



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**RODRIGO FIGUEIREDO FONTES**

**AÇÃO CENTRAL DA OCITOCINA NO CONTROLE DA  
INGESTÃO ALIMENTAR: INFLUÊNCIA DO CICLO  
ESTRAL**

**ARACAJU**

**2012**

**RODRIGO FIGUEIREDO FONTES**

**AÇÃO CENTRAL DA OCITOCINA NO CONTROLE  
DA INGESTÃO ALIMENTAR: INFLUÊNCIA DO  
CICLO ESTRAL**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Ticona Fioretto

**ARACAJU**

**2012**

**RODRIGO FIGUEIREDO FONTES**

**AÇÃO CENTRAL DA OCITOCINA NO CONTROLE  
DA INGESTÃO ALIMENTAR: INFLUÊNCIA DO  
CICLO ESTRAL**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

**Orientador: Prof. Dr. Emerson Ticona Fioretto**

---

**1º Examinador: Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Junior**

---

**2º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Ting**

**PARECER**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação aos meus pais, meus exemplos de vida, que sempre apoiaram em minhas decisões e me encorajaram a nunca desistir de meus sonhos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado forças em meio as dificuldades encontradas em minha vida e no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, pelo apoio, amor, educação, dedicação, compreensão, incentivo e valores passados ao longo da minha vida.

Aos meus familiares, em especial minha irmã e minha avó, pelos incentivos, compreensão e por valorizarem meu esforço.

Aos meus amigos, pelas palavras e por torcerem por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Emerson Ticona Fioretto, pela amizade e paciência, incentivo e confiança em mim depositados e por me permitir ingressar no mestrado mesmo sem referência alguma sobre mim. Sou eternamente grato por me conceder esta oportunidade.

Ao Prof. Dr. Waldecy de Lucca Junior, por abrir as portas do seu laboratório e permitir o desenvolvimento deste trabalho, pela orientação e incentivo. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Junior, pela compreensão, orientações e apoio material.

Ao Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim, pelas correções e sugestões concedidas.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josemari Melo de Santana, por disponibilizar o criostato do LAPENE (Laboratório de pesquisa em neurociências).

A Profa. Dr<sup>a</sup>. Flávia Teixeira Silva, por ter me fornecido os animais para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Núcleo de Pós-graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe, que contribuíram com minha formação.

Aos alunos do laboratório de biologia celular e estrutural, em especial Saulo, Genilson, Elis, Renan e Tércio, pela ajuda no aprendizado das técnicas básicas do laboratório.

Aos alunos do laboratório de histologia (Daniel, Tamires, Caren, Rafaela, Tauan e Nayane), por se disporem a trabalhar em minha pesquisa e terem me dado a oportunidade de também exercer a função de orientador.

A técnico do laboratório Thiago, por me ajudar no aprendizado das técnicas básicas do laboratório de histologia.

A CAPES, por ter me contemplado com uma bolsa durante o mestrado.

A Sr. Osvaldo, pela educação e por disponibilizar a mim os animais para meu treinamento e material do biotério.

Aos animais, o meu respeito por serem elementos fundamentais para o desenvolvimento e evolução da ciência.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta.

*MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS*

*A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmos sempre depois de cada queda.*

*Confúcio*

## RESUMO

ANÇA CENTRAL DA OCITOCINA NO CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR: INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL, Rodrigo Figueiredo Fontes, Universidade Federal de Sergipe, 2012.

Em adição à estimulação da contração uterina e ejeção de leite, a ocitocina (OT) atua em circuitos neurais que controlam a ingestão alimentar. Este trabalho teve como objetivo investigar a modulação gonadal no controle ocitocinérgico da ingestão alimentar. Ratas Wistar com no mínimo três ciclos regulares monitorados por 15 dias foram submetidas à implantação de cânula no ventrículo lateral. Após a cirurgia, foram acompanhados mais três ciclos e as que permaneceram regulares foram submetidas a jejum por 24 horas e receberam uma microinjeção intracerebroventricular (5  $\mu$ L) de OT (5 UI, 1 g/L) ou de PBS (tampão fosfato salina). Imediatamente após as infusões, foi oferecida ração balanceada e mensurada a quantidade de alimento consumido por 90 minutos. Aproximadamente doze por cento das ratas submetidas à cirurgia de implantação de cânulas alteraram a regularidade do ciclo e permaneceram em fase metaestro, apresentando eventualmente fase diestro. Das trinta e uma ratas submetidas à implantação de cânula no ventrículo lateral, 16 receberam microinjeção (5  $\mu$ L) de PBS e 15 receberam microinjeção (5  $\mu$ L) de OT (5 UI). Após as 24 horas de jejum, as 8 ratas em proestro e as 8 ratas em metaestro apresentaram respectivamente ingestão alimentar média de  $2,45 \pm 0,28$  g/100g e  $2,17 \pm 0,26$  g/100g de massa corpórea durante 90 minutos após a reapresentação da ração, não apresentando diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Das 16 ratas submetidas à microinjeção de PBS, 8 estavam em metaestro e 8 em proestro no dia do experimento. Após as 24 horas de jejum, as 8 ratas em proestro e as 8 ratas em metaestro apresentaram respectivamente ingestão alimentar média de  $2,45 \pm 0,28$  g/100g e  $2,17 \pm 0,26$  g/100g de massa corpórea durante 90 minutos após a reapresentação da ração, não apresentando diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Das 15 ratas submetidas a microinjeção de ocitocina, 7 estavam em metaestro e 8 em proestro. Após o procedimento experimental, as 7 ratas em metaestro e as 8 em proestro apresentaram respectivamente ingestão alimentar média de  $1,21 \pm 0,15$  g/100 g e  $1,61 \pm 0,26$  g/100 g de massa corpórea durante 90 minutos após a reapresentação da ração, apresentando diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Em relação ao processamento da imunofluorescência, evidenciou-se a expressão de c-Fos nos núcleos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) de ratas nas fases metaestro e proestro, respectivamente, microinjetadas (icv) com salina isotônica ou ocitocina nas condições de reapresentação de ração após jejum (24 horas). Desta forma, nossos resultados mostram que a ocitocina apresenta uma ação central no comportamento da ingestão alimentar e que as fases do ciclo estral não modulam a ação inibitória da ocitocina no controle ingestivo.

**Palavras-chave:** Ocitocina, ingestão alimentar, esteroides gonadais.

## ABSTRACT

CENTRAL ACTION OF OXYTOCIN ON THE CONTROL OF FOOD INTAKE: INFLUENCE OF THE ESTROUS CYCLE, Rodrigo Figueiredo Fontes, Federal University of Sergipe, 2012.

In addition to stimulation of uterine contraction and milk ejection, oxytocin (OT) acts on neural circuits that control food intake. This study aimed to investigate the gonadal modulation of ocitocinergic control on food ingestion. Female Wistar rats with at least three regular cycles were monitored for 15 days and underwent implantation of cannula into the lateral ventricle. After the surgery it was accompanied three more cycles and which remained regular, were fasted for 24 hours and received intracerebroventricular microinjection (5  $\mu$ L) of OT (5 UI, 1 g/L) or phosphate buffered saline (PBS). Immediately after the infusions, a balanced ration was offered and measured the amount of food consumed by 90 minutes. Approximately 12% of rats submitted to cannula implantation surgery altered the regularity of the cycle phase and remained at metaestrous, eventually presenting diestrus phase. Thirty-one rats were subjected to implantation of cannulas into the lateral ventricle, 16 have received microinjections (5  $\mu$ L) of PBS and 15 have received microinjections (5  $\mu$ L) of OT (5 UI). After 24 hours of fasting, 8 rats at proestrus showed an average food intake of  $2,45 \pm 0,28$  g/100g, while 8 rats at metaestrous presented an average food intake of  $2,17 \pm 0,26$  g/100g of body mass for 90 minutes after resubmission of chow, no presenting significant differences between groups ( $p < 0,05$ ). Of the 16 rats subjected microinjection of PBS, 8 were at metaestrous and 8 in proestrus on the day of experiment. After 24 hours of fasting, the eight rats in metestrus showed an average food intake of  $2,17 \pm 0,25$  g/100g, while in the proestrus, the eight rats presented an average food intake of  $2,45 \pm 0,28$  g/100g, no presenting significant differences between groups ( $p < 0,05$ ). Of the fifteen rats subjected microinjection of oxytocin, 7 were at metaestrous and 8 in proestrus. After 24 hours of fasting, the 7 rats in metestrus showed an average food intake of  $1,21 \pm 0,15$  g/100 g, while in the proestrus, the 8 rats presented an average food intake of  $1,61 \pm 0,26$  g/100 g of body mass for 90 minutes after reintroduction of food, significant differences between groups ( $p < 0,05$ ). Regarding the processing of immunofluorescence revealed the expression of c-Fos in the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic (SON) of rats in metestrus and proestrus phases, respectively, microinjetadas (icv) with saline or oxytocin in the conditions of representation feed after fasting (24 hours). Thus, our results show that oxytocin has a central action on behavior food intake and that of the phases of the estrous cycle does not modulate the inhibitory action of oxytocin in the control of food intake.

**Keywords:** oxytocin, food intake, gonadal steroids

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principais núcleos hipotalâmicos.....	3
<b>Figura 2.</b> Anatomia do eixo hipotálamo-hipofisário.....	5
<b>Figura 3.</b> Principais neuropeptídios hipotalâmicos e seus receptores.....	9
<b>Figura 4.</b> Neuropeptídios gastrointestinais relacionados à regulação energética....	14
<b>Figura 5.</b> Funções fisiológicas da grelina .....	15
<b>Figura 6.</b> Fatores periféricos da insulina e leptina no controle do balanço energético	20
<b>Figura 7.</b> Antagonismo dos neuromoduladores do apetite .....	22
<b>Figura 8.</b> Fases do ciclo estral.....	24
<b>Figura 9.</b> Curva de variação normal durante o ciclo estral .....	25
<b>Figura 10.</b> Esfregaço vaginal.....	32
<b>Figura 11.</b> Etapas do procedimento cirúrgico da estereotaxia.....	34
<b>Figura 12.</b> Cálculo da ingestão alimentar .....	35
<b>Figura 13.</b> Procedimento de perfusão e fixação .....	36
<b>Figura 14.</b> Criostato Leica CM 1850 .....	37
<b>Figura 15.</b> Microscópio de fluorescência Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Germany ....	39
<b>Figura 16.</b> Grupos experimentais .....	40
<b>Figura 17.</b> Delineamento experimental.....	40
<b>Figura 18.</b> Ingestão cumulativa de ração durante 90 min após a reapresentação da ração em ratas privadas de alimento por 24h.. .....	43
<b>Figura 19.</b> Ingestão cumulativa de ração durante 90 min após a reapresentação da ração em ratas privadas de alimento por 24h.....	44
<b>Figura 20.</b> Ingestão cumulativa de ração durante 90 min após a reapresentação da ração em ratas privadas de alimento por 24h... .....	45
<b>Figura 21.</b> As fotomicrografias mostram a expressão de Fos em secções coronais dos núcleos paraventricular e supraóptico de ratas nas fases metaestro microinjetadas com tampão fosfato salina ou ocitocina nas condições de reapresentação de ração após jejum de 24 horas.. .....	46

**Figura 22.** As fotomicrografias mostram a expressão de Fos em secções coronais dos núcleos paraventricular e supraóptico de ratas nas fases proesto microinjetadas com tampão fosfato salina ou ocitocina nas condições de reapresentação de ração após jejum de 24 horas.....47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACh** - Acetilcolina
- ACTH** – Hormônio adrenocorticotrópico
- ACR** – Núcleo arqueado
- ADH** - Hormônio antidiurético
- AgRP** - Proteína relacionada à agouti
- ANG II** – Angiotensina II
- ANOVA** – Análise de variância
- BSA** – Soro albumina bovina
- CART** - Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
- CCK** – Colecistocinina
- CCK-R** – Receptor de Colecistocinina
- CEPA** - Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
- CRH** - Hormônio liberador da corticotropina
- DMH** - Núcleo dorsomedial hipotalâmico
- E2** – Hormônio estrógeno
- ER- $\beta$**  - Receptor de estrógeno  $\beta$
- FSH** – Hormônio folículo-estimulante
- GABA** - Ácido gama-aminobutírico
- GH** - Hormônio do crescimento
- GHS-R** - Receptor secretagogo de GH
- GI** - Trato gastrointestinal
- GIP** – Peptídio inibidor gástrico
- GLP-1** - Peptídio glucagon like
- HL** - Hipotálamo lateral
- LH** - Hormônios luteinizantes
- ICV** – Intracerebroventricular
- IG** – Ingestão alimentar
- LH** – Hormônio luteinizante
- MCR** – Receptor de melanocortina
- MC1R** – Receptor de melanocortina 1
- MC2R** – Receptor de melanocortina 2

**MC3R** – Receptor de melanocortina 3  
**MC4R** – Receptor de melanocortina 4  
**MC5R** – Receptor de melanocortina 5  
**META** – Metaestro  
**MSH** - Hormônio estimulador de alfa-melanócito  
**NPY** - Neuropeptídeo Y  
**NTS** – Núcleo do trato solitário  
**ORXA** – Orexina A  
**ORXB** – Orexina B  
**OT** – Ocitocina  
**OTR** – Receptor de ocitocina  
**OXM** – Oxintomodulina  
**P4** – Hormônio progesterona  
**PBS** – Tampão fosfato salina  
**PFA** - Área perifornical  
**PO** – Peso inicial da raça  
**POMC** - Pró-opio-melanocortina  
**PRO** - Proestro  
**PP** - Polipeptídeo pancreático  
**PVN** – Núcleo paraventricular  
**PYY** - Peptídeo YY  
**RNA<sub>m</sub>** - Ácido ribonucléico mensageiro  
**SNC** – Sistema nervoso central  
**SNE** – Sistema nervoso entérico  
**SON** - Núcleo supraóptico  
**TSH** – Hormônio tireo-estimulante  
**VMH** - Núcleo ventromedial hipotalâmico  
**VTA** - Área tegmental ventral  
**UFS** – Universidade Federal de Sergipe  
**ul** – Microlitro

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1. ANATOMOFISIOLOGIA DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE .....	3
2.1.1. <i>Sistema porta hipotalâmico-hipofisário</i> .....	5
2.1.2. <i>Adeno-hipófise</i> .....	6
2.1.2. <i>Neuro-hipófise</i> .....	6
2.2. CONTROLE HIPOTALÂMICO DA REGULAÇÃO DO APETITE .....	7
2.3. CONTROLE NEUROENDÓCRINO DA INGESTÃO ALIMENTAR .....	8
2.3.1 <i>Neuromoduladores da fome</i> .....	8
2.3.2.1 <i>Neuropeptídeos orexígenos (NPY e AgRP)</i> .....	9
2.3.2.2 <i>Neuropeptídeos anorexígenos (MSH, POMC e CART)</i> .....	10
2.3.2 <i>Fatores gastrintestinais</i> .....	13
2.3.3 <i>Insulina</i> .....	18
2.3.4 <i>Fatores adipocitários (Leptina)</i> .....	19
2.3.5 <i>Antagonismo dos neuromoduladores do apetite</i> .....	21
2.4 CICLO ESTRAL.....	22
2.5 CONTROLE OCITOCINÉRGICO DA INGESTÃO ALIMENTAR.....	25
2.6 MODULAÇÃO OCITOCINÉRGICA E DE ESTEROIDES GONADAIS NA INGESTÃO ALIMENTAR .....	29
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS .....	32
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	32
4.2.1 <i>Controle do ciclo Estral</i> .....	32
4.2.2 <i>Implantação da Cânula no ventrículo lateral hipotalâmico</i> .....	33
4.2.3 <i>Avaliação da ingestão alimentar</i> .....	34
4.2.4 <i>Perfusão e Crioproteção do Cérebro</i> .....	35
4.2.5 <i>Secções teciduais</i> .....	36
4.2.6 <i>Imunofluorescência</i> .....	37
4.2.7 <i>Aquisição das imagens</i> .....	38
4.2.8 <i>Análise das imagens</i> .....	39
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	39
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41

<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
5.1	INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL NO COMPORTAMENTO INGESTIVO DAS RATAS .....	42
5.2	CONTROLE OCITOCINÉRGICO DO COMPORTAMENTO INGESTIVO.....	43
5.3	EFEITO DE FASES DO CICLO ESTRAL NA MODULAÇÃO OCITOCINÉRGICA DA INGESTÃO ALIMENTAR.....	44
5.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	45
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXO A .....</b>	<b>86</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se evidenciado grandes avanços no conhecimento científico acerca dos mecanismos neuroquímicos envolvidos no comportamento ingestivo, fato que tem levado a melhor compreensão inclusive dos diversos distúrbios bem como impulsionado o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas em diferentes processos fisiopatológicos, a exemplo da obesidade e hipertensão arterial (DOSSAT et al., 2011; KRINGELBACH, et al., 2012; SINCLAIR, et al., 2011).

Em adição às ações conhecidas da OT (ocitocina) como estimulação da contração uterina e ejeção de leite, esta também age como um importante neurotransmissor que participa dos circuitos que controlam a ingestão alimentar. Sua secreção é estimulada pela microinjeção central de colecistoquinina (CCK) e pela distensão gástrica (RENAUD et al., 1987). Para isso, observou-se que com a infusão intravenosa de OT não havia alteração do apetite ao sódio (STRICKER e VERBALIS, 1987) nem quanto a ingestão alimentar (VERBALIS et al., 1986), possivelmente, apenas a OT centralmente liberada atuaria nos circuitos neurais que regulam o apetite ao sódio e a ingestão alimentar.

Deste modo, diversos estudos tem demonstrado que o sistema nervoso central (SNC) integra mecanismos anorexígenos que envolvem a liberação de ocitocina no cérebro a partir de projeções neuronais dos neurônios parvocelulares no núcleo paraventricular (BASKIN, et al, 2010).

Ainda assim, recentes estudos têm investigado o potencial papel dos esteróides ovarianos na modulação do circuito ocitocinérgico, demonstrando variação na liberação de OT no núcleo paraventricular (PVN), núcleo supraóptico (SON), neuro-hipófise, sangue porta-hipofisário e plasma durante o ciclo estral de ratas, acompanhada do aumento da atividade ocitocinérgica durante o proestro (GREER et al., 1986; CROWLEY et al., 1978; SARKAR, GIBBS, 1984; WINDLE, FORSLING, 1993).

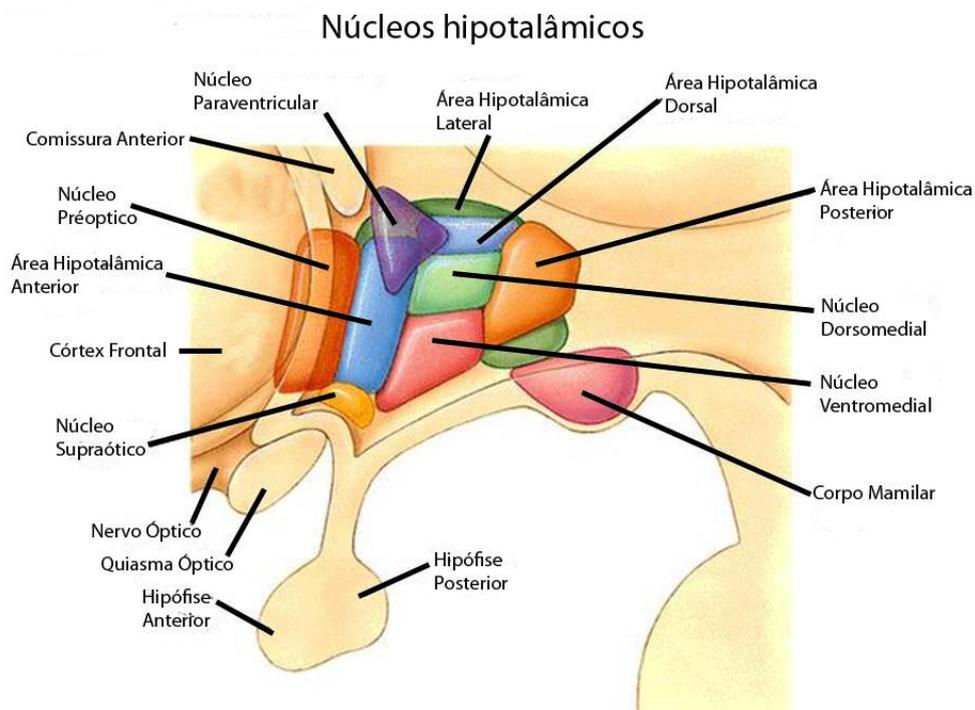
Conforme o exposto, este trabalho propõe estabelecer a possível relação entre a participação dos esteróides gonadais sobre a modulação ocitocinérgica no comportamento ingestivo em modelo animal em diferentes fases do ciclo estral.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Anatomofisiologia do eixo hipotálamo-hipófise

O hipotálamo, anatomicamente, é parte do diencefalo e se dispõe nas paredes do 3º ventrículo, abaixo do sulco hipotalâmico, que o separa do tálamo. Ele representa uma estrutura do sistema nervoso central que está envolvida em uma série de processos fisiológicos, tais como controle da sede, da reprodução, do equilíbrio hormonal, dos ritmos biológicos e o controle da ingestão alimentar. A maior parte de suas funções relaciona-se com a homeostase, ou seja, com a manutenção do meio interno dentro dos limites compatíveis com o funcionamento adequado dos diversos órgãos. Apresenta também grupamentos neurais que se relacionam ao controle da função endócrina, os quais, em conjunto, constituem o chamado hipotálamo endócrino (AIRES, 2008; MACHADO, 2000).

O hipotálamo é formado por mais de 40 núcleos, histologicamente distintos, e áreas que podem ainda ser divididas em diferentes subnúcleos. Seus principais núcleos estão ilustrados na figura 1 (MEISTER, 2007).

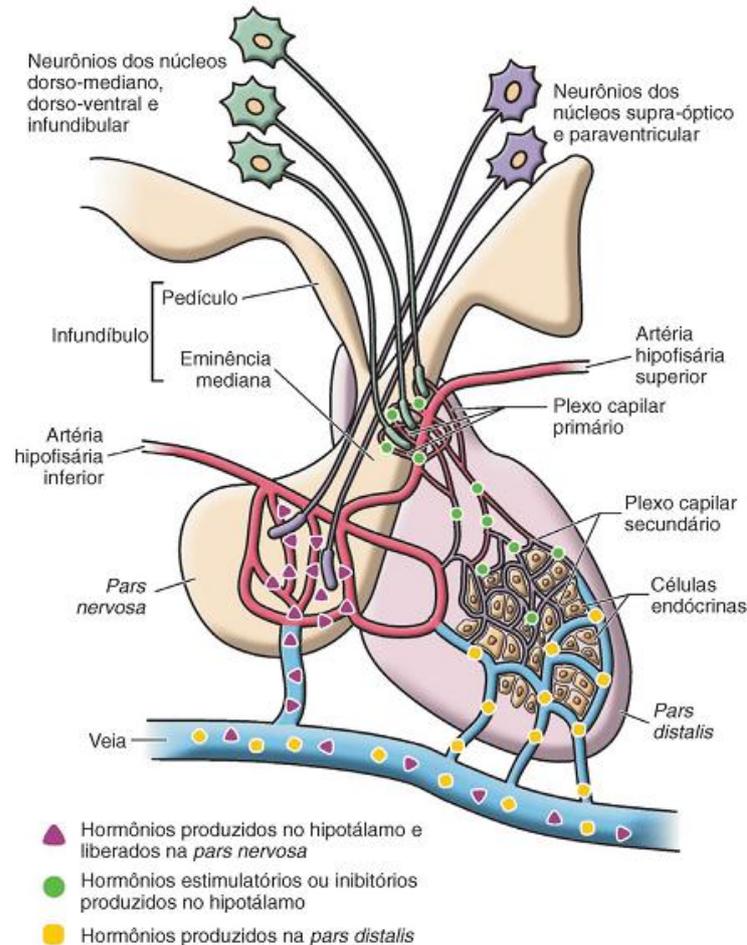


**Figura 1.** Principais núcleos hipotalâmicos (<http://www.sistemanervoso.com/pagina>).

A hipófise, também denominada glândula pituitária, é uma pequena glândula com cerca de 1 cm de diâmetro e peso de 0,5 a 1 g. Localiza-se na sela túrcica, na base do cérebro, e está conectada ao hipotálamo pelo pendúnculo hipofisário. Fisiologicamente, ela divide-se em duas partes distintas: o lobo anterior da hipófise, também conhecido como adeno-hipófise, e o lobo posterior da hipófise, também denominado neuro-hipófise. O lobo anterior da hipófise secreta seis importantes hormônios que desempenham papéis relevantes no controle das funções metabólicas em todo organismo: hormônio do crescimento, adrenocorticotrópico (ACTH), tireo-estimulante (TSH), prolactina, folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Já o lobo posterior secreta dois hormônios: hormônio antidiurético (ADH), também denominado vasopressina e a ocitocina (GUYTON, HALL, 2011).

O hipotálamo e a hipófise funcionam de modo coordenado, comandando a maioria dos sistemas endócrinos. A unidade hipotalâmica-hipofisária regula as funções da tireóide, supra-renal, glândulas reprodutoras, crescimento, produção de leite e a regulação osmótica. Funcionalmente, o hipotálamo controla a hipófise por mecanismos neurais e hormonais (CONSTANZO, 2004).

Quanto a organização do sistema hipotálamo-hipofisário, estes encontram-se conectados, anatomicamente, pela haste hipofisária (infundíbulo) e, funcionalmente, por neurônios provenientes de distintos núcleos hipotalâmicos. Os neurônios parvicelulares se dirigem à rede de capilares presentes na eminência mediana do hipotálamo, que são pertencentes ao sistema porta hipotálamo-hipofisário, e por meio do qual os hormônios por eles produzidos (hormônios hipofisiotróficos) são conduzidos à adeno-hipófise, onde estimulam ou inibem a síntese e secreção dos hormônios hipofisários. Os neurônios magnocelulares se dirigem à neuro-hipófise, onde os hormônios produzidos no hipotálamo (hormônio neuro-hipofisários) ficam armazenados em vesículas de secreção até serem liberados por estímulos específicos que deflagram potenciais de ação nos mesmos (AIRES, 2008). A figura 2 ilustra a anatomia do eixo hipotálamo-hipofisário.



**Figura 2.** Anatomia do eixo hipotálamo-hipofisário (JUNQEIRA, CARNEIRO, 2008)

### 2.1.1. Sistema porta hipotalâmico-hipofisário

O sistema vascular porta-hipotalâmico-hipofisário (ou sistema porta-hipofisário) é responsável pelo transporte de hormônios do hipotálamo para a adeno-hipófise. A vascularização da hipófise é feita pelas artérias hipofisárias superior e inferior (ramos da carótida interna) e por um complexo sistema vascular especializado, denominado de sistema porta hipotalâmico-hipofisário. Através deste sistema, o sangue venoso proveniente da eminência mediana do hipotálamo se dirige à adeno-hipófise, trazendo neuropeptídeos secretados por neurônios hipotalâmicos. O papel destes neuropeptídeos é o de controlar (ativando ou inibindo) a secreção dos hormônios adeno-hipofisários (AIRES, 2008).

### 2.1.2. Adeno-hipófise

A natureza da relação entre o hipotálamo e a hipófise anterior é tanto neural quanto endócrina. O hipotálamo e a hipófise anterior estão ligados diretamente pelos vasos sanguíneos porta hipotalâmico-hipofisários, que fornecem a maior parte do sangue no lobo anterior (CONSTANZO, 2004). A figura 4 ilustra a estrutura e localização da adeno-hipófise e neuro-hipófise.

Os hormônios liberadores ou inibidores de liberação hipotalâmicos são sintetizados nos corpos celulares dos neurônios hipotalâmicos e migram por seus axônios para a eminência mediana do hipotálamo. Quando esses neurônios são estimulados, os hormônios são secretados para o tecido hipotalâmico circunvizinho e entram no plexo capilar adjacente. O sangue desses capilares drena para os vasos porta hipofisários, sendo distribuído diretamente para o lobo anterior da hipófise. Dessa forma, os hormônios hipotalâmicos atuam nas células do lobo anterior, onde estimulam ou inibem a liberação dos hormônios da hipófise anterior. Em seguida, os hormônios da hipófise anterior entram na circulação sistêmica levando-os até seus tecidos-alvo (CONSTANZO, 2004).

### 2.1.2. Neuro-hipófise

A neuro-hipófise é formada basicamente por células do tipo glial, denominadas *pituícitos*. Tais células atuam como estrutura de sustentação para grande número de fibras nervosas terminais e terminações nervosas de feixes nervosos que se originam nos núcleos supra-ópticos e paraventriculares do hipotálamo. Esses feixes chegam à neuro-hipófise passando pelo pendúnculo hipofisário. As terminações nervosas são saliências bulbosas contendo numerosos grânulos secretores, situados sobre as superfícies dos capilares, nos quais secretam os hormônios antidiurético e ocitocina (GUYTON, HALL, 2011).

Os hormônios ADH e ocitocina são sintetizados no pericário das células que constituem os núcleos supra-ópticos (SON) e paraventriculares (PVN), como parte de um pró-hormônio, e armazenados em grânulos, que são transportados por fluxo axoplasmático em direção às terminações nervosas localizadas no lobo neural.

Neste local, permanecem armazenados até que potenciais de ação, gerados nos corpos celulares em resposta a estímulos específicos, provoquem suas liberações (AIRES, 2008).

No interior dos grânulos de secreção, o ADH e a ocitocina encontram-se associados às neurofisinas, às quais se atribui, inicialmente, o papel de proteínas carreadoras destes hormônios. Todavia, atualmente se reconhece que a neurofisina I e a II constituem parte da molécula precursora de ocitocina (pró-oxifisina) e ADH (pró-pessofisina), respectivamente. Assim, as neurofisinas e os neuro-hormônios são codificados no mesmo gene, fazendo parte de um pró-hormônio que é sintetizado nos ribossomos e processados enzimaticamente, dentro dos grânulos, ao longo do trato hipotálamo-neuro-hipofisário. Desse processamento enzimático resulta a liberação do ADH, bem como a ocitocina de suas moléculas precursoras (AIRES, 2008).

## **2.2. Controle hipotalâmico da regulação do apetite**

O hipotálamo apresenta um papel central na regulação do apetite. Ele recebe e integra a entrada de metabólitos, hormônios e fatores neurogênicos sobre o estado nutricional do organismo. Os grandes centros hipotalâmicos para a regulação do apetite são o hipotálamo ventromedial (VMH), responsável pela sensação de saciedade, e o hipotálamo lateral (HL), que inicia a alimentação (GULATI, RAY, 1995).

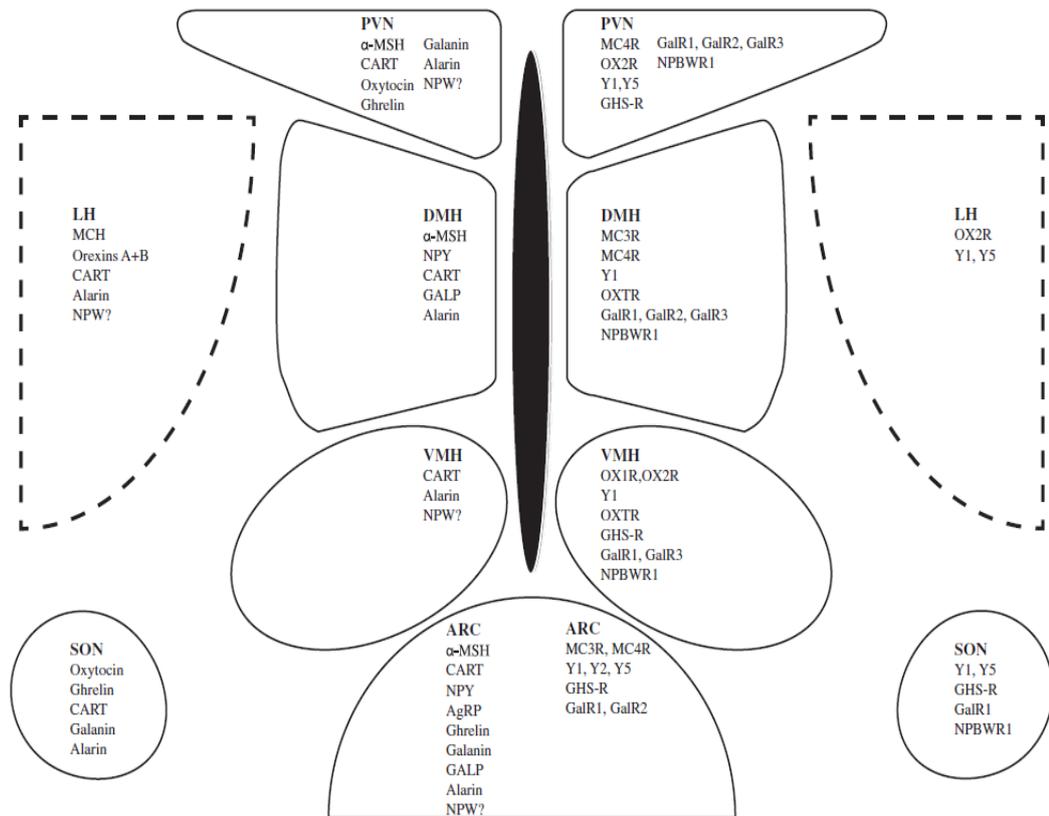
O hipotálamo representa o principal centro no sistema nervoso central para o controle do balanço energético. Dentre os diversos núcleos existentes no hipotálamo, estão associados à regulação do balanço energético e ilustrados na figura 5, o núcleo arqueado, o ventromedial, o dorsomedial e área paraventricular do hipotálamo lateral. Os neurônios localizados nestas regiões produzem mensageiros químicos, que são liberados em seus campos terminais para estimular ou inibir o comportamento alimentar. Os neurônios do hipotálamo produzem mediadores que têm ações orexígenos ou anorexígenos, que são liberados nos campos terminais dentro do hipotálamo, mas também em áreas de projeção em outras regiões da medula, do tronco encefálico, cérebro e medula espinhal (MEISTER, 2007).

### **2.3. Controle neuroendócrino da ingestão alimentar**

O controle da ingestão de nutrientes e o decorrente estado de equilíbrio homeostático dependem de uma série de sinais periféricos que atuam diretamente sobre o sistema nervoso central, levando às respostas adaptativas apropriadas (HALPERN et al., 2004). Tanto o sistema nervoso central (SNC) quanto o entérico (SNE) estão envolvidos na regulação da ingestão alimentar. Estes dispõem de uma infinidade de sensores e receptores, atuando na sinalização entre intestino-cérebro e conseqüentemente na regulação de funções digestivas e da ingestão alimentar. Essa regulação integra um conjunto de sinais neuroendócrinos sensíveis ao estado metabólico e a ingestão calórica do indivíduo. Fazem parte desses sinais neuroendócrinos, os neuromoduladores da fome, fatores gastrointestinais, a insulina e os fatores adipocitários (LEITE, BRANDÃO-NETO, 2009).

#### **2.3.1 Neuromoduladores da fome**

No hipotálamo, em especial no núcleo arqueado, há dois grupos de neuropeptídeos que atuam no controle da fome e do apetite. Estes são chamados orexígenos, quando associados ao estímulo da ingestão alimentar, e anorexígenos, quando associados à inibição do apetite. Compõem o grupo dos neuropeptídeos orexígenos, o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada à agouti (AgRP), enquanto os anorexígenos compreendem o hormônio estimulador de alfa-melanócito (MSH), a pró-opio-melanocortina (POMC) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). Os neurônios que expressam esses neuropeptídeos interagem entre si e com sinais periféricos (a exemplo da leptina, insulina, grelina e glucocorticóides), atuando na regulação do controle alimentar e do gasto energético (GILBERT, BRITO, 2011; HALPERN, et al., 2004; LEITE, BRANDÃO-NETO, 2009; PEREIRA, 2009). A figura 6 mostra a localização de neuropeptídeos e seus receptores dentro do hipotálamo.



**Figura 3.** Principais neuropeptídeos hipotalâmicos e seus receptores (PARKER, BLOOM, 2012).

### 2.3.2.1 Neuropeptídeos orexígenos (NPY e AgRP)

#### NPY

O NPY é o mais abundante neurotransmissor cerebral, sintetizado em diversas áreas, em especial no núcleo arqueado, no qual é co-expresso com a proteína relacionada à agouti (AgRP) (PARKER, BLOOM, 2012). Os neurônios produtores desse neuropeptídeo projetam-se para os neurônios de segunda ordem localizados no núcleo paraventricular (PVN), hipotálamo lateral (HL), área perifornical (PFA), núcleo ventromedial hipotalâmico (VMH) e núcleo dorsomedial hipotalâmico (DMH) sob condições de demanda energética aumentada como a lactação e alguns modelos experimentais de obesidade, além de outras regiões cerebrais, desencadeando a via anabólica (VALASSI et al., 2008).

O NPY, administrado via intracerebroventricular (ICV), apresenta efeito orexígeno quando injetado diretamente no núcleo paraventricular (PVN) promovendo o aumento da ingestão alimentar, inibição da termogênese e adipogênese em ratos (PARKER, BLOOM, 2012; VALASSI ET AL., 2008). Sendo assim, o NPY apresenta um importante papel no sistema orexígeno, promovendo aumento da ingestão alimentar, redução do gasto energético e aumento do peso corporal e da lipogênese em animais. (RODRIGUES et al., 2003).

### **AgRP**

O AgRP é um peptídeo homólogo a proteína agouti que, assim como o NPY, é expresso no núcleo arqueado do hipotálamo. Foi verificado que a super expressão da AgRP leva à obesidade em camundongos. Também considerado um neuropeptídeo orexígeno, ele tem sua produção influenciada pelos níveis séricos de leptina e insulina. O gene do AgRP tem sua expressão inibida pela leptina. No entanto, sua ação é mais prolongada que a do NPY, tendo um potencial terapêutico em doenças como anorexia e outras patologias que causam emagrecimento. Além disso, a proteína agouti é um antagonista endógeno dos receptores da melanocortina (LEITE, BRANDÃO-NETO, 2009).

Evidências demonstram que, assim como o NPY, a administração de AgRP via intracerebroventricular (ICV) ou diretamente no PVN ou DMH, apresenta efeito orexígeno. Excepcionalmente, o AgRP atua como um antagonista endógena no MC3R e MC4R (receptor de melanocortina 3 e 4 respectivamente). O AgRP é orexígeno mesmo na ausência de  $\alpha$ -MSH (PARKER, BLOOM, 2012).

#### **2.3.2.2 Neuropeptídeos anorexígenos (MSH, POMC e CART)**

### **MSH**

As melanocortinas fazem parte de uma família de peptídeos que incluem os hormônios adrenocorticotrópicos e o MSH. Esse último possui efeito na homeostase energética e na ingestão alimentar, em oposição ao NPY e a AgRP (LEITE, BRANDÃO-NETO, 2009).

O hormônio  $\alpha$ -melanócito estimulante ( $\alpha$ -MSH) é um produto de clivagem pós-translacional do gene pro-ópiomelanocortina (POMC) e é expresso no hipotálamo anterior, DMH, PVN, núcleo arqueado e no NTS( núcleo do trato solitário) do tronco cerebral. O  $\alpha$ -MSH apresenta efeito anorexígeno quando injetado no PVN, DMH, e núcleo arqueado, bem como para o quarto ventrículo. Existem dois tipos de receptores de  $\alpha$ -MSH no cérebro: MC3R e MC4R. Dentro do cérebro o MC4R é mais amplamente expresso no hipotálamo (notavelmente no PVN, núcleo arqueado e DMH), amígdala, tálamo, córtex, hipocampo e do tronco cerebral (notavelmente no núcleo dorso motor do vago, NTS e núcleo parabraquial). O MC3R apresenta uma expressão mais limitada, mas é encontrado no hipotálamo, particularmente no núcleo arqueado e DMH, no tálamo, área tegmental ventral (VTA), núcleo da rafe e hipocampo. Embora as evidências sugiram que tanto o MC3R e MC4R possam estar envolvidos na regulação do apetite, o MC4R é geralmente considerado mais importante no presente contexto (PARKER, BLOOM, 2012, 2012).

## **POMC**

A pró-ópiomelanocortina (POMC) é o precursor do MSH. Essa, mediante clivagens gera não apenas o MSH, mas também, anteriormente, o hormônio adrenocorticotrófico e a B-endorfina. A POMC é expressa em vários locais do organismo, como a hipófise, pele, sistema imunológico e sistema nervoso central (núcleo arqueado do hipotálamo e núcleo do trato solitário do tronco cerebral). Neste último, a POMC é sintetizada por neurônios adjacentes àqueles que produzem o NPY no núcleo arqueado (RODRIGUES et al., 2003).

Os peptídeos derivados da POMC agem através da ligação com receptores de melanocortina (MC1R a MC5R), os quais pertencem ao grupo dos receptores ligados à proteína G, com 7 alças trans-membrana, que estimulam a adenilato-ciclase (RODRIGUES et al., 2003). Os receptores de melanocortina também estão presentes na regulação da ingestão alimentar, pois os peptídeos derivados da POMC ligam-se a esses receptores que estão amplamente distribuídos em tecidos periféricos e no sistema nervoso central. O receptor 1 de melanocortina (MC1R) é expresso principalmente na pele e em células mediadoras da inflamação, a exemplo dos monócitos e neutrófilos, enquanto o MC2R é expresso no córtex das adrenais,

sendo o ACTH (Hormônio adrenocorticotrópico) o seu ligante. Os receptores envolvidos na homeostase energética são o MC3 (modula o gasto energético), expressos no núcleo arqueado, e o MC4 (modula a ingestão alimentar), expressos no núcleo paraventricular. A ativação destes dois receptores acoplados à proteína G é antagonizada pelo AgRP. O receptor MC3 é expresso principalmente no sistema nervoso central, mas também na placenta, intestino, timo e adipócitos. O MC3 via MSH é importante para o aumento do gasto energético e lipólise. Assim sendo, uma mutação ou inativação do gene da POMC prejudica essa via catabólica, e leva a diminuição da saciedade, aumento do apetite, aumento da ingestão alimentar e possivelmente obesidade. O MC4 é densamente encontrado no hipotálamo e a ativação desse receptor pelo MSH reduz a ingestão alimentar (BIEBERMANN et al., 2012; RODRIGUES et al., 2003).

Em ratos, um aumento de peso corporal superior a 5% induzida por superalimentação involuntária é seguido por um aumento significativo na expressão POMC e por anorexia. Este padrão é invertido pela administração intracerebroventricular de um antagonista do receptor de melanocortina (VALASSI et al., 2008).

O jejum associado à perda de peso reduz a expressão da POMC e os níveis séricos de leptina. Nesse caso, a sinalização da hipoleptinemia ocasiona a síntese dos orexígenos NPY e AgRP que são antagonistas e por isso reduzem a síntese de POMC e conseqüentemente de MSH. Em consonância, a administração local de leptina reverte esse quadro por meio da estimulação da melanocortina. Portanto, a capacidade dos níveis séricos de leptina sinalizar a produção de NPY\AgRP e a inibição de POMC\MSH, ou vice-versa, a faz desempenhar um importante papel na regulação a longo prazo da ingestão alimentar na via hipotalâmica (LEITE, BRANDÃO-NETO, 2009).

## **CART**

O neuropeptídeo CART, pertencente à via anorexígena, é expresso no núcleo arqueado do hipotálamo, nas mesmas células que expressam a POMC (RODRIGUES et al., 2003). O CART também é expresso no PVN, SON, HL

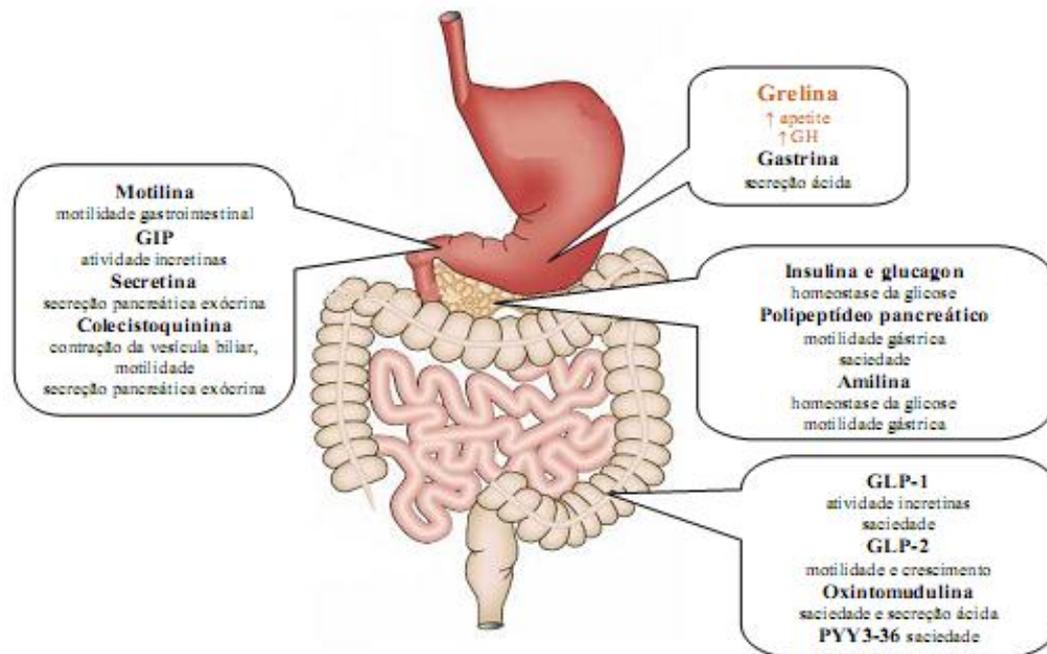
(hipotálamo lateral), VMH e DMH. Este é estimulado pelos neuropeptídios POMC/MSH e inibidos pelos NPY/AgRP (LEITE, BRANDÃO-NETO, 2009). Cerca de 90% dos neurônios CART são co-localizado com os neurônios POMC no ARC (núcleo arqueado) e projetam-se para os neurônios de segunda ordem mediando o efeito anorexígeno da leptina (VALASSI et al., 2008).

O CART, administrado via intracerebroventricular, apresenta efeito anorexígeno. Quando administrado nos ventrículos laterais induz c-fos no PVN e DMH, e em níveis mais baixos no SON e núcleo arqueado. O c-fos também é observado em regiões fora do hipotálamo, tais como a amígdala, parabraquial e NTS (PARKER, BLOOM, 2012).

### **2.3.2 Fatores gastrintestinais**

Os sinais de saciedade são gerados no trato gastrointestinal (GI) durante uma refeição para regular a ingestão alimentar induzindo a uma sensação de plenitude. Depois de entrar no lúmen gastrointestinal, nutrientes provocam a secreção de vários peptídeos que, para além de outras ações, ativam as vias vagais aferentes e simpáticas para o núcleo do trato solitário (NTS) no tronco cerebral caudal, no qual fornecem informações sobre a química e as propriedades mecânicas dos nutrientes. O NTS expressa tanto receptores POMC como leptina, sugerindo que essa área do cérebro, assim como núcleo arqueado, é capaz de integrar saciedade periférica e sinais de adiposidade com informações hipotalâmicas e supra-hipotalâmicas. Estes mesmos peptídeos também alcançam a região posterior do cérebro através da corrente sanguínea e interagem com os receptores locais (VALASSI et al., 2008).

Além dos sinais neuronais provenientes do núcleo arqueado, o núcleo hipotalâmico paraventricular recebe também sinais de outros peptídios relacionados à regulação do apetite, os quais atuam em receptores dos nervos autônomos, e principalmente do nervo vago. Esses peptídios abrangem os fatores gastrintestinais, os quais também interferem na regulação da ingestão alimentar. Nesta classe, destacam-se: a grelina, colecistocinina (CCK), peptídeo YY (PYY), polipeptídeo pancreático (PP), amilina, incretinas (GLP-1 e GIP), oxintomodulina (OXM) e orexinas. A figura 7 aponta suas principais funções (DORNELLES, 2010).



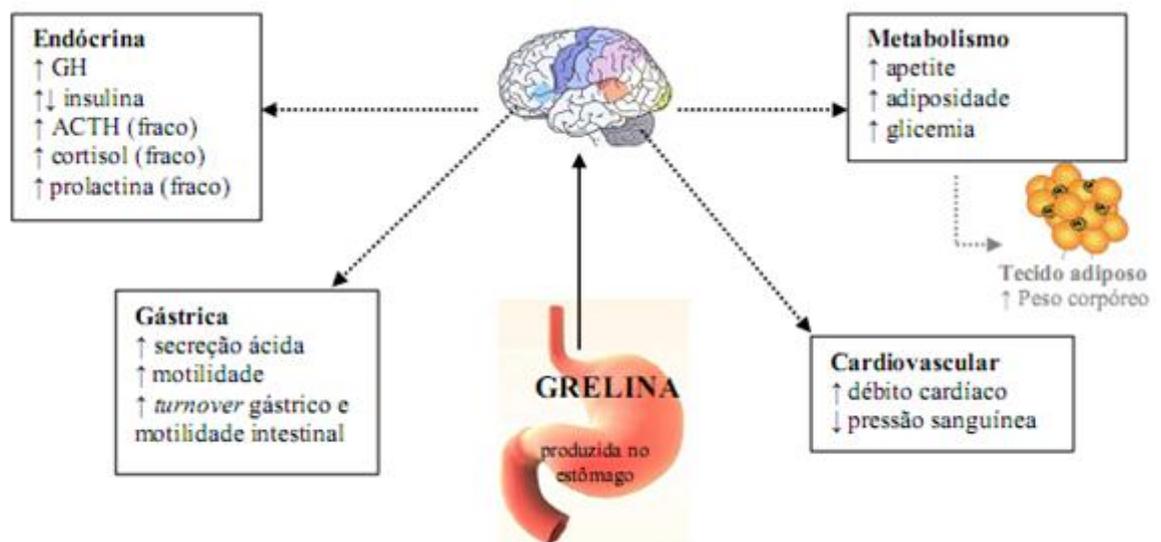
**Figura 4.** Neuropeptídeos gastrointestinais relacionados à regulação energética (DORNELLES, 2010).

## Ghrelina

A ghrelina é um peptídeo, composto por 28 aminoácidos, produzido principalmente nas células endócrinas do estômago, duodeno e em menor proporção no SNC, hipófise, rins, placenta e coração. Este é considerado um dos mais importantes sinalizadores para o início da ingestão alimentar. Sua concentração mantém-se alta nos períodos de jejum e em períodos que antecedem as refeições, caindo imediatamente após a alimentação, sugerindo um controle neural (GILBERT, BRITO, 2011; RODRIGUES et al., 2003).

Em relação a suas funções, a ghrelina é um hormônio peptídico que atua na liberação do GH e como modulador da homeostase energética na regulação da ingestão alimentar. Quanto a ingestão alimentar, ela atua como um “iniciador de refeição”, quando seus níveis se elevam uma a duas horas antes de uma refeição e reduzindo logo após. Ela estimula o apetite através da ativação dos neurônios NPY/AgRP no núcleo arqueado do hipotálamo e sua produção excessiva pode levar à obesidade (RODRIGUES et al., 2003). Além disso, é capaz de proporcionar o

aumento do apetite, estimula as secreções digestivas e a motilidade gástrica e aumentar a secreção do hormônio do crescimento (GH) nas células do hipotálamo e somatotróficas da hipófise, sendo o ligante endógeno para o receptor secretagogo de GH (GHS-R). Esses neurônios produtores de grelina no núcleo arqueado também aumentam a taxa de ácido gama-aminobutírico (GABA) que pode modular uma pós-sinapse para liberar pro-opiomelanocortina (POMC). No núcleo paraventricular (PVN), a grelina após estimular a liberação de NPY suprime a liberação de GABA, resultando na estimulação da liberação dos neurônios que expressam o hormônio liberador da corticotropina (CRH), levando à liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Após a ingestão alimentar, tanto a hiperglicemia pós-prandial como a hiperinsulinemia suprimem a produção de grelina, exercendo um feedback negativo. (GILBERT, BRITO, 2011; WILASCO, 2010). A figura 8 apresenta suas principais funções.



**Figura 5.** Funções fisiológicas da grelina (DORNELLES, 2010).

### **Colecistocinina (CCK)**

A CCK, um hormônio conhecido por estimular as secreções pancreática e biliar, assim como a contração vesicular, também está envolvido no controle da ingestão alimentar a curto prazo. A CCK é secretada pelas células do duodeno e do íleo quando os nutrientes entram na luz e se ligam a receptores específicos (CCK-

1R), localizados em terminais sensoriais vagais e entregam para o NTS uma sensação de saciedade e finalização da refeição. Acredita-se que a distensão gástrica após uma refeição estimule o nervo vago e os nervos espinhais e promovendo a liberação de CCK (CONN, 2003).

Sua ação anorexígena é baseada em seus receptores presentes no hipotálamo que desencadeiam uma cascata de sinais e reações, levando à inibição dos neuropeptídeos orexígenos (NPY e AgRP). A intensidade da resposta depende do conteúdo e densidade calórica dos alimentos, do estado nutricional, e dos níveis plasmáticos de glicose. Sob algumas condições experimentais a CCK exógena elicia saciedade e reduz o tamanho da refeição em diferentes espécies. Com efeito, a infusão intravenosa de doses fisiológicas de CCK-33 reduziu significativamente o tamanho de uma refeição, bem como o grau de fome pós-prandial em seres humanos (LEITE, BRANDÃO-NETO, 2009; VALASSI et al., 2008).

### **Peptídeo YY (PYY) e Peptídeo Pancreático (PP)**

O PYY é um agonista do receptor Y2R que é liberado no trato gastrointestinal no período pós-prandial. Este peptídeo é expresso pelas células da mucosa intestinal, sugerindo uma regulação neural, já que seus níveis plasmáticos aumentam quase que imediatamente após a ingestão alimentar. Ele apresenta grande importância para o término da refeição, pois atua na inibição da atividade dos neurônios NPY/AgRP e estimula as células POMC/CART no núcleo arqueado no hipotálamo. A maior parte dos dados publicados indica que a infusão periférica de PYY3 e 36 reduz a ingestão de alimentos e prolonga intervalos entre refeições em diversos modelos animais. Recentemente, uma deficiência PYY3 e 36 tem sido demonstrada em quadros de obesidade. Outros estudos têm apontado que o efeito anorexígeno do PYY seja principalmente mediado pelo sistema da melanocortina, mediante ação de seus receptores Y2 diretamente sobre os neurônios do NPY inibindo seus efeitos orexígenos (HALPERN, et al., 2004; RODRIGUES et al., 2003; VALASSI et al., 2008).

O PP, da mesma família do PYY, é produzido principalmente no pâncreas, mas também pode ser encontrado no cólon e reto. Igualmente ao PYY, o principal

estímulo para liberação do PP é a ingestão alimentar. Porém, outros estímulos influenciam positivamente sua liberação, como distensão gástrica, tônus vagal, exercício, hipoglicemia e os níveis circulantes de grelina. Ele possui efeito anorexígeno a curto e a longo prazo. Aumenta, portanto, a saciedade e reduz a ingestão alimentar, possivelmente por influenciar na diminuição dos níveis séricos de leptina. Ele também atua retardando o esvaziamento gástrico e a produção de grelina, importante para seu efeito sacietógeno (LEITE, BRANDÃO-NETO, 2009).

### **Amilina**

Amilina é um hormônio pancreático produzido nas células beta e desempenha um papel importante no controle de fluxos de nutrientes mediando uma redução da ingestão de alimentos, retardando o esvaziamento gástrico, e reduz a secreção de glucagon pós-prandial. Estudos recentes fornecem evidência de que a amilina, especialmente quando combinada com outros hormônios anorexígenos (por exemplo, o péptido YY e leptina) apresenta efeitos benéficos a longo prazo sobre o peso corporal (LUTZ, 2009).

### **Incretinas (GLP-1 e GIP) e oxintomodulina (OXM)**

As incretinas, assim como o peptídeo glucagon like (GLP-1) e o peptídeo inibidor gástrico (GIP), são peptídios intestinais secretados em resposta a ingestão de nutrientes (glicose e lipídios) e a liberação de CCK. As incretinas possuem a capacidade de estimular a secreção de insulina na presença de hiperglicemia. O GLP-1 está envolvido na sensibilidade à glicose, redução da secreção de glucagon, no retardamento do esvaziamento gástrico e conseqüentemente na ingestão alimentar. Tanto o GLP-1 como a OXM são produtos do gene do pré-proglucagon, o qual é expresso no sistema nervoso central, no intestino e pâncreas. Ambos são rapidamente liberados após a ingestão alimentar, proporcionalmente à quantidade de calorias consumidas. Também atuam como sinais de saciedade (efeitos anorexígenos) afetando a ingestão alimentar a curto prazo e, possivelmente, influencia o peso corporal a longo prazo (LEITE, BRANDÃO-NETO, 2009).

A OXM foi identificada como um supressor da ingestão alimentar a curto prazo. Este peptídeo é secretado na porção distal do intestino e parece agir diretamente nos centros hipotalâmicos para reduzir o apetite, a ingestão calórica e os níveis séricos de grelina. Também exerce efeitos periféricos sobre o retardo do esvaziamento gástrico, e no pâncreas endócrino, suprime a secreção de glucagon e de insulina, semelhantemente ao GLP-1 (HALPERN, et al., 2004).

### **Orexinas**

A orexina (hipocretina) é um neuropeptídeo produzido a partir de um precursor comum, a prepro-orexina e é subdividido em dois tipos: orexina A e B (ORXA e ORXB). As orexinas são expressas exclusivamente nos neurônios da área lateral do hipotálamo que recebem as informações relativas ao estado interno de estado de energia relativa das áreas hipotalâmicas e extra-hipotalâmica via direta ou indireta das conexões neurais. Os neurônios de orexina projetam-se ao longo do núcleo do tronco do hipotálamo, tálamo, na região anterior do cérebro e da medula espinal. Quanto as suas funções, parecem ter papel essencial no início de uma refeição, induzindo a mastigação, o peristaltismo e as secreções gástricas e intestinais. Sua produção é tão logo inibida quanto o surgimento de sinais que geram saciedade como CCK, PYY, OXM, PP, amilina, além dos sinais pós-prandiais como hiperglicemia, hiperleptinemia e hiperinsulinemia. (RODRIGUES et al., 2003; PARKER, BLOOM, 2012)

### **2.3.3 Insulina**

A insulina desempenha um importante papel no controle do peso corporal e apresenta a função de sinalizador de adiposidade, circula em níveis proporcionais à massa adiposa e atua em receptores hipotalâmicos, em áreas envolvidas no controle da ingestão alimentar interagindo com neurotransmissores e na manutenção da homeostase energética, visto que coordena a utilização e a deposição de ácidos graxos no músculo, fígado e tecido adiposo (LURAS, 2009).

A insulina é produzida pelas células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas em resposta aos níveis plasmáticos dos nutrientes, especialmente a

glicose e a sua concentração sérica também é proporcional à adiposidade. A insulina liga-se a receptores de afinidade específica com a membrana celular da maioria dos tecidos, como músculo, fígado e tecido adiposo, promovendo uma série de reações em cadeia que interagem no controle hipotalâmico provocando uma série de ações biológicas. No músculo, promove a captação de glicose a partir dos estoques de glicogênio. No fígado, inibe a produção e liberação de glicose, bem como promove o estoque de glicogênio. No tecido adiposo, a captação de glicose é estimulada e a liberação de ácidos graxos livres é inibida, afetando diretamente o metabolismo de lipídeos, reduzindo a oxidação de gorduras, por inibir a ação da lipase hormônio-sensível, estimulando o depósito de gorduras por ativação da lipase lipoprotéica (DORNELLES, 2010; WILASCO, 2010).

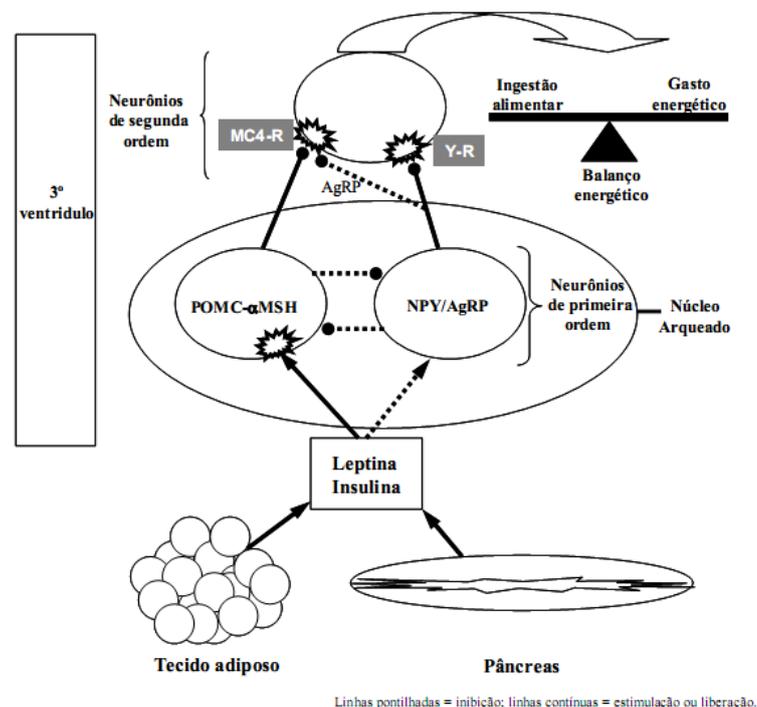
Com seu efeito anabólico, a insulina aumenta a captação de glicose, e a queda da glicemia é um estímulo para o aumento do apetite. Esta também atua como hormônio modulador da ação da leptina. Por outro lado, estudos experimentais demonstram que a insulina tem uma função essencial no sistema nervoso central para incitar a saciedade, aumentar o gasto energético e regular a ação da leptina. A insulina ainda interfere na secreção de entero-hormônios como glucagon like (GLP 1), que atua inibindo o esvaziamento gástrico e, assim, promovendo uma sensação de saciedade prolongada (HALPERN et al., 2004; WILASCO, 2010).

#### **2.3.4 Fatores adipocitários (Leptina)**

A leptina é uma proteína composta por 167 aminoácidos e possui uma estrutura semelhante às citocinas, do tipo interleucina 2, sendo produzida pela glândula mamária, músculo esquelético, epitélio gástrico, trofoblasto placentário e, principalmente, pelo tecido adiposo (ROMERO; ZANESCO, 2006). Os níveis de leptina refletem o estado nutricional e são equiparados com a quantidade de tecido adiposo, apresentando redução de seus níveis assim que o jejum se instala. Esse hormônio atua nos receptores expressos no hipotálamo para promover a sensação de saciedade e regular o balanço energético, estando sua liberação associada com a promoção da saciedade. Sua ação promove aumento da expressão dos neuropeptídeos anorexígenos bem como inibição da formação dos neuropeptídeos orexígenos, como o neuropeptídeo Y (GILBERT, BRITO, 2011). A leptina inibe a

ingestão alimentar e estimula a termogênese, agindo em receptores de várias regiões hipotalâmicas como núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN), hipotálamo lateral (LH), hipotálamo ventromedial (VMH) e dorsomedial (DMH). Diversos trabalhos sugerem que a leptina atua no sistema nervoso central através de mediadores como o neuropeptídeo Y, o peptídeo agouti (AgRP), o hormônio liberador de corticotropina (CRH), o hormônio estimulante dos melanócitos (MSH), a colecistocinina, entre outros. Entretanto, quando em altas concentrações séricas, a leptina não consegue atuar devido à resistência que acaba limitando seu efeito anoréxico (GILBERT, BRITO, 2011; HALPERN, et al., 2004; LURAS, 2009; WILASCO, 2010).

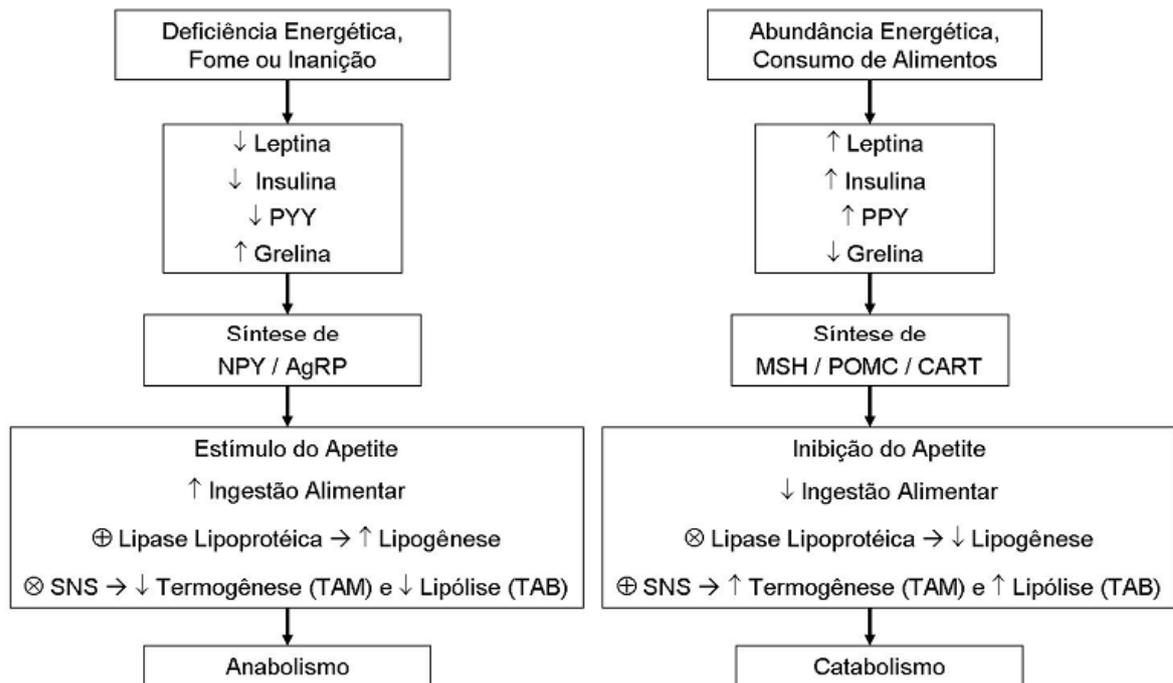
Em condições normais, a ação central da leptina e insulina reduz a expressão de fatores orexígenos como o NPY e a proteína relacionada ao gene agouti (AgRP) e estimula a liberação de fatores anorexígenos como o  $\alpha$ -MSH. Este inibe a ingestão alimentar, através da ativação de receptores de melanocortina MC3 e MC4, sendo este efeito antagonizado pela AgRP (LURAS, 2009). A figura 9 apresenta os fatores periféricos da insulina e leptina no controle do balanço energético.



**Figura 6.** Fatores periféricos da insulina e leptina no controle do balanço energético (LURAS, 2009).

### 2.3.5 Antagonismo dos neuromoduladores do apetite

No hipotálamo, o ARC é a região do sistema nervoso responsável por enviar os neuropeptídios com ações anorexígenas e orexígenas que atuam no controle da fome e do apetite. Os mecanismos de atuação dos neuromoduladores no anabolismo e catabolismo são antagonísticos, interagem entre si e com sinais periféricos na regulação do apetite e do gasto energético. Quando os níveis de leptina estão altos, as moléculas circulantes, liberadas na corrente sanguínea pelos adipócitos, ativam os receptores de leptina em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo. Como resultado desse aumento no sangue, tem-se um aumento da liberação de  $\alpha$ -MSH através de POMC e de CART nos neurônios do núcleo arqueado e inibindo o NPY e o AgRP que leva a um efeito anorexígeno. Em contrapartida, quando há uma queda nos níveis sanguíneos de leptina, a grelina produzida no estômago estimula o sistema nervoso via nervo vago aumentando a expressão gênica dos neuropeptídios orexígenos NPY (neuropeptídio Y) e o AgRP e suprimindo o POMC e o CRH os quais levam a uma ação orexígena. O AgRP e  $\alpha$ -MSH têm efeitos antagonísticos. Ambos ligam-se ao receptor MC4. Enquanto que o MSH é o agonista desse receptor, o AgRP é o antagonista natural, que bloqueia a estimulação por  $\alpha$ -MSH. A ativação de receptores MC4 em neurônios do hipotálamo lateral inibe a ingestão de alimentos, já o bloqueio desses receptores tem efeito contrário. O sistema NPY/AgRP não somente antagoniza células anorexigênicas com melanocortina em seus sítios alvos, nos quais os receptores MC4 estão localizados, como também inibe essas células. Ou seja, um modelo onde os peptídeos gastrointestinais, a leptina e a insulina exercem efeitos regulatórios sobre o hipotálamo; de um lado originando-se dos neuropeptídios NPY/AgRP e, de outro lado, dos POMC e CART, ambos mediados pela atividade da quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) (DORNELLES, 2010; JAEGER, 2005). A figura 10 ilustra o antagonismo dos neuromoduladores do apetite.



**Figura 7.** Antagonismo dos neuromoduladores do apetite (LEITE, BRANDÃO-NETO, 2009).

## 2.4 Ciclo estral

O organismo feminino maduro é tipicamente cíclico, sendo este mecanismo controlado por níveis precisos dos hormônios esteroides sexuais estrógeno (E2) e progesterona (P4), produzidos pelos ovários (SALGADO, 2009).

As variações ocorridas nos diferentes órgãos advêm das oscilações que têm início no hipotálamo. A partir da produção do LHRH, no hipotálamo, a hipófise é estimulada a produzir os hormônios luteinizantes (LH) e folículo estimulante (FSH) que acionam o ovário a produzir o estradiol e a progesterona, que levam o útero a sofrer alterações endometriais de maneira cíclica (UZUELLI, 2006).

O ciclo reprodutivo dos mamíferos não primatas é conhecido como ciclo estral e, no caso de ratas, apresenta duração de 4 a 5 dias. Nestes animais poliétricos, o ciclo estral, do mesmo modo que o ciclo menstrual de mulheres, é marcado por mudanças na estrutura dos órgão genitais e dos tecidos uterinos. Neste ciclo, entretanto, são reconhecidas quatro fases com características morfológicas distintas, as quais podem ser identificadas pelas características do esfregaço vaginal e

morfológicas do útero. As fases do ciclo estral, detalhadas a seguir pelos referidos autores e ilustradas na figura 11, são denominadas proestro, estro, metaestro e diestro, tendo cada fase uma duração média de 24 horas (JÚNIOR, MORATO, 2002; SALGADO, 2009; UZUELLI, 2006).

### **Proestro**

O proestro é uma fase preparatória ou construtiva, caracterizada por um considerável aumento em número de capilares sanguíneos do endométrio. Esta fase corresponde ao pico de ação do estradiol, com células da vagina apresentando-se grandes, nucleadas e ausentes de leucócitos. No esfregaço vaginal são observadas células epiteliais basais e intermediárias. O núcleo destas, por vezes, apresenta-se condensado. Na tarde do proestro ocorre o pico de LH, por volta das 17 horas, sendo acompanhado em horários muito próximos pelo primeiro pico de FSH e pelo pico de prolactina.

### **Estro**

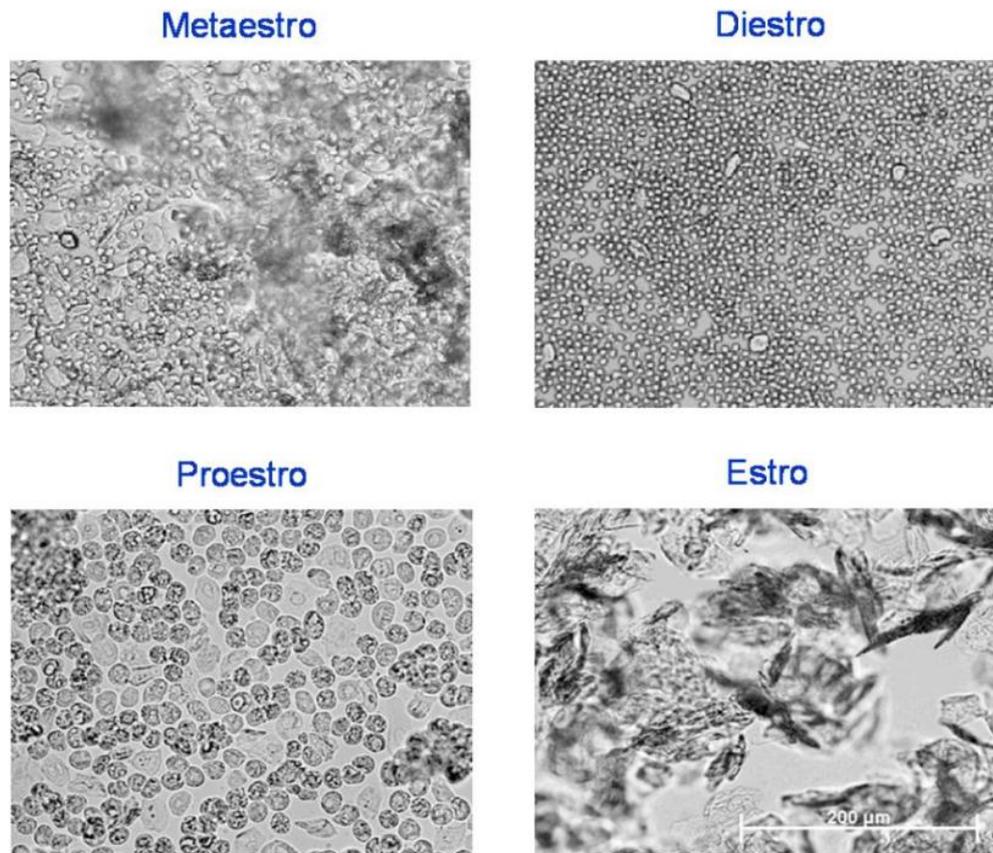
Assim como no proestro, o estro é um período anabólico, sendo esta a fase em que as fêmeas encontram-se receptivas ao macho. Corresponde a ovulação e nesta fase a progesterona encontra-se em seu nível máximo. As células encontram-se anucleadas, isoladas ou em grumos, cornificadas ou queratinizadas e com intensa descamação.

### **Metaestro**

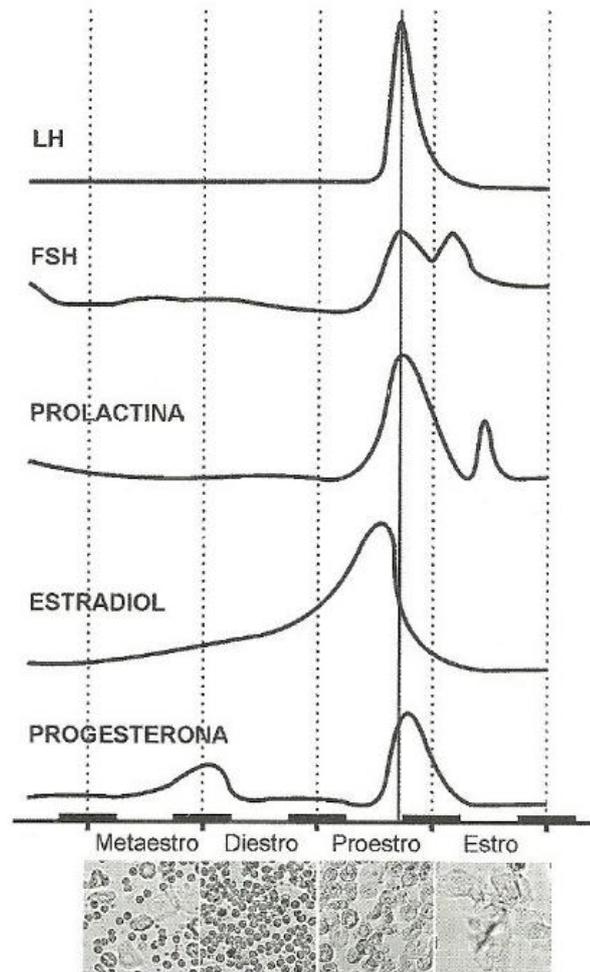
O metaestro é considerado um período catabólico. No útero são observadas muitas células epiteliais glandulares e luminais em mitose, além de uma intensa migração de leucócitos polimorfonucleares através do epitélio luminal. Nesta fase são observadas células anucleadas cornificadas, além de algumas células epiteliais nucleadas e leucócitos. Esta fase pode ser dividida em metaestro I e II.

## Diestro

O diestro é considerado um período quiescente durante o qual ocorre a regeneração do útero através da proliferação e diferenciação dos fibroblastos do estroma endometrial. Corresponde a ação inicial do estradiol sobre o organismo, com os níveis de estradiol correspondente a metade da taxa máxima, não apresentando células descamadas. O esfregaço é caracterizado neste estágio essencialmente pela presença de muco e de leucócitos polimorfonucleares.



**Figura 8.** Fases do ciclo estral (Dr. Raphael Escorsim Szawka)



**Figura 9.** Curva de variação normal durante o ciclo estral (ANTUNES-RODRIGUES, 2005).

A curva de variação hormonal horária no sangue de ratas durante as fases do ciclo estral estão representadas no gráfico da figura 12 demonstrando as variações de prolactina, progesterona, estradiol, LH e FSH. (UZUELLI, 2006).

## 2.5 Controle ocitocinérgico da ingestão alimentar

Estudos em animais demonstram que os neurotransmissores cerebrais e os sistemas de neuropeptídeos desempenham um importante papel na manutenção da ingestão de alimentos e no balanço energético. Entre estes, a ocitocina, um hormônio neuro-hipofisário, é um neuropeptídeo abundante relacionado com a modulação de diversos efeitos centrais e periféricos, incluindo o comportamento alimentar e a osmorregulação (VERTY et al, 2004).

A ocitocina (OT), classicamente conhecida por suas ações na contração uterina durante o parto e ejeção de leite no período de lactação, é sintetizada por neurônios magnocelulares e parvocelulares do núcleo paraventricular (PVN) e do núcleo supraóptico (SON) do hipotálamo. Como neuro-hormônio, a OT é liberada na neuro-hipófise por projeções oriundas do circuito magnocelular. Como neurotransmissor, a OT pode ser liberada na fenda sináptica de neurônios parvocelulares do PVN que projetam seus axônios para muitas áreas no cérebro, principalmente para o tronco encefálico e medula espinal. Essas projeções modulam a responsividade de neurônios do núcleo arqueado às ações da leptina (BLEVINS et al., 2003; BLEVINS et al., 2004) e do núcleo do trato solitário às ações da colecistokinina (BARBERIS, TRIBOLLET, 1996; VRIES, BUIJS, 1983).

Entretanto algumas regiões (amígdala e bulbo olfatório) ricas em receptores para OT não são densamente inervadas por fibras ocitocinérgicas (LENG, LUDWIG, 2006). Por isso, é possível que o aporte de OT oferecido para algumas regiões seja predominantemente oriundo da liberação dendrítica de neurônios magnocelulares. Especula-se que a quantidade de OT liberada pelos dendritos possa difundir-se pelo interstício neuronal até núcleos distantes do local de liberação (DOUGLAS et al., 2007), pois os neurônios magnocelulares do SON, por exemplo, apresentam uma concentração de OT no interstício cerebral de cem a mil vezes maior que no plasma sanguíneo (LENG, LUDWIG, 2006). Além disso, a OT liberada dos dendritos pode persistir por até vinte minutos no interstício cerebral (SABATIER et al., 2003; SABATIER, 2006; CAQUINEAU et al., 2006). Os neurônios ocitocinérgicos liberam grandes quantidades de ocitocina dos seus dendritos e corpos celulares dentro do SON e PVN, sendo que esta liberação dendrítica pode ser regulada independentemente da secreção de axonal e ocorre em resposta à ação da própria OT ou à ativação de receptores para o hormônio alpha-melanócito estimulante (alpha-MSH), um potente anorexígeno cujos proeminentes alvos são os neurônios ocitocinérgicos. Os dendritos dos neurônios magnocelulares são os principais fornecedores de ocitocina no cérebro, e podem ser a principal fonte reguladora da ocitocina no comportamento (DOUGLAS et al., 2007, SABATIER et al., 2007, LENG et al., 2008).

Um alvo provável de ocitocina para a regulação desses comportamentos é o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH). O VMH é um importante centro inibidor de apetite, um mediador de comportamentos sexuais femininos e de receptores do RNAm de ocitocina, sendo uma região onde há diversos sítios de ligação de ocitocina densamente expressos (SABATIER, et al, 2007).

Dessa forma, a liberação de OT pode ser controlada por dois circuitos diferentes: um parvocelular acionado por disparo de potencial de ação para controlar a liberação de OT em fendas sinápticas e outro magnocelular acionado pela ativação de receptores para alpha-MSH que recrutam segundo mensageiro para controlar a liberação de OT, como neuro-hormônio, dos dendritos para o interstício cerebral. Ambos os neurônios, magno e parvocelular, expressam a proteína Fos em resposta tanto aos estímulos que induzem a ingestão de sódio (ANG II) (ROESCH et al., 2001) como aos estímulos que induzem a ingestão de alimentos (CCK) (OLSON et al., 1992).

Quando liberada no cérebro a ocitocina atua em seus receptores específicos (OTRs). O OTR é um receptor acoplado a Proteína-G da proteína à qual se liga a ocitocina com afinidade nanomolar, sendo expressa não apenas em locais periféricos, como o útero durante a gravidez e o mioepitélio mamário em lactação, mas também em muitos locais no SNC, como o tronco cerebral (Núcleo do trato solitário e ventrolateral), nas regiões límbicas (amígdala e septo) e no hipotálamo, onde eles são mais densamente expressos no SON, PVN e VMH (DOUGLAS et al, 2007, LENG et al, 2008, KING, 2006; MCCLELLAN et al., 2006).

Centralmente liberada, a ocitocina após ligar-se aos seus respectivos receptores acoplados a proteína-G, modulam comportamentos sexuais, sociais e ingestivos. Além disso, a ocitocina microinjetada centralmente reduz o tempo de ingestão de alimentos e aumenta significativamente a latência para comer, em ratos privados de alimentos. Ela também desempenha um papel importante na mediação da osmolalidade e hiperosmolalidade, estimula a administração da liberação de ocitocina e quando administrada centralmente reduz o apetite por sal em ratos sem afetar os mecanismos sensores de sódio. A administração de ocitocina reduz o

consumo de água ao se ligar a receptores de ocitocina no hipotálamo, particularmente no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (VERTY et al., 2004).

Diversos estudos experimentais evidenciam que a ocitocina modula o comportamento alimentar em roedores. Estes estudos apontam que microinjeções intracerebroventriculares (icv) de OT, bem como pequenas doses de seu agonista, em ratos jejuados inibem a ingestão de alimentos e de líquidos, como também modulam a ingestão de sal durante a desidratação, hipovolemia e / ou hipernatremia, comprovando seu efeito na regulação do apetite. Entretanto, essa inibição é revertida pela prévia microinjeção de seu antagonista (ornitina vasotocina) (RENAUD et al., 1987; OLSON et al., 1991, SINCLAIR, et al, 2010). Como a infusão intravenosa de OT não altera o apetite ao sódio (STRICKER, VERBALIS, 1987) nem a ingestão alimentar (VERBALIS et al., 1986), possivelmente, apenas a OT centralmente liberada atue nos circuitos neurais que regulam o apetite ao sódio e a ingestão alimentar.

Dentre os marcadores que expressam atividade neuronal destaca-se o c-Fos. A expressão da proteína c-Fos é avaliada imunocitoquimicamente em células cerebrais como um marcador de ativação neuronal relacionada com tratamentos farmacológicos e fisiológicos que são conhecidos para alterar a ingestão de alimentos e a motilidade gástrica em ratos. A expressão de c-Fos em resposta a cada tratamento foi analisada no complexo dorsal do tronco cerebral vagal, no sistema límbico, e pelo hipotálamo, representando as áreas que poderiam estar envolvidas na coordenação das respostas autonômicas, comportamentais e neuroendócrinas que ocorrem durante as condições de estimulação ou inibição da ingestão de alimentos. Em contraste, a inibição fisiológica da ingestão de alimentos resultante da ingestão espontânea de alimentos não causa ativação significativa de c-Fos nestas regiões do cérebro anterior, nem tratamentos que estimularam a ingestão de alimentos (HOFFMAN, G.E.; SMITH, M.S.; VERBALIS, 1993; OLSON et al., 1993).

Apesar das evidências no papel de ocitocina na mediação e ingestão de alimentos e líquido, os mecanismos pelos quais este neuropeptídeo afeta o comportamento ingestivo ainda não é completamente compreendido.

## **2.6 Modulação ocitocinérgica e de esteróides gonadais na ingestão alimentar**

Recentes estudos têm investigado o papel dos esteróides ovarianos na modulação do circuito ocitocinérgico, mostrando a variação da liberação de OT no PVN, SON, neuro-hipófise, sangue porta-hipofisário e plasma durante o ciclo estral de ratas, acompanhada do aumento da atividade ocitocinérgica durante o proestro (GREER et al., 1986; CROWLEY et al., 1978; SARKAR, GIBBS, 1984; WINDLE, FORSLING, 1993).

Além dessas variações da síntese de OT no ciclo estral, a expressão de seu RNAm em neurônios magnocelulares do PVN aumenta no início da puberdade, diminui após a castração (MILLER et al., 1989) e varia também durante o ciclo estral (VAN TOL et al., 1988), sugerindo uma possível ação do estrógeno na sua expressão. De fato, vários trabalhos indicam uma provável modulação dos esteróides gonadais sobre a secreção de OT. A administração de estrógeno estimula a liberação periférica de OT, aumenta a atividade elétrica e altera a organização estrutural de corpos celulares e dendritos de neurônios ocitocinérgicos (AMICO et al., 1981; NEGORO et al., 1973; CALDWELL et al., 1988). Porém, apesar da associação de estrógeno com progesterona potencializar a secreção de OT em resposta à hipertonicidade, o aumento da secreção de OT na tarde de proestro parece não depender da ação direta de estrógeno e progesterona, mas provavelmente de algum outro fator de origem ovariana (CALIGIONI, FRANCI, 2002). Assim, parece haver duas vias distintas para o controle da secreção de OT, uma em função de alterações hormonais durante o ciclo estral e outra em função de alterações da osmolalidade plasmática. Porém, não se pode descartar alguma possível interação dessas duas vias (CALIGIONI, FRANCI, 2002). Os prováveis mecanismos ou vias pelos quais os esteróides gonadais modulam os neurônios ocitocinérgicos não são conhecidos.

Desta forma, tendo em vista as evidências acerca das ações da OT na ingestão alimentar e a possível modulação gonadal dos circuitos neurais envolvidos no controle ingestivo, o presente trabalho tem o objetivo de investigar a participação

dos esteróides gonadais sobre a modulação ocitocinérgica da ingestão alimentar em diferentes fases do ciclo estral.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar a participação dos esteróides gonadais na modulação ocitocinérgica da ingestão alimentar em diferentes fases do ciclo estral.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- I) Verificar a influência do ciclo estral no comportamento ingestivo;
- II) Caracterizar o efeito da microinjeção de ocitocina no comportamento alimentar;
- III) Caracterizar o efeito de fases do ciclo estral na modulação ocitocinérgica da ingestão alimentar;
- IV) Quantificar a intensidade de ativação de áreas encefálicas envolvidas com a modulação ocitocinérgica da ingestão alimentar.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais utilizados

Foram utilizadas ratas Wistar pesando cerca de 200 g provenientes do Biotério Central do Campus de São Cristóvão da Universidade Federal de Sergipe. As ratas foram mantidas no Biotério do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe durante uma semana para ambientação mantendo-se ciclo claro-escuro de 12/12 h (claro das 6:00 hs às 18:00 hs), à temperatura controlada de +/- 21°C e acesso livre à ração balanceada e água. Todos os procedimentos experimentais aos quais os animais utilizados neste estudo foram submetidos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe, segundo o protocolo de número 33/2009 (ANEXO A).

### 4.2 Protocolo Experimental

#### 4.2.1 Controle do ciclo Estral

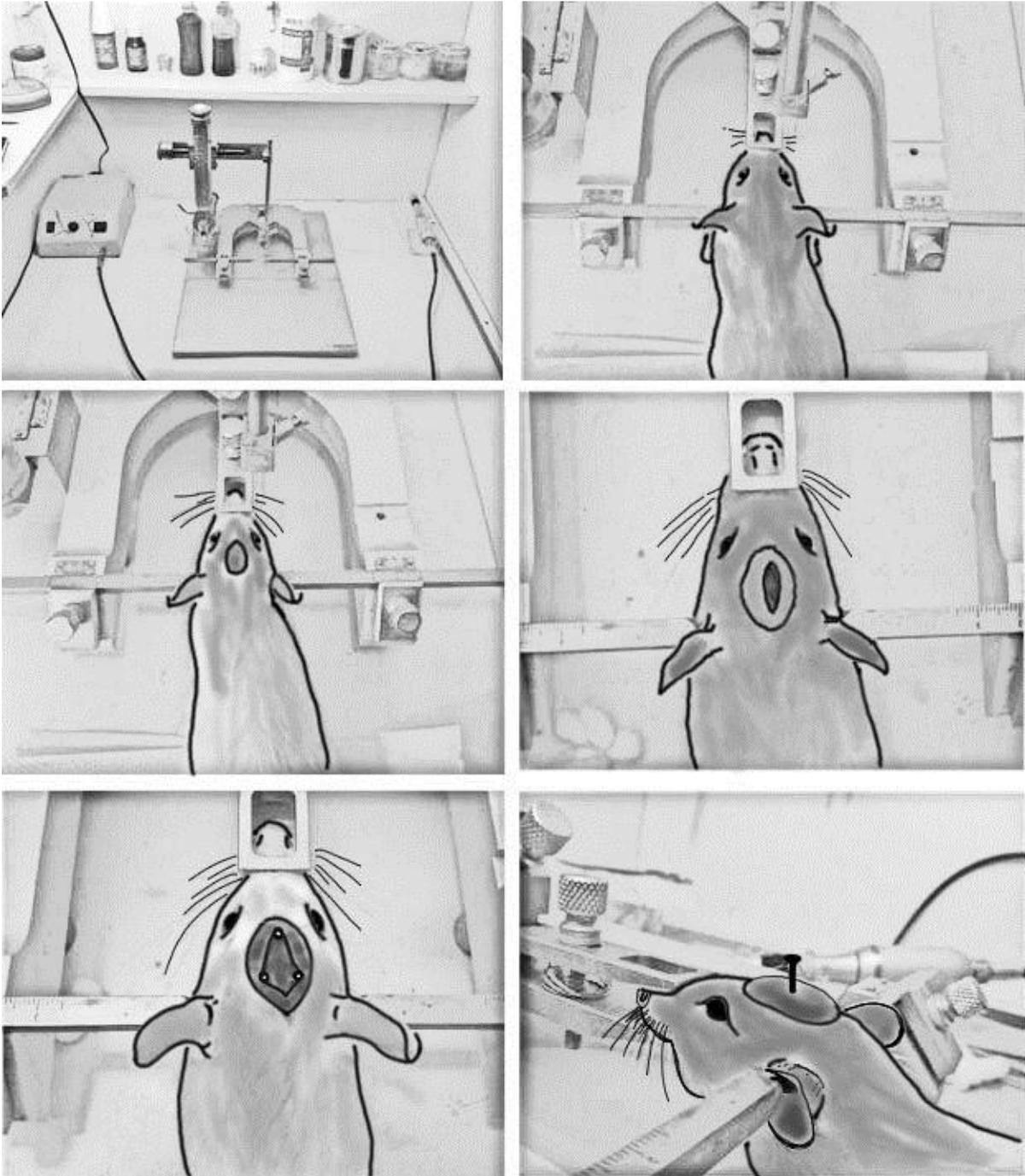
O ciclo estral das ratas foi monitorado diariamente por um período de 15 dias consecutivos às 08:00h utilizando a técnica do esfregaço vaginal descrita por Marcondes et al. (2002). Esta técnica consiste em retirar uma amostra da secreção vaginal, com auxílio de uma pipeta contendo solução salina, montada em lâmina e analisada em microscopia de luz. Apenas os animais que apresentaram pelo menos três ciclos regulares (três estros) foram utilizados nos experimentos. As ratas que apresentaram-se desregulares, antes ou após a cirurgia estereotáxica, foram descartadas. A figura 13 demonstra o procedimento do esfregaço vaginal.



**Figura 10.** Esfregaço vaginal

#### **4.2.2 Implantação da Cânula no ventrículo lateral hipotalâmico**

As ratas que apresentaram 3 ciclos estrais regulares (cerca de 60% das ratas) foram submetidas a cirurgia para implantação de cânula-guia para administração de drogas icv. As ratas foram anestesiadas com uma injeção intraperitoneal (1 mL / 100 g de peso corporal) de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) diluídas em salina isotônica (NaCl 0,15 M) e posicionadas no aparelho estereotáxico para a implantação de uma cânula intracerebroventricular (icv) permanente no ventrículo lateral. As seguintes coordenadas estereotáxicas foram utilizadas para a implantação da cânula: 0,07 mm posterior ao bregma, 0,18 mm latero-lateral e 0,3 mm dorso-ventral a partir da calota óssea. Após as cirurgias, as ratas receberam uma injeção intramuscular (0,1 mL) profilática de antibiótico (pentabiótico veterinário contendo 24000 unidades de Penicilina e 10 mg de Estreptomicina e Diidroestreptomicina - Wyeth), uma dose de analgésico (Banamine® injetável pet - 1 mg/kg - Schering) e permaneceram isoladas em temperatura ambiente (25°C) até a recuperação da anestesia e posteriormente foram levadas às suas respectivas gaiolas no Biotério de manutenção do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe. A figura 14 demonstra as etapas do procedimento da cirurgia estereotáxica.



**Figura11.** Etapas do procedimento cirúrgico da estereotaxia

#### **4.2.3 Avaliação da ingestão alimentar**

Após sete dias de recuperação da cirurgia de canulação, as ratas foram acompanhadas por mais três ciclos estrais, sendo que, apenas as ratas que mantiveram-se regulares seguiram no estudo e foram submetidas a jejum por 24 horas. Após o período de jejum, as ratas que estavam nas fases metaestro e proestro, respectivamente com menor e maior concentração de estrógeno,

receberam às 7 h da manhã uma microinjeção (5 uL) de OT (5 UI, 1 g/L - Novartis) ou de PBS no ventrículo lateral. Imediatamente após as infusões, foi oferecido acesso à ração balanceada e mensurada a quantidade de alimento consumido durante 90 minutos por animal após a reapresentação do alimento. A ingestão alimentar em grama de ração/100 g de massa corpórea foi calculada por meio da seguinte fórmula ilustrada na figura 15:

$$IG = \frac{Po - P}{PA} \times 100$$

**Figura 12.** Cálculo da ingestão alimentar

Sendo:

IG = Ingestão alimentar

PA = Peso do animal (g)

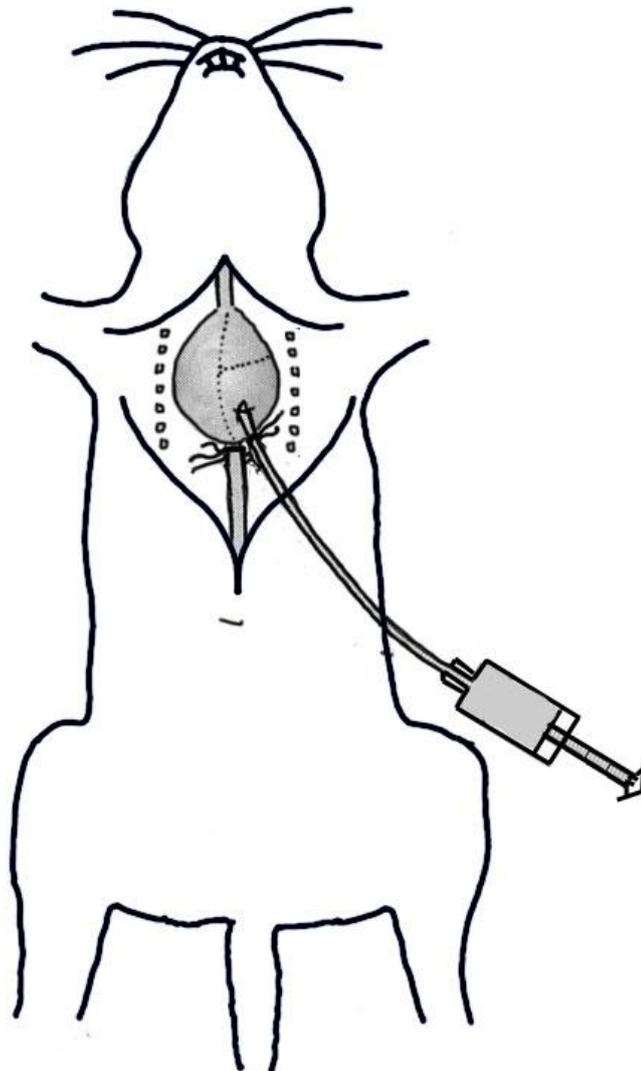
PO = Peso inicial da ração (g)

P = Peso final da ração (g)

Determinados o cálculo da ingestão alimentar por animal foi estabelecida a média geral de consumo e a média entre os grupos experimentais e controle.

#### **4.2.4 Perfusão e Crioproteção do Cérebro**

Passados o período de acesso à alimentação, as ratas foram anestesiadas com uma injeção intraperitoneal (1 mL / 100 g de peso corporal) de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) diluídas em salina isotônica e submetidas a perfusão realizada por meio de infusão intracardíaca (12,5 mL / minuto) de solução salina isotônica por 5 minutos seguida de formalina 10% por 40 minutos. Por seguinte, foram retirados os cérebros, realizada a pós-fixação por 2 horas em solução de formalina 10% e posteriormente crioprotetidos em solução de sacarose 30% tamponada até a completa precipitação do tecido (24 a 48 horas). A figura 16 mostra o procedimento de perfusão e fixação do cérebro.



**Figura 13.** Procedimento de perfusão e fixação

#### **4.2.5 Secções teciduais**

Após a completa crioproteção dos cérebros, estes foram levados ao criostato (Leica CM 1850, ilustrado na figura 17) à  $-20^{\circ}\text{C}$  para obtenção de quatro séries de secções com  $20\ \mu\text{m}$ , as quais foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas, e processadas através da técnica de imunomarcção da proteína Fos, enquanto as demais séries foram congeladas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As secções da região cerebral analisada continham os núcleos paraventricular e supraóptico.



**Figura 14.** Criostato Leica CM 1850

#### **4.2.6 Imunofluorescência**

Todas as secções cerebrais foram processadas à temperatura laboratorial controlada (22°C).

As secções foram inicialmente lavadas (cinco vezes por cinco minutos cada lavagem em constante agitação) em tampão (pH 7,4) fosfato (100 mM) salina (0,15 M) (PBS) após cada etapa de exposição aos reagentes.

A exposição aos reagentes iniciou com a glicina 0,01 M diluída em PBS por dez minutos para redução da autofluorescência do tecido provocada pela exposição ao formalina 40%. Novamente lavadas cinco vezes por cinco minutos cada com PBS. Em seguida, as ligações para gamaglobulina foram bloqueadas com albumina bovina (BSA) 1% em PBS por 30 minutos.

Após a realização dessas etapas para bloqueio de reações inespecíficas, iniciou-se as incubações com o anticorpo primário por 16 horas e secundário por duas horas nas secções cerebrais.

Para imunolocalização da proteína Fos, as secções cerebrais foram incubadas com o anticorpo policlonal produzido em coelho, específico contra a proteína FOS diluído 1/1000 em PBS e BSA (SC 52, Santa Cruz Biotechnologies - USA).

Em seguida, após mais cinco lavagens com PBS por cinco minutos cada, os cortes foram expostos ao segundo anticorpo ( anti-IgG de coelho produzido em jumento e conjugado com Alexa Fluor 594) diluído 1/1000 em PBS por duas horas.

Após o término do processo imuno-histoquímico, as lâminas passaram por mais cinco lavagens com PBS por cinco minutos cada, em seguida passadas na água destilada para retirar o excesso de sal e finalmente montadas com fluoromount-G (Eletron microscopy science - USA) para posterior análise.

#### **4.2.7 Aquisição das imagens**

As secções cerebrais contendo neurônios marcados positivamente para Fos no PVN e SON, foram examinadas através de um microscópio de fluorescência com câmera digital (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Germany, ilustrado na figura 18) e fotografadas bilateralmente. As regiões cerebrais foram identificadas e classificadas de acordo com o Atlas Paxinos & Watson 1997.



**Figura 15.** Microscópio de fluorescência Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Germany

#### **4.2.8 Análise das imagens**

Os núcleos paraventricular e supraóptico foram identificados no hipotálamo de acordo com a descrição de Paxinus (por referência).

#### **4.3 Delineamento experimental**

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a fase do ciclo estral em metaestro ou proestro, respectivamente com menor e maior concentração de estrógeno. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos: Grupo controle, microinjetado com salina (Metaestro – salina e Proestro – salina) e grupo experimental, microinjetado com ocitocina (Metaestro – ocitocina e Proestro – ocitocina). As figuras 19 e 20 apresentam respectivamente os grupos experimentais e o delineamento experimental

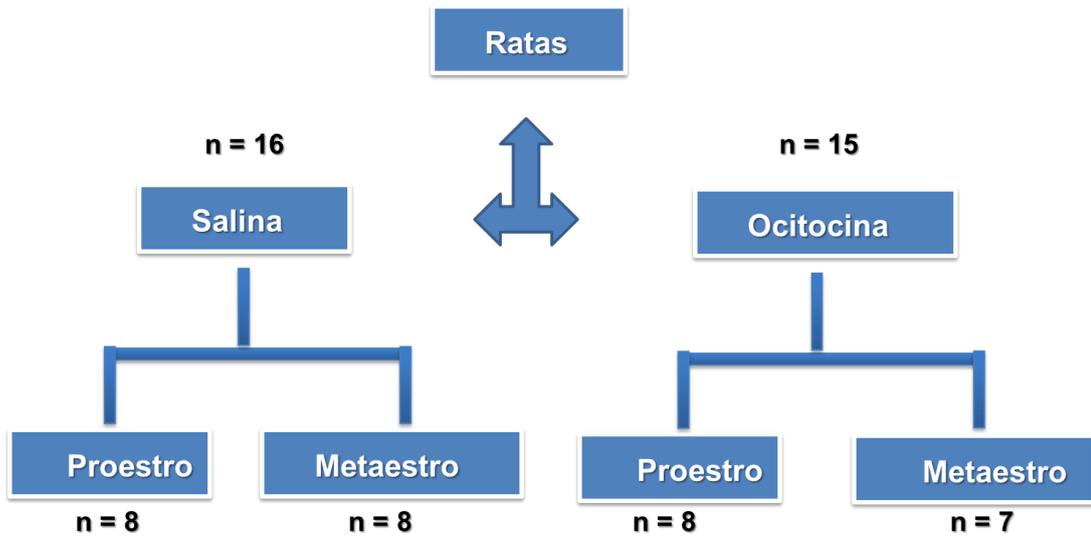


Figura 16. Grupos experimentais

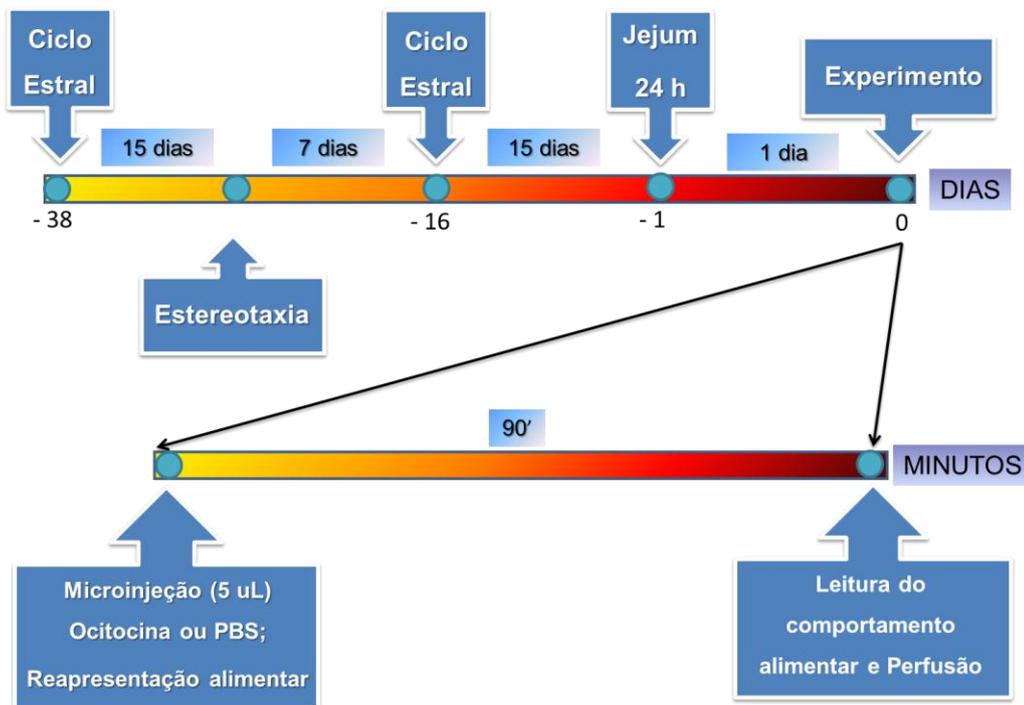


Figura 17. Delineamento experimental

#### 4.4 Análise Estatística

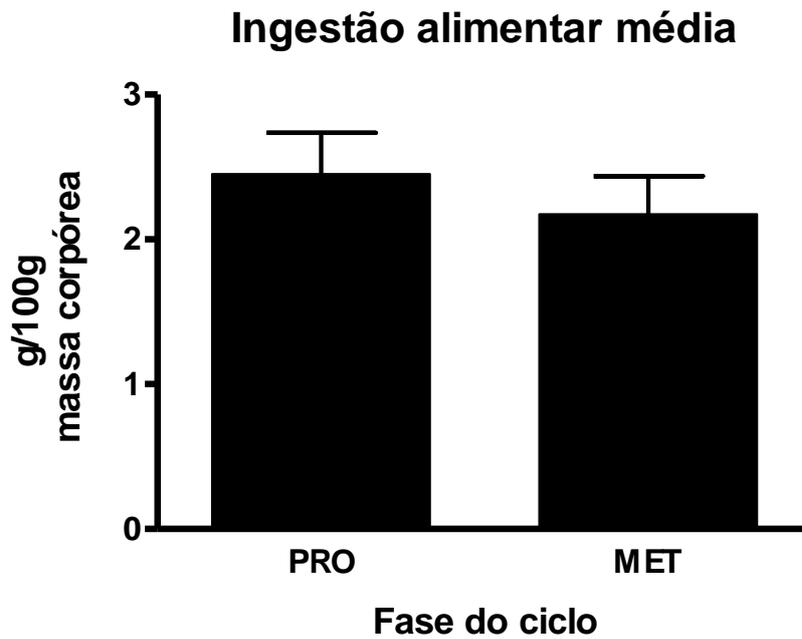
Os resultados dos experimentos foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise da influência do ciclo estral no comportamento ingestivo e da microinjeção de ocitocina no comportamento ingestivo foi utilizado o teste *t de Student* paramétrico. Para análise do efeito de fases do ciclo estral na modulação ocitocinérgica na ingestão alimentar nos grupos proestro e metaestro utilizou-se a análise de variância ANOVA two-way, adotando um nível de significância de  $P < 0,05$ . Todos os dados foram analisados pelo programa computacional GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., USA).

## 5 RESULTADOS

Observou-se que, dentre as 60 ratas da amostra, apenas 60% (n = 36) apresentaram ciclo regular e foram submetidas a cirurgia de implantação de cânula (icv). A partir deste momento, evidenciou-se que cerca de 12% (n = 5) das ratas que foram submetidas à implantação da cânula i.c.v. alteraram a regularidade do ciclo e permaneceram em fase metaestro sendo descartadas do estudo. Assim sendo, o total da amostra foi de 31 ratas que continuaram a ciclar normalmente após a cirurgia estereotáxica. A amostra total permaneceu em jejum por 24h para serem submetidas ao procedimento experimental, sendo divididas em 16 ratas para a microinjeção de PBS (grupo controle - GC) e 15 ratas para a microinjeção de OT (grupo OT).

### 5.1 Influência do ciclo estral no comportamento ingestivo das ratas

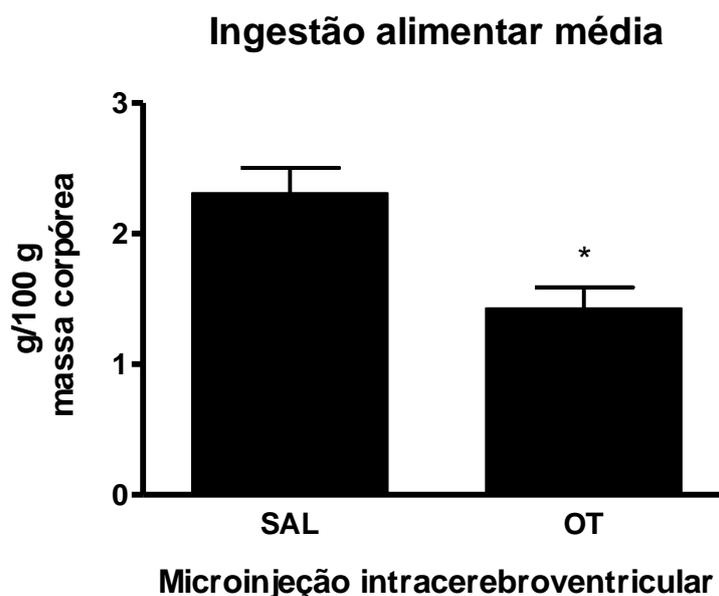
Na figura 21, das 16 ratas submetidas à microinjeção de PBS, 8 em proestro e 8 estavam em metaestro. Após as 24 horas de jejum, as 8 ratas em proestro e as 8 ratas em metaestro apresentaram respectivamente ingestão alimentar média de  $2,45 \pm 0,28$  g/100g e  $2,17 \pm 0,26$  g/100g de massa corpórea durante 90 minutos após a reapresentação da ração, não apresentando diferença significativa entre os grupos.



**Figura 18.** Ingestão cumulativa de ração (g/100g de massa corpórea) durante 90 min após a reapresentação da ração em ratas privadas de alimento por 24h. As ratas foram microinjetadas (icv) com PBS durante o metaestro (Grupo MET) ou durante o Proestro (Grupo PRO). (\*)  $p < 0,05$ . META (n= 8) e PRO (n=8). Para análise dos resultados foram expressos média  $\pm$  erro padrão da média e submetidos ao teste *t de student* paramétrico.

## 5.2 Controle ocitocinérgico do comportamento ingestivo

Na figura 22, das 31 ratas submetidas à implantação de cânula no ventrículo lateral, 16 receberam microinjeção (5 uL) de PBS e 15 receberam microinjeção (5 uL) de OT (5 UI). Após as 24 horas de jejum, as 16 ratas que receberam microinjeção (5 uL) de PBS e as 15 que receberam microinjeção (5 uL) de OT apresentaram respectivamente ingestão alimentar média de  $2,31 \pm 0,19$  g/100g e  $1,42 \pm 0,16$  g/100g de massa corpórea durante 90 minutos após a reapresentação da ração, apresentando diferença significativa entre os grupos.

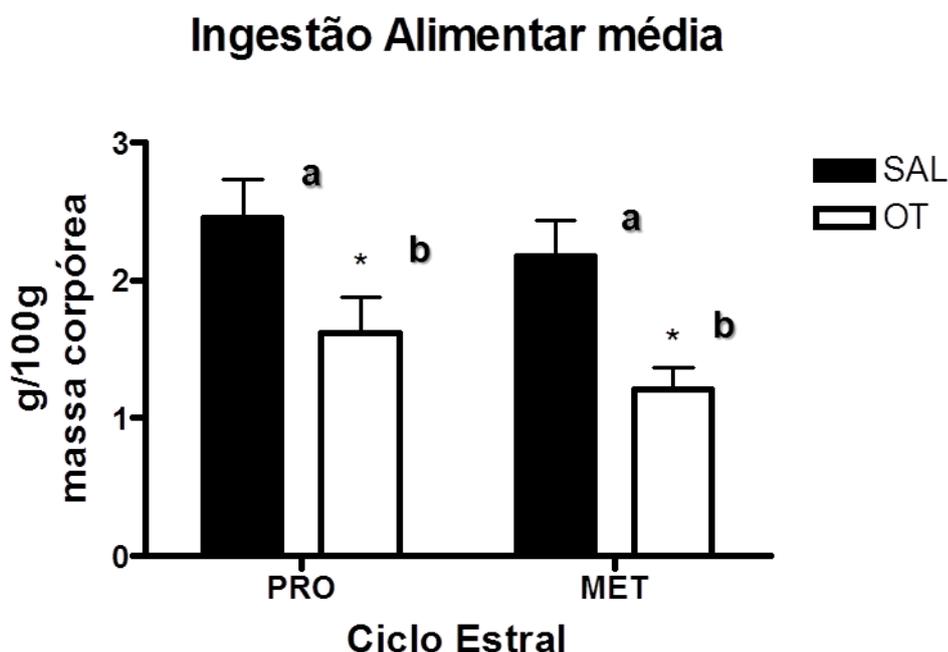


**Figura 19.** Ingestão cumulativa de ração (g/100g de massa corpórea) durante 90 min após a reapresentação da ração em ratas privadas de alimento por 24h. As ratas foram microinjetadas (icv) com PBS (SAL, n=16) ou ocitocina (OT, n=15) independente da fase do ciclo. (\*)  $p < 0,05$ . Para análise dos resultados foram expressos média  $\pm$  erro padrão da média e submetidos ao teste *t de student* paramétrico.

### 5.3 Efeito de fases do ciclo estral na modulação ocitocinérgica da ingestão alimentar

Para determinação da influência do ciclo estral no comportamento ingestivo das ratas, a figura 23 demonstra que no GC (16 ratas), 8 estavam em metaestro e 8 em proestro. Após o procedimento experimental, as 8 ratas em metaestro e as 8 em proestro apresentaram respectivamente ingestão alimentar média de  $2,17 \pm 0,26$  g/100g e  $2,45 \pm 0,28$  g/100g de massa corpórea durante 90 minutos após a reapresentação da ração, não apresentando diferença significativa entre os grupos.

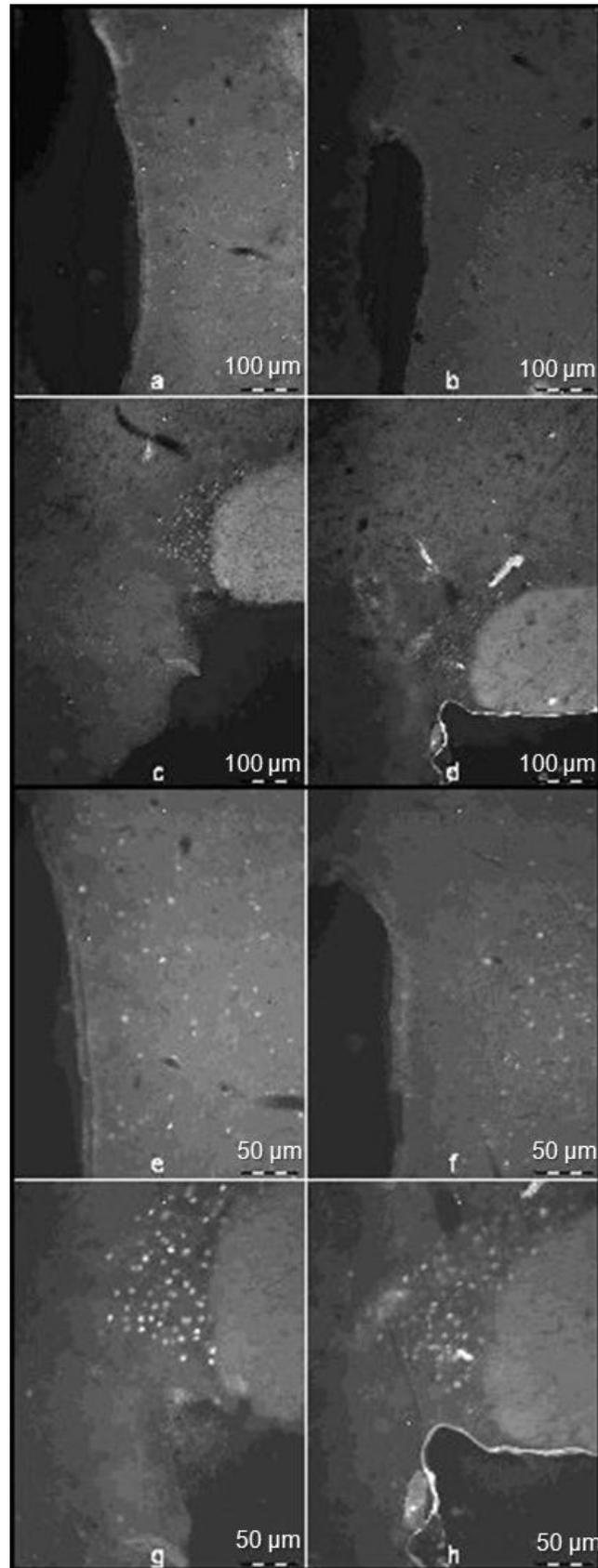
No que diz respeito a modulação esteroidal do controle ocitocinérgico do comportamento ingestivo, a figura 23 demonstra no grupo OT (15 ratas), 7 estavam em metaestro e 8 em proestro. Após o procedimento experimental, as 7 ratas em metaestro e as 8 em proestro apresentaram respectivamente ingestão alimentar média de  $1,21 \pm 0,15$  g/100 g e  $1,61 \pm 0,26$  g/100 g de massa corpórea durante 90 minutos após a reapresentação da ração, apresentando diferença significativa entre os grupos.



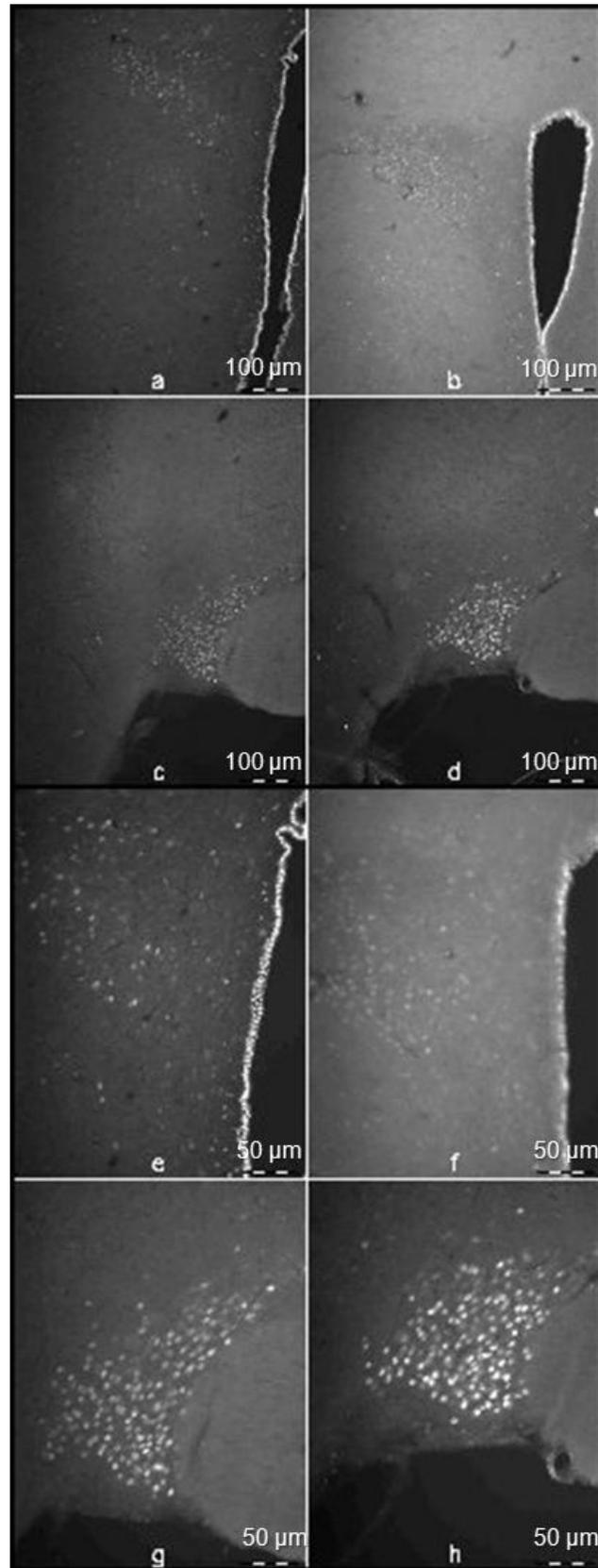
**Figura 20.** Ingestão cumulativa de ração (g/100g de massa corpórea) durante 90 min após a reapresentação da ração em ratas privadas de alimento por 24h. As ratas foram microinjetadas (icv) com PBS ou ocitocina durante o proestro (Grupo PRO) e metaestro (Grupo MET). (\*)  $p < 0,05$ . SALINA (n= 16) e OT (n= 15). Para análise dos resultados foram expressos média  $\pm$  erro padrão da média e submetidos ao teste Anova two-way. A análise estatística demonstrou o efeito da microinjeção de ocitocina ( $F(1, 27) = 12,6$ ;  $p = 0,001$ ), mas não para o ciclo estral ( $F(1, 27) = 1,83$ ;  $p = 0,18$ ), e não para interação entre ambos ( $F(1, 27) = 0,06$ ;  $p = 0,80$ ).

#### 5.4 Imunofluorescência

As figuras mostram secções coronais (20  $\mu$ m) dos núcleos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) de ratas nas fases metaestro (figura 24) e proestro (figura 25) microinjetadas (icv) com PBS ou ocitocina nas condições de reapresentação de ração após jejum (24 horas), com processamento para imunofluorescência para FOS.



**Figura 21.** As fotomicrografias mostram a expressão de Fos em secções coronais (20  $\mu\text{m}$ ) dos núcleos paraventricular (A e B, com áreas de marcações ampliadas nas figuras E e F, respectivamente) e supraóptico (C e D, com áreas de marcações ampliadas nas figuras G e H, respectivamente) de ratas nas fases metaestro microinjetadas (i.c.v.) com PBS (B e D) ou ocitocina (A e C) nas condições de reapresentação de ração após jejum de 24 horas.



**Figura 22.** As fotomicrografias mostram a expressão de Fos em secções coronais (20  $\mu\text{m}$ ) dos núcleos paraventricular (A e B, com áreas de marcações ampliadas nas figuras E e F, respectivamente) e supraóptico (C e D, com áreas de marcações ampliadas nas figuras G e H, respectivamente) de ratas nas fases proesto microinjetadas (i.c.v.) com PBS (B e D) ou ocitocina (A e C) nas condições de reapresentação de ração após jejum de 24 horas.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Influência do ciclo estral no comportamento alimentar

Os esteróides gonadais podem modular sistemas hormonais que regulam tanto a ingestão de alimentos quanto o consumo e a excreção de água. Estudos realizados por Forsling e Peysner (1988) e Crocker e Hinsull (1972), observaram que durante o ciclo estral em ratas ocorre uma variação no balanço de líquidos, com uma redução no consumo de água e de alimentos, no fluxo urinário, na taxa de excreção de sódio durante o proestro e estro, bem como a elevação da concentração plasmática de sódio e da osmolalidade plasmática com diminuição do hematócrito durante o proestro (CALIGIONI, FRANCI, 2002).

Em relação a participação dos hormônios ovarianos na ingestão alimentar, diversos trabalhos, a exemplo de Buffenstein et al. (1995) e Dye e Blundell (1997), relatam que há um aumento da ingestão alimentar durante as fases de ovulação com pico hormonal. Seguindo esta premissa, no presente estudo, nossa hipótese era de que deveria haver uma maior ingestão durante a fase proestro (fase em que há uma maior concentração de estrógeno), o que não foi evidenciado em nossos resultados ao analisar a variação da ingestão alimentar média de ração entre os grupos proestro e metaestro.

Um fator limitante da presente pesquisa relacionou-se a manutenção de um número adequado de animais em todo o delineamento experimental. Apesar de uma amostra de 60 animais, esta não foi o suficiente para obtenção de uma análise significativa sobre a influência do ciclo estral no comportamento ingestivo. É possível que devido ao restrito número de animais estudados essa diferença na ingestão alimentar provocada pelos esteróides gonadais possa não ter sido identificada. Uma das dificuldades encontradas na metodologia do mesmo reflete-se na manutenção de dois ciclos estrais regulares consecutivos, visto que foi observado uma falta de regularidade em 28 animais da amostra.

Neste estudo, também foi identificada uma mudança na regularidade do ciclo estral após a cirurgia de implantação da cânula (icv). Este fato pode ter ocorrido por

um possível erro de parâmetro ou de procedimento cirúrgico durante o mesmo, ocasionando uma possível lesão em alguma região de influência sobre o ciclo estral. Carrer et al. (1972), relatam que após a lesão eletrolítica do núcleo ventromedial, ocorre mudança na duração do ciclo estral e na receptividade ao macho, mas não relata a interrupção do ciclo, como o que aconteceu com aproximadamente 12% das ratas na presente pesquisa. Sanchez e Dominguez (1995), em seu trabalho também mostram que lesões unilaterais na amígdala central podem alterar também a ovulação, mas não há menção sobre o ciclo estral.

## **6.2 Influência da ocitocina no controle da ingestão alimentar**

Diversos estudos mostram a participação de neuropeptídios no controle do comportamento ingestivo (BIEBERMANN et al., 2012; PARKER, BLOOM, 2012; VALASSI et al., 2008; WILASCO, 2010). Dentre eles destaca-se a ocitocina, um neuropeptídio hipofisal produzido nos neurônios magnocelulares e parvocelulares do PVN e SON do hipotálamo e que apresenta uma ação anorexígena quando administrado intracerebroventricularmente (BASKIN et al., 2010). Vários estudos observaram uma redução da ingestão alimentar através da microinjeção icv de OT (ARTELLI, BENELLI, BERTOLINI, 1990; BENELLI et al., 1991).

Em nosso estudo, ao analisar o controle ocitocinérgico no comportamento ingestivo, evidenciou-se que a administração central de OT foi capaz de reduzir de forma significativa a ingestão alimentar de ratas em metaestro e proestro após jejum de 24 horas. Tais dados estão em consonância com a literatura. Olson et al. (1991), em seu estudo, evidenciaram que a administração intracerebroventricular de ocitocina e um agonista de OT foram capazes de reduzir significativamente a ingestão de alimentos em ratos em jejum. Outro estudo, com o objetivo de investigar diretamente efeito da ocitocina na ingestão de alimentos e de água em ratos, ao administrar ocitocina por via icv e intraperitoneal em ratos em jejum por 21 horas também foi encontrado uma redução da ingestão de alimentos, como também no tempo de alimentação, além do aumento da latência entre refeições (ARLETTI, BENELLI, BERTOLINI, 1990).

### **6.3 Influência do ciclo estral no controle ocitocinérgico da ingestão alimentar**

No que diz respeito a influência do ciclo estral no controle ocitocinérgico do comportamento ingestivo, nossos resultados mostram que as fases proestro e metaestro do ciclo estral, respectivamente maior e menor concentração de estrógeno, não modulam a ação inibitória da ocitocina no controle da ingestão alimentar em ratas submetidas a jejum por 24 horas e tratadas com microinjeção icv de ocitocina.

A modulação dos esteroides gonadais na ingestão alimentar pode ocorrer devido a sua ação no controle da secreção de ocitocina. A síntese de OT também varia durante o ciclo estral (MILLER et al., 1989; VAN TOL et al., 1988), sugerindo uma possível modulação esteroideal na sua expressão. Diversos estudos relatam que a administração de estrógeno estimula a liberação periférica de OT, além de alterar a organização estrutural de corpos celulares e dendritos de neurônios ocitocinérgicos (AMICO, SEIF, ROBINSON, 1981; NEGORO, VISESSUWAN, HOLLAND, 1973; CALDWELL et al., 1988). Outros trabalhos mostram a variação da liberação de OT no PVN, SON, neuro-hipófise, sangue porta-hipofisário e plasma durante o ciclo estral de ratas, sendo acompanhada do aumento da atividade ocitocinérgica durante o proestro (GREER et al., 1986; CROWLEY et al., 1978; SARKAR, GIBBS, 1984; WINDLE, FORSLING, 1993). Acrescenta-se ainda que o estrógeno regule diretamente a expressão gênica de OT no PVN e SON via ER- $\beta$  (receptor de estrógeno  $\beta$ ), aumentando assim o conteúdo de RNAm de OT em neurônios do PVN e do SON, além de também aumentar a concentração plasmática de ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno (OLIVEIRA, 2007). Entretanto, os mecanismos ou vias pelos quais os esteróides gonadais modulam os neurônios ocitocinérgicos ainda são desconhecidos.

### **6.4 Imunofluorescência para c-Fos**

Diversos estudos demonstram que padrões específicos da expressão de c-Fos no cérebro estão associados com tratamentos que alteram a ingestão de alimentos em ratos, e indicam que a avaliação imunorreativa de c-Fos em diferentes

áreas do cérebro pode identificar funções comuns de redes neuroanatômicas que são ativadas por diversos tratamentos que, no entanto, produzem semelhantes efeitos comportamentais, autonômicos e neuroendócrinos em animais (OLSON et al., 1993). A expressão de c-Fos pelos neurônios pode ser usada como um marcador de ativação das células neuronais, sendo extremamente útil para o mapeamento neuroanatômico funcional dos sistemas neuroendócrinos em resposta a estímulos específicos, tais como a colecistocinina (CCK), hiperosmolalidade, e depleção de volume, ou durante vários estados fisiológicos, tais como a hormônio ovulatório proestro, luteinizante (LH) e aumento lactação (HOFFMAN, SMITH, VERBALIS, 1993). A administração central de OT induz ativação de proteína FOS em regiões envolvidas no controle da ingestão alimentar. Esta proteína tem sido usada com alto grau de confiabilidade para avaliar a atividade no cérebro em resposta à alimentação. O PVN e o SON representam locais de integração para elaborar várias respostas comportamentais, neuroendócrinas e autonômicas à diferentes estímulos. Essas respostas fisiológicas são mediadas por núcleos distintos organizados intrinsecamente (OLIVEIRA, 2007; OLSON, et al., 1993).

Neste trabalho, ao analisar as fotomicrografias da imunofluorescência, foi verificado a ativação com expressão de c-Fos no PVN e SON de ratas em fase metaestro e proestro tratadas com microinjeção icv de ocitocina ou salina isotônica, submetidas à realimentação por noventa minutos após jejum de 24 horas. Em um recente estudo realizado por Maejima et al. (2011), com o objetivo de investigar os efeitos da ocitocina administrada por diferentes vias, identificou-se a expressão de c-Fos no hipotálamo, tronco cerebral, ARC, PVN e NTS quando OT foi administrado intraperitonealmente, enquanto que, por via subcutânea, foi observado a supressão da ingestão de alimentos em normal e alto teor de gordura por dieta em camundongos obesos e quando administrado via intravenosa reduziu a ingestão de alimentos, peso corporal, massa de gordura visceral e tamanho dos adipócitos. Entretanto, há estudos divergentes mostrando que não há alteração do conteúdo de OT no PVN e SON de ratos que submetidos ao jejum por 24 horas (BURLET et al., 1992).

Na literatura, há poucos estudos relatando a expressão de c-Fos mediante efeito dos esteroides gonadais e a administração icv de OT no comportamento da

ingestão alimentar. Entretanto, há na literatura vários trabalhos relatando os efeitos de neuropeptídios na redução do comportamento ingestivo de alimentos e, assim como a ocitocina, apresentam um papel na alimentação, relacionado à indução da saciedade. Desta forma, encontramos dados semelhantes na literatura com outros neuropeptídios anorexígenos. Geerling e Loewy (2007), em seu estudo, verificou a ativação neuronal com expressão de Fos no núcleo do trato solitário e no complexo parabraquial em ratos privados de sódio e após a ingestão de sal. Em um trabalho realizado com o objetivo de elucidar o efeito da oximodulina na saciedade em aves mediante injeção intracerebroventricular foi observado uma redução da ingestão de alimentos e água em aves e foi evidenciado a expressão de Fos no núcleo infundibular do hipotálamo. Nadkarni et al. (2011), com o objetivo de investigar a influência da administração pulmonar de PYY no comportamento ingestivo, verificou uma supressão da ingestão de alimentos com o aumento de c-Fos no núcleo arqueado do hipotálamo e uma redução da expressão de NPY. Outro estudo desenvolvido por Krawczewski et al. (2011), ao investigar o efeito da microinjeção intracerebroventricular de leptina em camundongos sedentários não foi observado uma redução significativa na ingestão alimentar, entretanto observou que em ratos exercitados e tratados com leptina a ativação de receptores positivos de neurônios do núcleo ventromedial do hipotálamo, envolvidos no controle homeostático de equilíbrio energético. Olofsson et al. (2009), em sua pesquisa, constataram que o tratamento com estrógeno suprime o jejum induzindo ativação de Fos em neurônios do NPY e AgRP em resposta a realimentação. Este estudo indica que os neurônios que expressam o AgRP e NPY são funcionalmente necessários para as mudanças cíclicas na alimentação para todo o ciclo estral e que os neurônios AgRP e NPY são mediadores essenciais da função anorexígena do estrogênio. Olszewski et al. (2001), demonstrou que a ativação do receptor de melanocortina-4, cujo envolvimento na etiologia da obesidade e saciedade tem sido demonstrado tanto em humanos quanto em modelos animais, por injeções do hormônio alfa-MSH no PVN reduz a ingestão de alimentos e provoca um aumento da percentagem de Fos em neurônios ocitocinérgicos. Respostas semelhantes foram encontradas por McMinn et al. (2000), ao investigar o efeito da administração intracerebroventricular de  $\alpha$ -MSH sob as respostas comportamentais e metabólicas e observou a redução da ingestão de alimentos, redução do peso corporal e expressão de Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo.

Desta forma, nossos resultados mostram que a ocitocina apresenta uma ação central no comportamento da ingestão alimentar sem influência do ciclo estral.

## 7. CONCLUSÃO

Desta forma, diante dos dados apresentados, concluímos que:

1. O ciclo estral em animal controle não influencia no comportamento ingestivo;
2. A ocitocina, quando administrada centralmente, reduz a ingestão alimentar em ratas previamente submetidas ao jejum;
3. As fases do ciclo estral não modulam a ação inibitória da ocitocina no controle da ingestão alimentar;

## **8. PERSPECTIVAS**

Após o desenvolvimento da presente pesquisa observamos que são necessários novos estudos afim de melhor compreender e identificar as vias neuroquímicas envolvidas nos circuitos ocitocinérgicos quanto ao controle da ingestão alimentar e sua relação com os esteróides gonadais em diferentes fases do ciclo estral.

## REFERÊNCIAS

- AIRES, M.M. Fisiologia. **Guanabara Koogan**, 2008.
- AMICO, J.A.; VOLLMER, R.R.; CAI, H.M., MIEDLAR, J.A.; RINAMAN, L. Enhanced initial and sustained intake of sucrose solution in mice with na oxytocin gene deletion. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 289: 1798-1806, 2005.
- AMICO, J.A.; SEIF, S.M.; ROBINSON, A.G. Elevation of oxytocin and the oxytocin-associated neurophysin in the plasma of normal women during midcycle. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 53: 1229-1232, 1981.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrinologia básica e aplicada. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005.
- ARLETTI, R.; BENELLI A, BERTOLINI A, A. Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. **Physiol. Behav.** 48: 825-830, 1990.
- BARBERIS, C; TRIBOLLET, E. Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. **Crit. Rev. Neurobiol.** 10(1): 119-154, 1996.
- BASKIN, D. G.; KIM, F.; GELLING, R. W.; RUSSELL, B. J.; SCHWARTZ, M. W.; MORTON, G. J.; SIMHAN, H. M.; BLEVINS, J. E. A new oxytocin-saporin cytotoxin for lesioning oxytocin-receptive neurons in the rat hindbrain. **Endocrinology**, 151(9), 4207-4213, Set. 2010.
- BENELLI, A.; BERTOLINI, A; ARLETTI, R. Oxytocin-induced inhibition of feeding and drinking: No sexual dimorphism in rats. **Neuropeptides.** 0:57-62, 1991.
- BIEBERMANN, H.; KÜHNEN, P.; KLEINAU, G.; KRUDE, H. The neuroendocrine circuitry controlled by POMC, MSH, and AGRP, **Handb Exp Pharmacol.** 209:47-75, 2012.
- 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(1-2): 30-41, 2003.

BLEVINS, J.E.; SCHWARTZ, M.W.; BASKIN, D.G. Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. **Am .J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 287(1): 87-96, 2004.

BUFUFFENSTEIN, R.; POPPITT, S.D.; McDEVITT, RM.; PRENTICE, A.M. A ingestão de alimentos e do ciclo menstrual: uma análise retrospectiva, com implicações para a investigação do apetite. **Physiol. Behav.** 58: 1067-1077, 1995.

BURLET, A.J.; JHANWAR-UNIYAL, M.; CHAPLEUR-CHATEAU, M.; BURLET, C.R.; LEIBOWITZ, S.F. Effect of food deprivation and refeeding on the concentration of vasopressina and oxytocin in discret hypothalamic sites. **Pharm. Bio. Behavior.** 43: 897-905, 1992.

CALDWELL, J.D.; JIRIKOWSKI, G.F.; GREER, E.R.; STUMPF, W.E.; PEDERSEN, C.A. Ovarian steroids and sexual interaction alter oxytocinergic content and distribution in the basal forebrain. **Brain Res.** 446: 236-244, 1988.

CALIGIONI, C.S.; FRANCI, C.R. Oxytocin secretion induced by osmotic stimulation in rats during the estrous cycle and after ovariectomy and hormone replacement therapy. **Life Sci.** 71(24): 2821-2831, 2002.

CAQUINEAU, C.; LENG. G.; GUAN, X.M.; JIANG M.; VAN, D.P.L.; DOUGLAS A.J. Effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone on magnocellular oxytocin neurones and their activation at intromission in male rats. **J. Neuroendocrinol.** 18(9): 685-69, 2006.

CARRER, H.; ASCH, G.; ARON, C. Changes in the duration of the estral cycle and sexual receptivity after lesion of the ventromedial nucleus in rats. **C. R. Seances. Soc. Biol. Fil.** 166(6): 924-8, 1972.

CLINE, M. A.; BOWDEN, C. N.; NANDAR, W.; ROGERS, J. A. Central oxymodulin causes anorexigenic effects associated with the hypothalamus and alimentary canal in chicks (*Gallus gallus*). **Comparat. Biochem. And Phusiol.** 149: 405-410, 2008.

CONRAD, K.P.; GELLAI, M.; NORTH, W.G.; VALTIN, H. 1. Influence of oxytocin on renal hemodynamics and sodium excretion. **Ann.N.Y.Acad..Sci.** 689: 346-362, 1993.

CONSTANZO, L.S. Fisiologia. **Elsevier**, 2004.

CROCKER, A.D; HINSULL, S.M. Renal electrolyte excretion during the oestrous cycle in the rat. **J. Endocrinol.** 55(2): 42-43, 1972.

CROWLEY, W.R.; O'DONOHUE, T.L.; GEORGE, J.M.; JACOBOWITZ, D.M. Changes in pituitary oxytocin and vasopressina during the estrous cycle and after ovarian hormones: evidence for mediation by norepinephrine. **Life Sci.** 23: 2579-2586, 1978.

DANTAS, V.G.L. Estudo de associação de variações dos genes bche (butirilcolinesterase) e ghrl (grelina) com obesidade. 2008.

DE VRIES, G.J.; BUIJS, R.M. The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. **Brain Res.** 273(2): 307-317, 1983.

DORNELLES, C.T.L. Comparação de grelina, leptina, insulina e glicose entre crianças e adolescentes cirróticos e hígidos. 2010.

DOSSAT, A.M.; LILLY, N.; KAY, K.; WILLIAMS, D.L. Glucagon-like peptide 1 in nucleus accumbens affect food intake. **The J. Neurosc.** 31 (41): 14453-14457, 2011.

DOUGLAS, A.J.; JOHNSTONE, L.E.; LENG G. Neuroendocrine mechanisms of change in food intake during pregnancy: a potential role for brain oxytocin. **Physiol Behav.** 91(4): 352-365, 2007.

DYE, L.; BLUNDELL, J.E. Menstrual cycle and appetite control: implications for weight regulation. **Hum Reprod.** 12: 1142-1151, 1997.

EGUCHI, R.; CHEIK, N.C.; OYAMA, L.M.; NASCIMENTO, C.M.O.; MELLO, M.T.; TUFIK, S.; DAMASO, A. Efeitos do Exercício Crônico Sobre a Concentração Circulante da Leptina e Grelina em Ratos com Obesidade Induzida por Dieta. **Rev. Bras. Med. Esp.** (3), 2008.

FORSLING, M.L.; PEYSNER, K. Pituitary and plasma vasopressin concentrations and fluid balance throughout the oestrous cycle of the rat. **J. Endocrinol.** 117 (3): 397-402, 1988.

GREER, E.R.; CALDWELL, J.D.; JOHNSON, M.F.; PRANGE, A.J.; PEDERSEN, C.A. Variations in concentration of oxytocin and vasopressin in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during the estrous cycle in rats. **Life Sci.** 38: 2311-2318, 1986.

GREER, E.R., CALDWELL, J.D., JOHNSON, M.F., PRANGE, A.J., JR. & PEDERSEN, C.A. Variations in concentration of oxytocin and vasopressin in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during the estrous cycle in rats. **Life Sci.** 38: 2311-2318, 2002.

GEERLING, J.C.; LOEWY, A.D. Sodium deprivation and salt intake activate separate neuronal subpopulations in the nucleus of the solitary tract and the parabrachial complex. **J. Comp. Neurol.** 504(4):379-403, 2007.

GIBBERT, G.A.; BRITO, M. N. Relações fisiológicas entre o sono e a liberação de hormônios que regulam o apetite. **Rev. Saúde Pesq.** 4(2): 271-277, 2011.

GULATI, K.; RAY, A. Effects of intrahypothalamic morphine and its interactions with oxytocin and vasopressin during food intake in rats. **Brain. Research.** 690: 99-103, 1995.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de fisiologia médica. **Elsevier.** 2011.

HALPERN, Z.S.C.; RODRIGUES, M.D.B.; COSTA, R.F. Determinantes fisiológicos do controle do peso e apetite. **Rev. Psiq. Clin.** 31 (4): 150-153, 2004.

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. in Neuroend.** 14(3):173–213, 1993.

JAEGER, J.P. O componente genético da obesidade humana: investigação de genes candidatos envolvidos no controle da ingestão alimentar. 2005.

JUNIOR, J.D.; PEDROSA, R.G.; TIRAPÉGUI, J. Aspectos atuais da regulação do peso corporal: ação da leptina no desequilíbrio energético. **Braz. Jour. of Pharmac. Scienc.** 40 (3), 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. **Guanabara Koogan.** 2008.

KING, B.M. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. **Physiol. Behav.** 87(2): 221-244, 2006.

KRAWCZEWSKI CARHUATANTA KA, DEMURO G, TSCHÖP MH, PFLUGER PT, BENOIT SC, OBICI S. Voluntary exercise improves high-fat diet-induced leptin resistance independent of adiposity. **Endocrinology.** 152(7):2655-64, 2011.

KRINGELBACH, M.L.; STEIM, A.; HARTEVELT, T.J.V. The functional human neuroanatomy of food pleasure cycles. **Physiol. Behav.** 3: 1-10, 2012.

LEITE, L.D.; NETO, J.B. Integração neuroendócrina na regulação da ingestão alimentar. **Neurobiologia.** 72(2), 2009.

LENG, G.; LUDWIG, M.; Lecture, J. B. Information processing in the hypothalamus: peptides and analogue computation. **J.Neuroendocrinol.** 18(6): 379-392, 2006.

LENG, G.; MEDDLE, S. L.; DOUGLAS, A. J. Oxytocin and the maternal brain. **Current Opinion in Pharmacology.** 8: 731-734, 2008.

LURAS, A. Estudo de fatores centrais e periféricos relacionados ao controle da ingestão alimentar em modelos experimentais. **Ens. Ciên: C.** (8), 2009.

LUTZ, T.A. Control of food intake and energy expenditure by amylin-therapeutic implications. **Int J Obes (Lond).** 1:24-27, 2009.

MACHADO, A. Neuroanatomia funcional. **Atheneu,** 2000.

MAEJIMA, Y.; IWASAKI, Y.; YAMAHARA, Y.; KODAIRA, M.; SEDBAZAR, U; YADA, T. Peripheral oxytocin treatment ameliorates obesity by reducing food intake and visceral fat mass. **Aging (Albany NY).** 3(12):69-77, 2011.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Braz. j. Biol.** 62(4): 609-614, 2002.

MCCANN, S.M.; GUTKOWSKA, J.; FRANCI, C.R.; FAVARETTO, A.L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Hypothalamic control of water and salt intake and excretion. **Braz.J.Med.Biol.Res.** 27(4): 865-884, 1994.

MCCLELLAN, K.M.; PARKER, K.L.; TOBET, S. Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. **Front. Neuroendocrinol.** 27(2), 193-209, 2006.

MCMINN, E. J.; WILKINSON, C. W.; HAVEL, P. J.; WOODS, S. C.; SCHWARTZ, M. W. Effect of intracerebroventricular  $\alpha$ -MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression . **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.** 279: 695–703, 2000.

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

MILLER, F.D.; OZIMEK, G.; MILNER, R.J.; BLOOM, F.E. Regulation of neuronal oxytocin mRNA by ovarian steroids in the mature and developing hypothalamus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 86: 2468-2472, 1989.

MILLINGTON, G.W.M. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. **Nutrition & Metabolism.** 4(18): 1743-7075, 2007.

MORRIS, M.; BARNARD, R.R.; J.R.; SAIN, L.E. Osmotic mechanisms regulating cerebrospinal fluid vasopressin and oxytocin in the conscious rat. **Neuroendocrinology.** 39(5): 377-383, 1984.

NADKARNI, P.P.; COSTANZO, R.M.; SAKAGAMI, M. Pulmonary delivery of peptide YY for food intake suppression and reduced body weight gain in rats. **Diabetes Obes Metab.** 13(5):408-17, 2011.

NEGORO, H.; VISESSUWAN, S.; HOLLAND, R.C. Unit activity in the paraventricular nucleus of female rats at different stages of the reproductive cycle and after ovariectomy, with or without oestrogen or progesterone treatment. **J. Endocrinol.** 59: 545-558, 1973.

OLIVEIRA, F. L. Efeito da interação do estado alimentar e da ação estrogênica sobre o sistema ocitocinérgico. 2007.

OLOFSSON, L.E.; PIERCE, A.A.; XU, A.W. Functional requirement of AgRP and NPY neurons in ovarian cycle-dependent regulation of food intake. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 106 (37):15932-7, 2009.

OLSON, B.R.; DRUTAROSKY, M.D.; CHOW, M.S.; HRUBY, V.J.; STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. **Peptides**. 12(1): 113-118, 1991.

OLSON, B.R.; HOFFMAN, G.E.; SVED, A.F.; STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Cholecystokinin induces c-fos expression in hypothalamic oxytocinergic neurons projecting to the dorsal vagal complex. **Brain Res**. 569(2): 238-248, 1992.

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(1):93-106, 1993.

OLSZEWSKI, P.K.; KLOCKARS, A.; OLSZEWSKA, A.M.; FREDRIKSSON, R.; SCIOTH, H.B.; LEVINE, A.S. Molecular, immunohistochemical, and pharmacological evidence of oxytocin's role as inhibitor of carbohydrate but not fat intake. **Endocrinology**. 151: 4736-4744, 2010.

OLSZEWSKI, P.K.; WIRTH, M. M.; SHAW, T. J.; GRACE, M. K.; BILLINGTON, C.J.; GIRAUDO, S. Q. Role of alpha-MSH in the regulation of consummatory behavior: immunohistochemical evidence. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 281: 673–680, 2001.

PARKER, J.A.; BLOOM, S.R. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. **Neuropharmacology**. 1-13, 2012.

PEREIRA, M.J.S. Associação dos neuroreceptores POMC, NPY, e IRS2 com diferentes padrões de comportamento alimentar em ratos wistar normais e sobrepeso. 2009.

RENAUD, L.P.; TANG, M.; MCCANN, M.J.; STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Cholecystokinin and gastric distension activate oxytocinergic cells in rat hypothalamus. **Am.J.Physiol**. 253: 661-665, 1987.

RODRIGUES, A.M.; SUPLICY, H.L.; RADOMINSKI, R.B. Controle neuroendócrino do peso corporal: implicações na gênese da obesidade. **Arq. Bras. Endoc. Metab**. 7(4), 2003.

ROMERO, C.E.M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Rev. Nutr., Camp.**19(1):85-91, 2006.

ROSS, H. E.; YOUNG, L. J. Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology** .30: 534-547, 2009.

SABATIER, N. Alpha-Melanocyte-stimulating hormone and oxytocin: a peptide, mtsignalling cascade in the hypothalamus. **J.Neuroendocrinol.** 18(9): 703-710, 2006.

SABATIER, N.; CAQUINEAU, C.; DAYANITHI, G.; BULL, P.; DOUGLAS, A.J.; GUAN, X.M.; JIANG, M.; VAN DER, P.L.; LENG, G. Alpha-melanocyte-stimulating hormone stimulates oxytocin release from the dendrites of hypothalamic neurons while inhibiting oxytocin release from their terminals in the neurohypophysis. **J.Neurosci.** 23(32): 10351-10358, 2003.

SABATIER, N.; ROWE, I.; LENG, G. Central release of oxytocin and the ventromedial hypothalamus. **Biochemical Society Transactions.** 35: 1247-1251, 2007.

SANCHEZ, M.A.; DOMINGUEZ, R. Differential effects of unilateral lesions in the medial amygdala on spontaneous and induced ovulation. **Biology of Reproduction Research.** 9-020, 1995.

SARKAR, D.K.; GIBBS, D.M. Cyclic variation of oxytocin in the blood of pituitary portal vessels of rats. **Neuroendocrinology.** 39: 481-483, 1984.

SINCLAIR, M.S.; MARTINEZ, I. P.; DVORYANCHIKOV, G.; YOSHIDA, M.; NISHIMORI, K.; ROPER, S. D.; CHAUDHARI, N. Oxytocin Signaling in Mouse Taste Buds. 5(8), 2010.

STRICKER, E.M.; HOSUTT, J.A.; VERBALIS, J.G. Neurohypophyseal secretion in hypovolemic rats: inverse relation to sodium appetite. **Am.J.Physiol** 252.: 889-896, 1987.

STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Central inhibitory control of sodium appetite in rats: correlation with pituitary oxytocin secretion. **Behav.Neurosci.** 101(4), 560-567, 1987.

VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Controle neuroendócrino da ingestão de alimentos. **Nutr., Metabol. Card. Diseas.** 18: 158-168, 2008.

VAN TOL, H.H.; BOLWERK, E.L.; LIU, B.; BURBACH, J.P. Oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat during the estrous cycle, pregnancy, and lactation. **Endocrinology.** 122: 945-951, 1988.

VERBALIS, J.G.; MANGIONE, M.P.; STRICKER, E.M. Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. **Endocrinology.** 128(3): 1317-1322, 1991.

VERBALIS, J.G.; MCHALE, C.M.; GARDINER, T.W.; STRICKER, E.M. Oxytocin and vasopressin secretion in response to stimuli producing learned taste aversions in rats. **Behav.Neurosci.** 100(4): 466-475, 1986.

VERTY, A. N. A.; MCFARLANE, J. R.; MCGREGOR, I. S.; MALLET, P. E. Evidence for an interaction between CB1 cannabinoid and oxytocin receptors in food and water intake. **J. Neuropharmacology.** 47: 593-603, 2004.

WILASCO, M.I.A. Concentração de grelina, leptina e insulina e glicose em crianças eutróficas previamente híidas, 2010.

WINDLE, R.J.; FORSLING, M.L. Variations in oxytocin secretion during the 4-day oestrous cycle of the rat. **J. Endocrinol.** 136(2): 305-311, 1993.

## APÉNDICE A

## APÊNDICE A

### CENTRAL ACTION OF OXYTOCIN ON THE CONTROL OF FOOD INTAKE: INFLUENCE OF THE ESTROUS CYCLE

Rodrigo Figueiredo Fontes<sup>1</sup>; Alyne Andrade Lima<sup>1</sup>; Elizabeth Ting<sup>1</sup>; Daniel Baduê Passos Junior<sup>2</sup>; Silvio Santana Dolabella<sup>1</sup>; Vera Lucia Corrêa Feitosa<sup>1</sup>; Angelo Roberto Antonioli<sup>2</sup>; Waldecy de Lucca Junior<sup>1</sup>; Emerson Ticona Fioretto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE, Brazil

\*Corresponding Author:

Prof. Dr. Emerson Ticona Fioretto, Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Sergipe. Av. Marechal Rondon, s/n. São Cristóvão, SE, Brazil. Zip Code: 49000-000. Email: emmovet.ufs@gmail.com

#### ABSTRACT

In addition to stimulation of uterine contraction and milk ejection, oxytocin (OT) acts on neural circuits that control food intake. This study aimed to investigate the modulation of steroid ocitocinergic food intake. Female Wistar rats with at least three regular cycles were submitted to stereotaxic surgery, following the observation of three more cycles. Animals that remained regular were fasted for 24 hours and received intracerebroventricular microinjection (5 uL) of OT (5 UI, 1 g / L) or phosphate buffered saline and immediately after the infusions, a balanced ration was offered and the amount of food consumed in 90 minutes was measured. Meanwhile, our results demonstrate an oxytocin central action reducing food intake; it was observed that of the cycle estrous does not modulate the inhibitory action of oxytocin in the control of food intake, moreover it was observed a c-Fos expression in the paraventricular and supraoptic nuclei when administered centrally saline and/or oxytocin in rats submitted to fasting.

**Key words:** c-Fos, food intake, gonadal steroids, oxytocin.

## INTRODUCTION

In the last years great advances in scientific knowledge about the neurochemical mechanisms involved in feeding behavior have been acquainted. Knowledge of neural circuits and secretion of hormones that modulate feeding behavior are important for better understanding various ingestive disorders and improve new therapeutic modalities in different pathophysiological processes, such as obesity and hypertension (Dossat et al. 2011, Kringelbach et al. 2012, Sinclair et al. 2011).

Several studies have demonstrated the involvement of neuropeptides in the control of ingestive behavior (Biebermann et al., 2012, Parker and Bloom, 2012; Valassi et al., 2008; Wilasco 2010). Oxytocin (OT) is a neuropeptide produced in the hypophysis by parvocellular and magnocellular neurons of the supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei of the hypothalamus, and it acts in circuits that control food intake, and its secretion is stimulated by microinjection of cholecystokinin (CCK) and gastric distension (Renaud et al. 1987). OT produces an anorexic action, reducing food intake, when administered intracerebroventricular (Artelli et al., 1990; Benelli et al., 1991), however this effect might be reversed by prior microinjection of antagonist (ornithine vasotocin) (Baskin et al., 2010; Renaud et al., 1987; Olson et al., 1991).

OT synthesis also varies during estrous cycle (Miller et al. 1989, Van Tol et al. 1988), suggesting a possible steroid modulation in its expression. Recent studies have investigated the role of ovarian steroids on modulation ocitocinergic circuit, showing variation on OT release in PVN, SON, neurohypophysis, pituitary-portal blood and plasma during estrous cycle in rats, being accompanied by an increased ocitocinergic activity during proestrus (Greer et al. 1986, Crowley et al. 1978, Gibbs and Sarkar 1984, Windle and Forsling 1993).

Besides the evidences about OT relation to food intake and its possible steroid modulation in neural circuits involved in control ingestive, this study aimed to

investigate the role of gonadal steroids in the modulation of oxytocinergic in food intake in different phases of the estrous cycle.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

We investigated 60 Wistar rats weighing between 200 and 250 g from Animal Care Facility of the Federal University of Sergipe (UFS) and maintained in the Animal Care Facility of Department of the UFS in a light/dark cycle (12/12h) at a temperature of 21 ° C and free access to balanced food and water. We report animal losses during investigation, and the 31 animals completed the experiment were arranged into Control Group (CG) received phosphate buffered saline (PBS) icv and Oxytocin Group (OT) received oxytocin icv. CG (n=16) were splitted into Metaestrus (CG<sub>M</sub>) (n=8) and Proestrus (CG<sub>P</sub>) (n=8); while OT (n=15) were arranged into Metaestrus (OT<sub>M</sub>) (n=7) and Proestrus (OT<sub>P</sub>) (n=8).

All experimental procedures used in this study were approved by the Ethics Committee for Animal Research (CEPA) on the Federal University of Sergipe, under protocol number 33/2009.

### **Estrous cycle and stereotaxic surgery**

Three estrous cycles of female rats were accompanied by vaginal smear technique described by Marcondes et al. (2002) and only regular animals were submitted to intracerebroventricular cannulation (icv). Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection (1ml/100gbw) of ketamine (80mg/kg) and xylazine (10mg/kg) diluted in isotonic saline (NaCl 0,15 M) and positioned in the stereotaxic for permanent intracerebroventricular cannula implantation into the lateral ventricle. The following stereotaxic coordinates were applied: 0,8mm posterior to bregma, 1,3mm lateral-lateral and 3,5mm dorsal-ventral from the bone calotte. After surgery, animals received an intramuscular injection (0.1mL) antibiotic (Pentabiotic

Veterinary - 24,000 units of penicillin and streptomycin and 10 mg Dihydrostreptomycin - Wyeth), a dose of analgesic (Banamine® injectable pet-1mg/kg-Schering) and remained isolated at ambient temperature (25°C) until anaesthesia recovery, following to their respective cages.

### **Food deprivation, microinjection and feeding behavior**

After seven days of surgery recovery, three more estrous cycles were accompanied, and only the regular rats underwent fasting for 24 hours and the rats that were in metaestrus and proestrus phases, respectively the highest and lowest concentration of estrogen, received at 7: 00 am a microinjection (5uL) of OT (5 UI, 1g/L-Novartis) or isotonic saline solution (0,15 M) buffered at pH 7.4 (PBS) into the lateral ventricle. Immediately after the infusion, animals cleared accessed balanced food and the amount consumed in 90 minutes was measured.

### **Perfusion and brain cryoprotection**

After feeding period, animals were anesthetized as previously described, and subjected to perfusion by intracardiac infusion (24,6ml/minute) of saline solution for five minutes followed by formalin 10% for 40 minutes, following to brains removal, which was post-fixed for 2 hours in formalin 10% and then submitted to cryoprotection solution of buffered 30% sucrose until complete precipitation tissue and stored in a freezer at temperature of - 22°C.

### **Tissue preparation and immunofluorescence**

Sampled brains were taken into a cryostat (Leica CM 1850) at - 20 ° C to obtain four series of sections with 20µm, which were mounted on slides pre-gelatinized and processed by technique of immunofluorescence for Fos. Brain sections containing neurons positively marked for Fos in the PVN and SON, were examined through a fluorescence microscope with digital camera (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Germany) and photographed bilaterally. The brain regions were identified and classified according to the atlas Paxinos and Watson 1997.

## Statistical Analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean. To analyze the influence of the estrous cycle and microinjection of oxytocin in ingestive behavior, we used the parametric Student t test. Effect of phase of the estrous cycle of ocitocinergic control of ingestive behavior in proestrus and metestrus were analysed by variance two-way ANOVA, adopting a significance level of  $P < 0.05$ . All data were analyzed by the computer program GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., USA).

## RESULTS

It was observed that 60% ( $n=36$ ) of the animals presented regular cycle, and about 12% of the rats that underwent cannula implantation altered the regularity of estrous cycle remaining in metaestrus phase, thus, 31 rats continued to regularly cycle after stereotactic surgery.

In relation to ocitocinergic control of ingestive behavior, independent of cycle phase, the figure 2 shows that CG and OT after 24 hours of fasting, respectively showed average food ingestion of  $2,31 \pm 0,19$  and  $1,42 \pm 0,16$  g/100g body mass for 90 minutes after resubmission of chow, presenting significant differences between groups.

To determine the influence of the estrous cycle in ingestive behavior of rats, figure 1 demonstrate that CG after 24 hours of fasting,  $CG_M$  and  $CG_P$  demonstrated average food intake respectively of  $2,17 \pm 0,26$  and  $2,45 \pm 0,28$  g/100g body mass for 90 minutes after resubmission of chow, no significant difference between groups.

As regards the influence of the estrous cycle of ocitocinergic control of feeding behavior, figure 3 illustrates that CG after 24 hours of fasting,  $CG_M$  showed an average food intake of  $2,17 \pm 0.26$  g/100g, while  $CG_P$  presented an average food intake of  $2,45 \pm 0,28$  g/100g of body mass for 90 minutes after resubmission of chow, presenting significant differences between groups.

In Figure 3, OT after 24 hours of fasting, OT<sub>M</sub> showed an average food intake of  $1,21 \pm 0,15$  g/100 g, while OT<sub>P</sub> presented an average food intake of  $1,61 \pm 0,26$  g/100g of body mass for 90 minutes after reintroduction of food, significant differences between groups.

In relation immunofluorescence it was verified the expression of c-Fos, figures 4 and 5, in coronal sections (20  $\mu$ m) in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats in proestrus and metestrus phases, respectively, microinjected icv with oxytocin or saline in conditions of resubmission of chow after fasting 24 hours.

## DISCUSSION

Gonadal steroids can modulate hormone systems that regulate both food intake and water intake and excretion. Studies performed by Forsling and Peysner (1988) and Crocker and Hinsull (1972), in rats, observed that during the estrous cycle there was a change in fluid balance, with a reduction in water consumption and food intake, as well as in urinary flow rate and sodium excretion during proestrous and estrous, and increase in plasma sodium concentration, in plasma osmolality and with decrease in hematocrit during proestrous (Caligioni and Franci, 2002).

In relation to the participation of ovarian hormones on food intake, several studies, report that there is an increase food intake during the ovulation phase with hormone peak (Buffenstein et al.,1995 and Blundell and Dye,1997). Following this premise, in our study, there should be a higher intake during the proestrus phase, which was not observed when analyzing the variation of the average chow intake between proestrus and metaestrus groups what should be explained by the limited number of animals that completed the experiment.

Several studies show the involvement of neuropeptides in the control of ingestive behavior (Biebermann et al. 2012, Parker and Bloom 2012, Valassi et al. 2008, Wilasco 2010). Among them stands out oxytocin, a neuropeptide produced in hipofisal parvocellular and magnocellular neurons of the SON and PVN of the hypothalamus and on an anorectic action when administered

intracerebroventricularmente (Baskin et al. 2010). Several studies have reported a reduction in food intake by microinjection icv OT (Artelli et al. 1990, Benelli et al. 1991).

In our study, by analyzing the ocitocinergic control of ingestive behavior, central OT injection was able to reduce food intake significantly in agreement to the literature. Previous studies have shown that the intracerebroventricular administration of oxytocin significantly reduced food intake in fasted rats. However, pretreatment with OT antagonist receptor prevented the expected inhibition of food intake (Olson et al. 1991). In another study, in order to investigate directly the effect of oxytocin on food intake and water in rats, icv oxytocin, and intraperitoneally administrations in rats fasted for 21 hours, resulted not only in reducing food intake, as well as at feeding time, and increased latency between meals, however, these effects were inhibited when administered the antagonist vasotocin (Arletti et al. 1990). In relation to the effects of oxytocin on the feeding and drinking behavior between male and female rats, Benelli, and Bertolini Arletti (1991), reported no sexual difference in feeding inhibition or at the time drinking induced by oxytocin when using OT icv and intraperitoneally OT.

The modulation of gonadal steroids on food intake may occur due to its action in controlling the secretion of oxytocin. The synthesis of OT varies during the estrous cycle (Miller et al. 1989, Van Tol et al. 1988). This fact suggests a possible steroid modulation in its expression. Several studies have reported that administration of estrogen stimulates peripheral release of OT, and change the structural organization of cell bodies and dendrites of ocitocinergics neurons (Amico et al., 1981, Negoro et al., 1973, Caldwell et al., 1988). However, the mechanisms or pathways by which gonadal steroids modulate ocitocinergics neurons are still unknown.

Regarding the influence of the estrous cycle of the ocitocinergic control in ingestive behavior, our results showed that proestrus and metaestrus phases of the estrous cycle, respectively higher and lower concentrations of estrogen, not modulate the inhibitory action of oxytocin in the control of food intake in rats fasted for 24 hours and treated with i.c.v. microinjection of oxytocin.

Several studies have shown specific patterns of expression of c-Fos in the brain associated with treatments that affect food intake in rats, and indicate that the evaluation immunoreactive of c-Fos in different brain areas can identify common functions of neuroanatomical networks that are activated by different treatments that, however, produces similar effects behavioral, autonomic and neuroendocrine in animals (Olson et al. 1993).

Central administration of OT induces FOS activation in regions involved in controlling food intake. This protein has been used with high reliability to assess brain activity in response to food. The PVN and SON represent local integration to develop various behavioral responses, neuroendocrine and autonomic responses to different stimuli. These physiological responses are mediated by distinct nuclei intrinsically organized (Almeida 2007, Olson et al. 1993).

In this study, c-Fos expression was detected in PVN and SON of rats in both CG and OT groups subjected to refeed for ninety minutes after fasting for 24 hours. In a recent study by Maejima et al. (2011), with aim to investigate the effects of oxytocin administered by different routes, identified the expression of c-Fos in the hypothalamus, brainstem, ARC (arcuate nucleus), PVN and NTS (nucleus of the solitary tract) when administered intraperitoneally, while subcutaneously was observed suppression of food intake in normal and high-fat diet for obese mice, and when administered intravenously reduced food intake, body weight, visceral fat mass and size of adipocytes. However, there are conflicting studies that show no change in the content of OT in the PVN and SON of rats fasted for 24 hours (Burlet et al. 1992).

In the literature, we found no studies reporting modulation of expression of c-Fos by gonadal steroids associated to OT icv administration to analyse food intake behavior. However, there are in literature several studies reporting the effects on neuropeptides reduction on chewing of food, and as oxytocin, have a role in the diet, related to the induction of satiety. Thus, we find similar data in the literature with other anorectic neuropeptides. Geerling and Loewy (2007) in his study, the neuronal activation with expression of c-Fos in the nucleus of the solitary tract and parabrachial complex in rats deprived of sodium and after salt intake. Olszewski et al.

(2001) demonstrated that activation of the receptor melanocortin-4, which involved in the etiology of obesity and satiety has been demonstrated both in humans and in animal models by injection hormone alpha-MSH in the PVN reduces food intake and causes an increase in the percentage of c-Fos in neurons oitocinérgicos. Similar responses were found by McMinn et al. (2000), to investigate the effect of administration of  $\alpha$ -MSH intracxerebroventricular under the metabolic and behavioral responses and showed a reduction in food intake, body weight and reducing the expression of c-Fos in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.

It is worthwhile to be mentioned that in this study, we identified changes in the regularity of estrous cycle of some rats after surgical cannula implantation what would occur may be due to a possible error of parameter or in the surgical procedure what may cause injury in a region of influence of the estrous cycle. Carrer et al. (1972) reported that after electrolytic lesions of the ventromedial nucleus, changes occur in estrous cycles and receptivity to the male, but does not report the interruption of the cycle, as happened with about 14% of the rats in this study. Sanchez and Dominguez (1995) in their study also show that unilateral lesions in the central amygdala may also alter ovulation but no mention of the estrous cycle.

Meanwhile, our results demonstrate an oxytocin central action reducing food intake and it was observed that of the cycle estrous does not modulate the inhibitory action of oxytocin in the control of food intake, moreover it was observed a c-Fos expression in the paraventricular and supraoptic nuclei when administered centrally saline and/or oxytocin in rats submitted to fasting.

We still believe that further studies are necessary in order to better identify and understand the neurochemical pathways involved in oitocinérgic circuits in control of food intake and its relation to gonadal steroids at different phases of the estrous cycle.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Waldecy for allowing the development of this work in the laboratory of Cellular and Structural Biology (LBCE). We thank Professor Josemari for allowing access to the laboratory for Research in Neurosciences (LAPENE). Thanks to the financing agency CAPES for financial support for the development of research

## RESUMO

Em adição à estimulação da contração uterina e ejeção de leite, a ocitocina atua em circuitos neurais que controlam a ingestão alimentar. Este trabalho teve como objetivo investigar a modulação esteroideal no controle ocitocinérgico da ingestão alimentar. Ratas Wistar com três ciclos estrais regulares foram submetidas a cirurgia estereotáxica. Após a cirurgia, foi realizado mais três ciclos e as que permaneceram regulares foram submetidas a jejum por 24 horas e receberam uma microinjeção intracerebroventricular (5 uL) de ocitocina (5 UI) ou de tampão fosfato salina. Imediatamente após as infusões, foi oferecida ração balanceada e mensurada a quantidade de alimento consumido por 90 minutos. Dessa forma, nossos resultados demonstram uma ação central de ocitocina na redução da ingestão de alimentos; observou-se que o ciclo estral não modula a ação inibitória da ocitocina no controle da ingestão de alimentos, além disso, foi observado uma expressão de c-Fos no núcleos paraventricular e supraóptico, quando administrada centralmente salina e / ou ocitocina em ratos submetidos ao jejum.

**Palavras-chave:** c-fos, ingestão alimentar, esteroides gonadais, ocitocina.

## REFERENCES

- AMICO JA, SEIF SM AND ROBINSON AG. 1981. Elevation of oxytocin and the oxytocin-associated neurophysin in the plasma of normal women during midcycle. *J Clin Endocrinol Metab* 53:1229-1232.
- ARLETTI R, BENELLI A AND BERTOLINI AA. 1990. Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. *Physiol Behav* 48: 825-830.
- BASKIN DG, KIM F, GELLING RW, RUSSELL BJ, SCHWARTZ MW, MORTON GJ, SIMHAN HM AND BLEVINS JE. 2010. A new oxytocin-saporin cytotoxin for lesioning oxytocin-receptive neurons in the rat hindbrain. *Endocrinology*, 151(9), 4207-4213.
- BENELLI A, BERTOLINI A AND ARLETTI R. 1991. Oxytocin-induced inhibition of feeding and drinking: No sexual dimorphism in rats. *Neuropeptides*. 0:57-62.
- BIEBERMANN H, KÜHNEN P, KLEINAU G AND KRUDE H. 2012. The neuroendocrine circuitry controlled by POMC, MSH, and AGRP, *Handb Exp Pharmacol*. 209:47-75, 2012.
- CALDWELL JD, JIRIKOWSKI GF, GREER ER, STUMPF WE AND PEDERSEN CA. 1988. Ovarian steroids and sexual interaction alter oxytocinergic content and distribution in the basal forebrain. *Brain Res*. 446: 236-244.
- CALIGIONI CS AND FRANCI CR. 2002. Oxytocin secretion induced by osmotic stimulation in rats during the estrous cycle and after ovariectomy and hormone replacement therapy. *Life Sci*. 71: 2821-2831.
- CROCKER AD, HINSULL SM. 1972. Renal electrolyte excretion during the oestrous cycle in the rat. *J. Endocrinol*. 55(2): 42-43.
- CROWLEY WR, O'DONOHUE TL, GEORGE JM AND JACOBOWITZ DM. 1978. Changes in pituitary oxytocin and vasopressin during the estrous cycle and after ovarian hormones: evidence for mediation by norepinephrine. *Life Sci*. 23: 2579-2585.
- DOSSAT A M, LILLY N, KAY K AND WILLIAMS DL. 2011. Glucagon-like peptide 1 in nucleus accumbens affect food intake. *The J. Neurosc*. 31 (41): 14453-14457.

FORSLING ML, PEYSNER K. 1988. Pituitary and plasma vasopressin concentrations and fluid balance throughout the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol.* 117(3): 397-402.

GREER ER, CALDWELL JD, JOHNSON MF, PRANGE AJJR AND PEDERSEN CA. 2002. Variations in concentration of oxytocin and vasopressin in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during the estrous cycle in rats. *Life Sci.* 38: 2311-2318.

KRINGELBACH ML, STEIM A, HARTEVELT TJV. 2012. The functional human neuroanatomy of food pleasure cycles. *Physiol. Behav.* 3: 1-10.

MAEJIMA Y, IWASAKI Y, YAMAHARA Y, KODAIRA M, SEDBAZAR U AND YADA T. 2011. Peripheral oxytocin treatment ameliorates obesity by reducing food intake and visceral fat mass. *Aging (Albany NY).* 3(12):69-77

MCMINN EJ, WILKINSON C W, HAVEL PJ, WOODS SC AND SCHWARTZ MW. 2000. Effect of intracerebroventricular  $\alpha$ -MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 279: 695–703.

MILLER FD, OZIMEK G, MILNER RJ AND BLOOM FE. 1989. Regulation of neuronal oxytocin mRNA by ovarian steroids in the mature and developing hypothalamus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A,* 86: 2468-2472.

NEGORO H, VISESSUWAN S AND HOLLAND RC. 1973. Unit activity in the paraventricular nucleus of female rats at different stages of the reproductive cycle and after ovariectomy, with or without oestrogen or progesterone treatment. *J.Endocrinol.* 59: 545-558.

OLSON BR, DRUTAROSKY MD, CHOW MS, HRUBY VJ, STRICKER EM AND VERBALIS JG. 1991. Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides.* 12:113-118.

OLSON BR, FREILINO M, HOFFMAN GE, STRICKER EM, SVED AF AND VERBALIS JG. 1993. C-Fos Expression in Rat Brain and Brainstem Nuclei in Response to Treatments That Alter Food Intake and Gastric Motility. *Mol. Cell. Neurosci.* 4(1):93-106.

OLSZEWSKI PK, WIRTH MM, SHAW TJ, GRACE MK, BILLINGTON CJ AND GIRAUDO SQ. 2001. Role of alpha-MSH in the regulation of consummatory behavior: immunohistochemical evidence. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 281: 673–680.

PARKER JA AND STEPHEN RB. 2012. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology*. 1-13.

RENAUD LP, TANG M, MCCANN MJ, STRICKER, EM AND VERBALIS JG. 1987. Cholecystokinin and gastric distension activate oxytocinergic cells in rat hypothalamus. *Am.J.Physiol*, 253: 661-665..

SARKAR DK AND GIBBS DM. 1984. Cyclic variation of oxytocin in the blood of pituitary portal vessels of rats. *Neuroendocrinology*. 39: 481-483.

SINCLAIR MS, MARTINEZ IP, DVORYANCHIKOV G, YOSHIDA M, NISHIMORI K, ROPER SD AND CHAUDHARI N. 2010. Oxytocin Signaling in Mouse Taste Buds. 5(8).

VALASSI E, SCACCHI M, CAVAGNINI F. 2008. Controle neuroendócrino da ingestão de alimentos. *Nutr., Metabol. Card. Diseas*. 18: 158-168.

VAN TOL HH, BOLWERK EL, LIU B AND BURBACH JP. 1988. Oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat during the estrous cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrinology*. 122: 945-951.

WILASCO MIA. 2010. Concentração de grelina, leptina e insulina e glicose em crianças eutróficas previamente híidas.

WINDLE RJ AND FORSLING ML. 1993. Variations in oxytocin secretion during the 4-day oestrous cycle of the rat. *J.Endocrinol*. 136: 305-311.

## FIGURES LEGENDS

Figure 1. Ingestion cumulative the chow (g/100 g body mass) for 90 min after resubmission of chow in rats deprived of food for 24 h. The rats were microinjetadas (icv) with saline during metestrus (META Group) or during proestrus (PRO Group). (\*)  $P < 0,05$ . META (n = 8) and Pro (n = 8). To statistical analysis of results were expressed mean  $\pm$  standard error of the mean and subjected to the parametric *Student's t* test.

Figura 2. Ingestion cumulative the chow (g/100 g body mass) for 90 min after resubmission of chow in rats deprived of food for 24 h. The rats was microinjected (icv) with isotonic saline (SALINA, n=16) ou oxytocin (OT, n=15) independent of the phase of the cycle. (\*)  $p < 0,05$ . To statistical analysis of results were expressed mean  $\pm$  standard error of the mean and subjected to the parametric *Student's t* test.

Figura 3. Ingestion cumulative the show (g/100 g body mass) for 90 min after resubmission of food in rats deprived for 24 h. The rats was microinjected (icv) with saline or oxytocin during proestrus (PRO Group) and metestrus (MET group). (\*)  $P < 0.05$ . Saline (n = 16) and OT (n = 15). Statistical analysis Results were expressed mean  $\pm$  standard error of the mean and subjected to two-way ANOVA. Statistical analysis showed the effect of oxytocin microinjection ( $F(1, 27) = 12,6$ ,  $p = 0,001$ ), but not to the estrous cycle ( $F(1, 27) = 1,83$ ;  $p = 0,18$ ), and not for their interaction ( $F(1, 27) = 0,06$ ;  $p = 0.80$ ).

Figure 4. The photomicrographs show the expression of c-Fos in coronal sections (20  $\mu$ m) of the paraventricular (A and B, with areas of markings in the expanded figures E and F, respectively) and supraoptic (C and D, with the expanded areas of markings figures G and H, respectively) nucleus of rats phases metestrus microinjected (icv) with isotonic saline (B and D) or oxytocin (A and C) under conditions of resubmission of chow after fasted for 24 hours (Increase of 100 times).

Figure 5. The photomicrographs show the expression of c-Fos in coronal sections (20  $\mu$ m) of the paraventricular nucleus (A and B, with areas of markings in the

expanded figures E and F, respectively) and supraoptic (C and D, with the expanded areas of markings figures G and H, respectively) nucleus of rats phases proesto microinjetadas (icv) with isotonic saline (B and D) or oxytocin (A and C) under conditions of resubmission of chow after fasted for 24 hours (Increase of 100 times).

## FIGURES

Figure 1

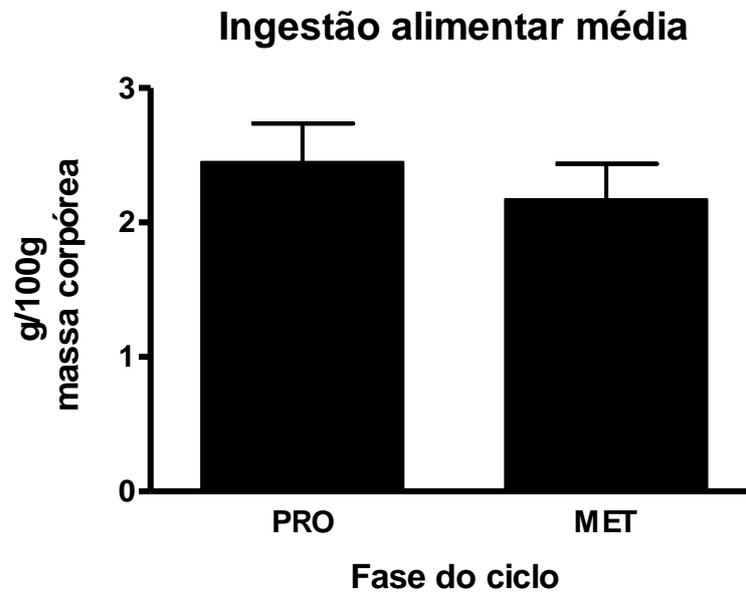


Figure 2

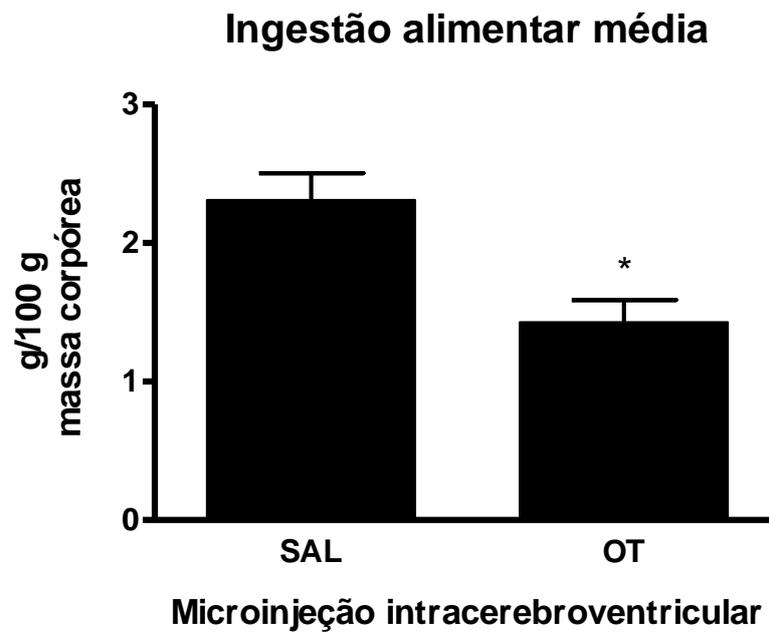


Figure 3

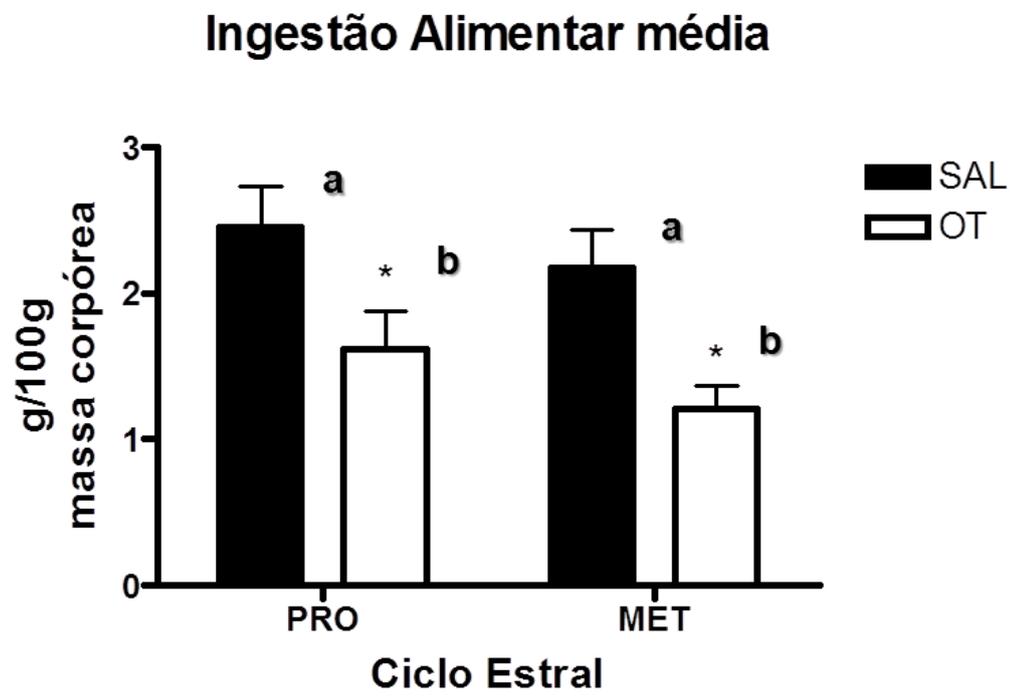


Figure 4

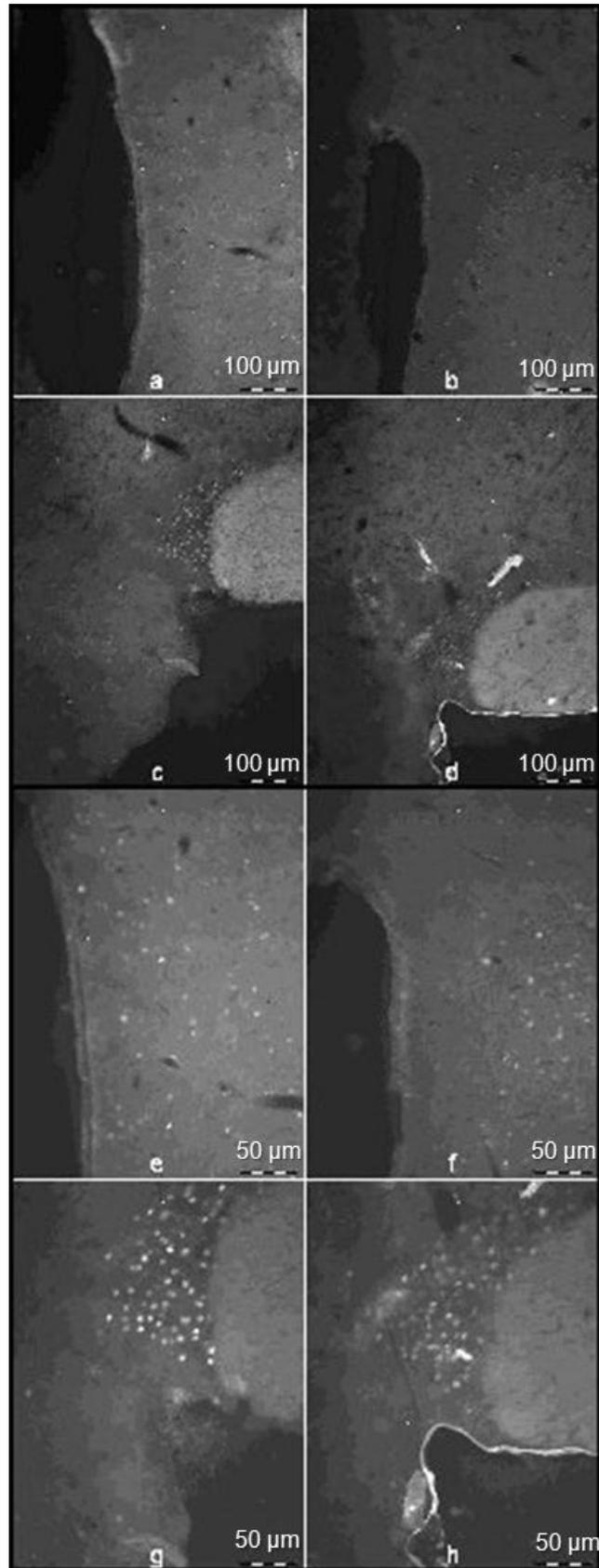
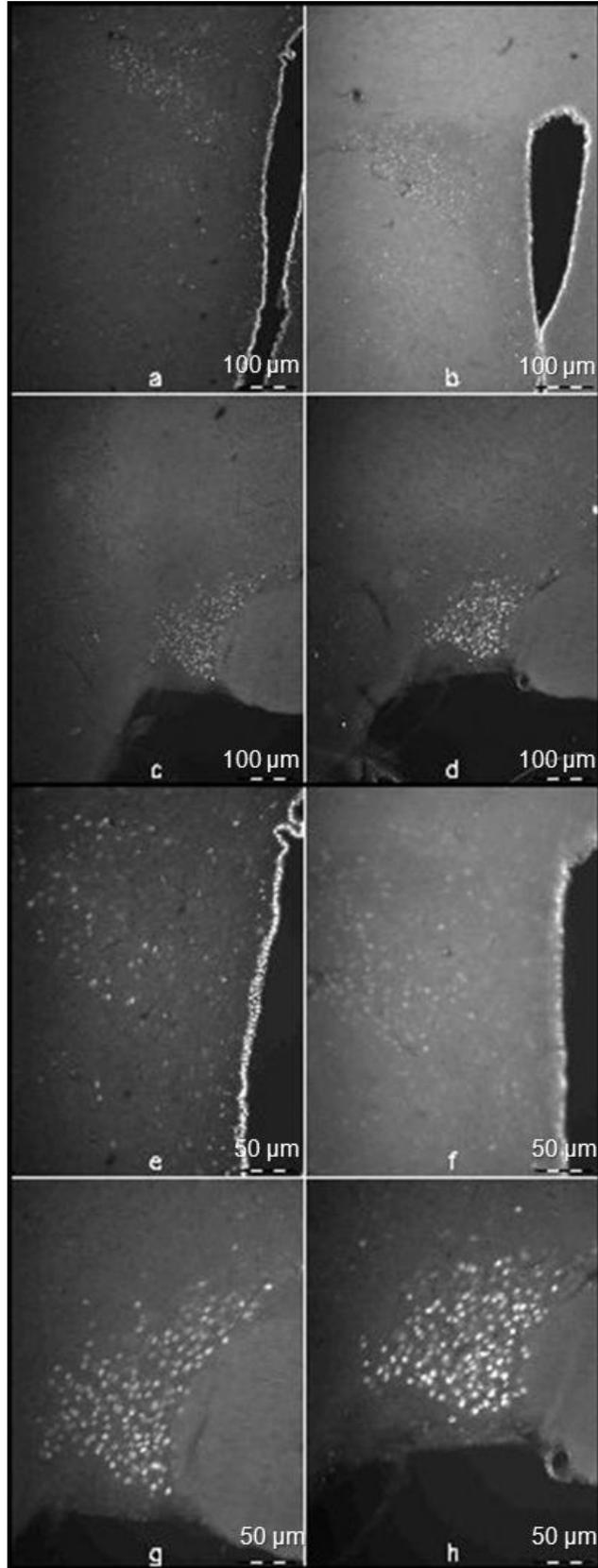


Figure 5



## **ANEXO A**

**ANEXO A**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

**DECLARAÇÃO**

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "Liberação dendrítica de ocitocina no controle do apetite ao sódio e da ingestão alimentar", sob coordenação do Prof. Dr. Waldecy de Lucca Júnior (protocolo CEPA 33/2009), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 15/05/2009.

São Cristóvão, 18 de maio de 2009

Prof.ª. Dr.ª. Flavia Teixeira Silva  
Presidente do CEPA/UFS

---

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"  
Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE  
49100-000  
Fones: 3212 6661/6606