reis et al., 1994). Dessa maneira, os efeitos encontrados na ingestão de água em animais de jejum noturno podem estar relacionados com o aumento do tônus inibitório serotonérgico, inibindo a ingestão de água. No entanto, ratos tendem a beber água quando consomem alimentos sólidos e, como resultado, qualquer tratamento que aumente a ingestão de alimento deveria aumentar a ingestão de líquido (Wirtshafter, 2001). Ao correlacionarmos a quantidade de água ingerida com a quantidade de alimento consumido encontrou-se correlações positivas com todas as drogas utilizadas. Neste contexto, a diminuição da ingestão de água

parece estar relacionada com a diminuição do consumo do alimento, e não por uma ação direta da AD, NA ou FEN sobre os neurônios 5-HT.

A análise comportamental incluiu ainda quatro outras categorias comportamentais, denominadas comportamentos não ingestivos, com o intuito de discriminar se os efeitos sobre a ingestão de alimento foram específicos para os tratamentos utilizados ou em decorrência de interferência por outros comportamentos. Manipulações que interferem com o sistema serotoninérgico podem, potencialmente, influenciar inúmeros comportamentos além da ingestão de alimento (Lucky, 1998). Em animais saciados, apenas o comportamento de imobilidade foi alterado pelos tratamentos com NA e CLO, tendo sua duração diminuída. Nos animais de jejum noturno, os tratamentos com AD, NA e FEN também alteraram o comportamento de imobilidade, aumentando sua duração. O mecanismo neuroquímico pelo qual a AD ou NA parecem atuar reduzindo a ingestão do alimento durante a privação alimentar, podem ser atribuídos a uma antecipação dos sinais de saciedade, resultado consistente com o papel inibitório postulado para a 5-HT no controle do comportamento alimentar (Blundell, 1991; Currie e Coscina, 1993; Hutson et al., 1986; Leibowitz et al, 1988; Leibowitz e Alexander, 1998; Wirtshafter e Krebs, 1990; Wisthafter, 2001). Portanto, estes resultados indicam que os tratamentos utilizados podem ter antecipado a sequência comportamental de saciedade, cuja característica principal é o aumento da imobilidade após o consumo alimentar (Halford et al., 1998), induzindo assim o término da refeição.

## 6. Conclusões

Em conclusão, os dados do presente trabalho mostram o papel funcional dos receptores  $\alpha$  adrenérgicos do DRN no controle da ingestão alimentar e sugerem que estes atuem através de mecanismos similares aos encontrados no MRN em trabalhos anteriores. Parece existir uma influência adrenérgica tônica no animal saciado mediada por estes receptores, a qual possivelmente atua sobre o sistema serotoninérgico deste núcleo e inibe o comportamento ingestivo. O efeito hipofágico encontrado após a ativação de receptores  $\alpha$ -1 em ratos submetidos ao jejum noturno reforça a hipótese de que a ativação destes receptores estimula uma influência inibitória sobre a ingestão de alimento, que parece ser menos presente durante a privação alimentar. Além disso, as modificações encontradas na atividade neuronal no PVN e nos neurônios POMC do ARC após as modificações na neurotransmissão adrenérgica no DRN sugerem que este núcleo atue através de mecanismos homeostáticos no controle da ingestão alimentar.



## 7. Referências

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

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

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

ANAND, B. K. E J. R. BROBECK. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.77, n.2, Jun, p.323-4. 1951.

ANDERBERG, R. H.; RICHARD, J. E.; EEROLA, K.; LÓPEZ-FERRERAS, L.; BANKE, E.; HANSSON, C.; NISSBRANDT, H.; BERQUIST, F.; GRIBBLE, F. M.; REIMANN, F.; WERNSTEDT ASTERHOLM, I.; LAMY, C. M.; SKIBICKA, K.P. Glucagon Like Peptide 1 and its analogs act in the Dorsal Raphe and modulate serotonin to reduce appetite and body weight. **Diabetes.** 66(4):1062-1073, 2017.

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

ATASOY, D.; BETLEY, J. N.; SU, H. H.; STERNSON, S.M. Deconstruction of a neural circuit for hunger. **Nature** 488:172–7, 2012.

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

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

BATTERHAM, R.L.; COWLEY, M.A.; SMALL, C.J.; HERZOG, H.; COHEN, M.A.; DAKIN, C.L.; WREN, A.M.; BRYNES, A.E.; LOW, M.J.; GHATEI, M.A.; CONE, R.D.; BLOOM, S.R. Gut hormone PYY physiologically inhibits food intake. **Nature**, 418:650-654, 2002.

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

B EGLINGER, C.; DEGEN, L.; MATZINGER, D.; D'AMOTO, M.; DREWE, J. Loxiglumide, a CCK-A receptor antagonist, stimulates calorie intake and hunger feelings in humans. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 280:1149-1154, 2001.

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

BITTENCOURT, J. C., F. PRESSE, C. ARIAS, C. PETO, J. VAUGHAN, J. L. NAHON, W. VALE E P. E. SAWCHENKO. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol*, v.319, n.2, May 8, p.218-45. 1992.

BLEVINS, J.E.; STANLEY, B.G.; REIDELBERGER, R.D. Brain regions where cholecystokinin suppresses feeding in rats. **Brain Res.** 860:1-10, 2000.

BLEVINS, J.E.; EAKIN, T.J.; MURPHY, J.A.; SCHWARTZ, M.W.; BASKIN, D.G. Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. **Brain Res.**, 993:30-41, 2003.

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

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

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

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

BULLER, K.M.; DAY, T.A. Involvement of medullary catecholamine cells in neuroendocrine responses to systemic cholecystokinin. **J. Neuroendocrinol.**, 8:819-824, 1996.

CALLAHAN, H.S.; CUMMINGS, D.E.; PEPE, M.S.; BREEN, P.A.; MATTHYS, C.C.; WEIGLE, D.S. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 89:1319-1324, 2004.

CAVALCANTI-LIMA et al. Chronic excitotoxic lesion of dorsal raphe nucleus induces sodium appetite. **Braz J Med Biol Res.** 38:1669– 1675, 2005.

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

CLEGG, D. J.; AIR, E. L.; WOODS S. C.; SEELEY, R. J. Eating elicited by orexin-a, but not melanin-concentrating hormone, is opioid mediated. **Endocrinology**, 143:2995- 3000, 2002.

COLLIN, O. M.; BÄCKBERG, O. M.; ONNESTAM, O. K.; MEISTER, O. B. 5- HT1 A receptor immunoreactivity in hypothalamic neurons involved in body weight control. **Neuroreport**, 13: 945-51, 2002.

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

CONE, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. **Nat. Neurosci.** 8, 571–578, 2005.

CONE, R. D.; COWLEY, M. A.; BUTLER, A. A.; FAN, W.; MARKS, D. L.; LOW, M. J. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. **Int J Obes.** 25:S63–7, 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**, 50:1714-1719, 2001.

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

CURRIE, O. P. J.; COIRO, O. C. D.; NIYOMCHAI, O. T.; LIRA, O. A.; FARAHMAND, O. F. Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine: receptor-specific inhibition of NPY-stimulated eating and energy metabolism. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 71: 709-16, 2002.

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

DE LECEA, L., T. S. KILDUFF, C. PEYRON, X. GAO, P. E. FOYE, P. E. DANIELSON, C. FUKUHARA, E. L. BATTENBERG, V. T. GAUTVIK, F. S. BARTLETT, 2ND, W. N. FRANKEL, A. N. VAN DEN POL, F. E. BLOOM, K. M. GAUTVIK E J. G. SUTCLIFFE. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.1, Jan 6, p.322-7. 1998.

DE VRY, J.; SCHREIBER, R. Effects of selected serotonin 5-HT1 and 5-HT2 receptor agonists on feeding behaviour: possible mechanisms of action. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 24: 341-353, 2000.

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.; SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; ELMQUIST, J.K. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. **J. Comp. Neurol.** 402: 442-459, 1998.

ELMQUIST, J.K.; BJORBAEK, C.; AHIMA, R.S.; FLIER, J.S.; SAPER, C.B. Distribution of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **J. Comp. Neurol.** 395:535-547, 1998.

ELMQUIST, J. K.; ELIAS, C. F.; SAPER, C. B. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. **Neuron** 22, 221-232, 1999.

FLINT, A.; RABEN, A.; ASTRUP, A.; HOLST, J.J. Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. **J. Clin. Invest.** 101:515-520, 1998.

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

FLORES, R. A.; da SILVA, E. S.; RIBAS, A. S.; TASCHETTO, A. P. D.; ZAMPIERI, T. T.; DONATO, J. JR.; PASCHOALINI, M. A. Evaluation of food intake and Fos expression in serotonergic neurons of raphe nuclei after intracerebroventricular injection of adrenaline in free-feeding rats. **Brain Res.** 1678:153-163, 2018.

FONBERG, E. Hyperphagia produced by lateral amygdalar lesions in dogs. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, 31:19-32, 1971.

FORCHETTI, C.M.; MEEK, J. L. Evidence for a tonic GABAergic control of serotonin neurons in the median raphe nucleus. **Brain Research**, 206:208-212, 1981.

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

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

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

GANARAJ, B.; JEGANATHAN, P. S. Involvement of basolateral nucleus & central nucleus of amygdala in the regulation of ingestive behaviour in rat. **Indian J Med Res**, 108:98- 103, 1998.

GRIGNASCHI, G.; SIRONI, F.; SAMANIN, R. The 5-hT-1B receptor mediates the effect of d-fenfluramine on eating caused by intra-hypothalamic injection of neuropeptide Y. **Eur J Pharmacol.** 274:221–4, 1995.

GIRAUDO, S. Q.; BILLINGTON, C.J.; LEVINE, A.S. Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. **Brain Res.** 809:302–6, 1998.

GRILL, H. J. Leptin and the systems neuroscience of meal size control. **Frontiers in Neuroendocrinology.** 31: (1) 61-78, 2010.

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

HALFORD, J.C.; BLUNDELL, J.E. Pharmacology of appetite suppression. **Prog. Drug Res.**, 54:25-58, 2000.

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

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

HARROLD, J. A.; DOVEY, T. M.; BLUNDELL, J. E.; HALFORD, J.C.G. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*, 63:3-17, 2012.

HEISLER, L. K.; COWLEY, M. A.; TECOTT, L. H.; FAN, W.; LOW, M. J.; SMART, J. L.; RUBINSTEIN, M.; TATRO, J. B.; MARCUS, J. N.; HOLSTEGER, H. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science* 297, 609–611, 2002.

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

HEISLER, L. K.; COWLEY, M. A.; KISHI, T.; TECOTT, L. H.; FAN, W.; LOW, M. J. Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis. *Melanocortin Syst.* 994:169–74, 2003.

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

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

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

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

HOEBEL, B. G.; TEITELBAUM, P. Weight regulation in normal and hypothalamic hyperphagic rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 61(2): 189-193, 1966.

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

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

HOLMBERG, M.; SCHEININ, M.; KUROSE, H.; MIETTINEN, R. Adrenergic alpha2C-receptors reside in rat striatal GABAergic projection neurons: comparison of radioligand binding and immunohistochemistry. **Neuroscience**, 93:1323–1333, 1999.

HUTSON, P.H.; DOURISH, C.T.; CURZON, G. Neurochemical and behavioural evidence for mediation of the hyperphagic action of 8-OH-DPAT by 5-HT cell body autoreceptors. **Eur. J. Pharmacol.**, 129:347-52, 1986.

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

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

JIMÉNEZ-RIVERA, C. A.; FIGUEROA, J.; VÁZQUEZ, R.; VÉLEZ, M.; SCHWARZ, D.; VELÁSQUEZ-MARTINEZ, M. C.; ARENCIBIA-ALBITE, F. Presynaptic inhibition of glutamate transmission by alpha-2 receptors in the VTA. **European Journal of Neuroscience**, 35:1406–1415, 2012.

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

KASK, A.; SCHIÖTH, H. B. Tonic inhibition of food intake during inactive phase is reversed by the injection of the melanocortin receptor antagonist into the paraventricular nucleus of the hypothalamus and central amygdala of the rat. **Brain Res.** 887:460–4, 2000.

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

KISHI, T.; ASCHKENASI, C. J.; LEE, C. E.; MOUNTJOY, K. G.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. **J Comp Neurol.** 457:213–35, 2003.

KORCZYNSKI, R.; FONBERG, E. Spontaneous locomotor activity and food and water intake in rats with medial amygdala lesions. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, 39:227–40, 1979.

LAVIN, J.H.; WITBERT, G.A.; ANDREWS, J.; YEAP, B.; WISHART, J.M.; MORRIS, H.A.; MORLEY, J.E.; HOROWITZ, M.; READ, N.W. Interaction of insulin, glucagon-like peptide 1, gastric inhibitory polypeptide, and appetite in response to intraduodenal carbohydrate. **Am. J. Clin. Nutr.** 68:591–598, 1998.

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

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

LEIBOWITZ, S. F.; ALEXANDER, J. T. Serotonin in control of eating behavior, meal size and body weight. **Biol. Psychiatry**, 44: 851–864, 1998.

LEIBOWITZ, S.F. Reciprocal hunger-regulating circuits involving alpha- and beta-adrenergic receptors located, respectively, in the ventromedial and lateral hypothalamus. **Proc. natn. Acad. Sci.**, 67: 1063-1070, 1970.

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

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

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

LEVONE, B. R.; CELLA, E. C.; KOCHENBORGER, L.; DA SILVA, E. S.; TASCHETTO, A.P.; MANSUR, S. S.; TERENCE, M. G.; FARIA, M. S.; PASCHOALINI, M. A. Ingestive and locomotor behaviours induced by pharmacological manipulation of alpha-adrenoceptors into the median raphe nucleus. **Neuropharmacology**, 89:136-45, 2015.

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

LUDWIG, D. S.; N. A. TRITOS.; MASTAITIS W. J.; KULKARNI, R.E.; KOKKOTOU, J.; ELMQUIST, B.; LOWELL, J.; FLIER, E.S.; MARATOS-FLIER E. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, 107:379-86, 2001.

MACKENZIE, R.G.; HOEBEL, B.G.; DUCRET, R.P.; TRULSON, M. E. Hyperphagia following intraventricular p-chlorophenylalanine-, leucine- or tryptophan-methyl esters: lack of correlation with whole brain serotonin levels. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 10:951-955, 1979.

MAIDEL, S.; LUCINDA, A.M.; AQUINO, V.W.; FARIA, M.S.; PASCHOALINI, M.A. The adrenaline microinjection into the median raphe

nucleus induced hypophagic effect in rats submitted to food restriction regimen. **Neurosci Letters.**, 422:123–7, 2007.

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

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

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

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

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

MIDIRROUSTA, M.; MAINVILLE, L.; JONES, B. E. Gabaergic neurons with alpha2-adrenergic receptors in basal forebrain and preoptic area express C-FOS during sleep. **Neuroscience**, 129:803–810, 2004.

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

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

MÖNNIKES, H.; LAUER, G.; BAUER, C.; TEBBE, J.; ZITTEL, T.T.; ARNOLD, R. Pathways of Fos expression in locus ceruleus, dorsal vagal complex, and PVN in response to intestinal lipid. **Am J Physiol.**, 273:2059-71, 1997.

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

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

MORAN, T.H.; DAILEY, M.J. Intestinal feedback signaling and satiety. **Physiol Behav.** 105(1):77-81, 2011.

MORAN, T.; SCHWARTZ, G. Neurobiology of cholecystokinin. **Crit. Rev.Neurobiol.** 9: 1-28, 1994.

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

NAKAZATO, M.; MURAKAMI, N.; DATE, Y.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K., MATSUKURA, S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, 409:194-198, 2001.

NASLUND, E.; BOGEFORS, J.; SKOGAR, S.; GRYBACK, P.; JACOBSSON, H.; HOLST, J.J.; HELLSTROM, P.M. GLP-1 slows solid gastric emptying and inhibits insulin, glucagon, and PYY release in humans. **Am. J. Physiol.** 277:910-916, 1999.

NECTOW, A. R.; SCHNEEBERGER, M.; ZHANG, H.; FIELD, B. C.; RENIER, N.; AZEVEDO, E.; PATEL, B.; LIANG, Y.; MITRA, S.;

TESSIER-LAVIGNE, M.; HAN, M. H.; FRIEDMAN, J. M. Identification of a Brainstem Circuit Controlling Feeding. **Cell**, 170, 429–442, 2017.

NONOGAKI, K.; STRACK, A. M.; DALLMAN, M. F.; TECOTT, L. H. Leptinindependent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene. **Nat. Med.** 4, 1152–1156, 1998.

OLIVARES, E.L. ; COSTA-E-SOUSA, R.H. ; CAVALCANTE-LIMA, H.R. ; LIMA, H.R.C. ; CEDRAZ-MERCEZ, P.L. ; REIS, L. C. Effect of electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 36:1709-1716, 2003.

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

ONAGA, T.; ZABIESKI, R.; KATO, S. Multiple regulation of peptide YY secretion in the digestive tract. **Peptide**. 23:279-290, 2002.

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

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

PETROVICH, G. D.; SETLOW, B.; HOLLAND, P. C.; GALLAGHER, M. Amygdalo-hypothalamic circuit allows learned cues to override satiety and promote eating. **J Neurosci**. 22(19):8748-8753, 2002.

QIU, J.; XUE, C.; BOSCH, M. A.; MURPHY, J. G.; FAN, W.; RONNEKLEIV, O. K.; KELLY, M. J.. Serotonin 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons: role in energy homeostasis in females. **Mol. Pharmacol.** 72, 885–896, 2007.

QU, D., D. S. LUDWIG, S. GAMMELTOFT, M. PIPER, M. A. PELLEYMOUNTER, M. J. CULLEN, W. F. MATHES, R. PRZYPEK, R. KANAREK E E. MARATOS-FLIER. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. **Nature**, 380:243-7, 1996.

REIS, L. C.; RAMALHO, M. J.; FAVARETTO, A.L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release. **Proc Nat Acad Sci**. 91:12022– 12026, 1994

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

RINAMAN, L.; VERBALIS, J.G.; STRICKER, E.M.; HOFFMAN, G.E. Distribution and neurochemical phenotypes of caudal medullary neurons activated to express cFos following peripheral administration of cholecystokinin. **J. Comp. Neurol.**, 338:475-490, 1993.

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

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

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

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

SAKURAI, T., A. AMEMIYA, M. ISHII, I. MATSUZAKI, R. M. CHEMELLI, H. TANAKA, S. C. WILLIAMS, J. A. RICHARDSON, G. P. KOZLOWSKI, S. WILSON, J. R. ARCH, R. E. BUCKINGHAM, A. C. HAYNES, S. A. CARR, R. S. ANNAN, D. E. MCNULTY, W. S. LIU, J. A. TERRETT, N. A. ELSHOUBAGY, D. J. BERGSMA E M. YANAGISAWA. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, v.92, n.4, Feb 20, p.573-85. 1998.

SAWCHENKO, P. E.; LY, H. Y.; ERICSSON, A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress, a tale of two paradigms. *Prog Brain Res.* 122:61-78, 2000.

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

SHIMADA, M., N. A. TRITOS, B. B. LOWELL, J. S. FLIER E E. MARATOS-FLIER. Mice lacking melanin concentrating hormone are hypophagic and lean. **Nature**, 396:670-4, 1998.

SHINTANI, M.; OGAWA, Y.; EBIHARA, K.; AIZAWA-ABE, M.; MIYANAGA, F.; TAKAYA, K.; HAYASHI, T.; INOUE, G.; HOSODA, K.; KOJIMA, M. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. **Diabetes**, 50:227-232, 2001.

SILJEE, J. E.; UNMEHOPA, U.A.; KALSBECK, A.; SWAAB, D.F.; FLIERS, E.; ALKEMADE, A. Melanocortin 4 receptor distribution in the human hypothalamus. **Eur JEndocrinol.** 168:361–9, 2013.

da SILVA, E. S.; FLORES, R. A.; RIBAS, A. S.; TASCETTO, A. P.; FARIA, M. S.; LIMA, L. B.; METZGER, M.; DONATO, J. JR.;

PASCHOALINI, M. A. Injections of the of the  $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonist prazosin into the median raphe nucleus increase food intake and Fos expression in orexin neurons of free-feeding rats. **Behav Brain Res.** 324, 87-95, 2017.

SIM, L. J.; JOSEPH S. A. Arcuate nucleus projections to brainstem regions which modulate nociception. **J Chem Neuroanat**, 4:97–109, 1991.

SMITH, G. P. The direct and indirect controls of meal size. **Neurosci Biobehav Rev.** 20: 41-46, 1996.

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

STERNSON, S. M.; EISELT A.K. Three Pillars for the Neural Control of Appetite. *Annu. Rev. Physiol.* 79:13.1–13.23, 2017.

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

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

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

TECOTT, L. H.; SUN, L. M.; AKANA, S. F.; STRACK, A. M.; LOWENSTEIN, D. H.; DALLMAN, M. F.; JULIUS, D. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT<sub>2c</sub> serotonin receptors. **Nature** 374, 542–546, 1995.

TILIGADA, E.; WILSON, J. F. Regulation of alpha-melanocyte-stimulating hormone-release from superfused slices of rat hypothalamus by serotonin and the interaction of serotonin with the dopaminergic system inhibiting peptidergic release. **Brain Res.** 503:225–8, 1989.

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

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

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

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

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

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

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

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

VOIGT, J. P.; FINK, H. Serotonin controlling feeding and satiety. **Behav Brain Res.** 277:14-31, 2015.

WILLING, A.E.; BERTHOUD, H.R. Gastric distension-induced c-fos expression in catecholaminergic neurons of rat dorsal vagal complex. **Am J Physiol.**, 272:59-67, 1997.

WILLIAMS, D. L.; SCHWARTZ, M. W. The melanocortin system as a central integrator of direct and indirect controls of food intake. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 289, R2–R3, 2005.

WIRTH, M. M.; OLSZEWSKI, P. K.; YU, C.; LEVINE, A. S.; GIRAUDO, S. Q. Paraventricularhypothalamic alpha-melanocyte-stimulating hormone and MTII reduce feed-ing without causing aversive effects. **Peptides.** 22:129–34, 2001.

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

WIRTSHAFTER, D.; KREBS, J. Control of food intake by kainite/quisqualate receptors in the median raphe nucleus. **Psychopharmacology**, 101:137-141, 1990.

WREN, A.M.; SMALL, C.J.; ABBOTT, C.R.; DHILLO, W.S.; SEAL, L.J.; COHEN, M.A.; BATTERHAM, R.L.; TAHERI, S.; STANLEY, S.A.; GHATEI, M.A.; BLOOM, S.R. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. **Diabetes**, 50:2540-2547, 2000

WU, Q.; LEMUS, M.B.; STARK, R., BAYLISS, J.A.; REICHENBACH, A.; LOCKIE, S.H.; ANDREWS, Z.B. The temporal pattern of cfos activation in hypothalamic, cortical, and brainstem nuclei in response to fasting and refeeding in male mice. **Endocrinology**, 155(3):840-53, 2014.

YANG, Z.J. et al. Influence of anterior subdiaphragmatic vagotomy and TPN on rat feeding behavior. **Physiol. Behav.**, 51: 919–926. 1992.

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

XU, Y.; JONES, J. E.; KOHNO, D.; WILLIAMS, K. W.; LEE, C. E.; CHOI, M. J.; ANDERSON J. G.; HEISLER, L. K.; . ZIGMAN, J. M.; LOWELL, B. B.; ELMQUIST, J. K. 5-HT<sub>2</sub>CRs Expressed by Pro-Opiomelanocortin Neurons Regulate Energy Homeostasis. **Neuron** 60:582–589, 2008.

ZHANG, J.; RITTER, R.C. Circulating GLP-1 and CCK-8 reduce food intake by capsaicin-insensitive, non-vagal mechanisms. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 302(2):264-73, 2012.