



Universidade de Brasília

Instituto de Psicologia

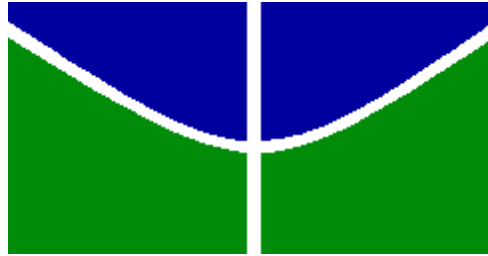
Departamento de Processos Psicológicos Básicos

Programa de Pós-Graduação em Ciências do Comportamento

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE E O PAPEL DOS
RECEPTORES 5-HT₄ DA CONCHA DO NÚCLEO ACCÚMBENS DURANTE
EPISÓDIO COMPULSIVO/COMPENSATÓRIO DE INGESTÃO DE ALIMENTOS EM
RATOS**

Aline Caron Borges

Brasília, 2011



Universidade de Brasília

Instituto de Psicologia

Departamento de Processos Psicológicos Básicos

Programa de Pós-Graduação em Ciências do Comportamento

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE E O PAPEL DOS
RECEPTORES 5-HT₄ DA CONCHA DO NÚCLEO ACCÚMBENS DURANTE
EPISÓDIO COMPULSIVO/COMPENSATÓRIO DE INGESTÃO DE ALIMENTOS EM
RATOS**

Aline Caron Borges

Brasília, abril de 2011



**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE E O PAPEL DOS
RECEPTORES 5-HT₄ DA CONCHA DO NÚCLEO ACCÚMBENS DURANTE
EPISÓDIO COMPULSIVO/COMPENSATÓRIO DE INGESTÃO DE ALIMENTOS EM
RATOS**

ALINE CARON BORGES

Orientador: Dr. Vitor Augusto Motta Moreira
Co-orientadora: Dra. Marta Aparecida Paschoalini

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências do Comportamento do Departamento de Processos Psicológicos Básicos do Instituto de Psicologia, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências do Comportamento – Área de concentração: Cognição e Neurociências do Comportamento.

Brasília, abril de 2011

Índice

Banca Examinadora	IV
Dedicatória	V
Agradecimentos	VI
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas.....	IX
Lista de Abreviaturas	X
Resumo	XII
Abstract	XIII
Introdução	14
Estudo piloto.....	25
Objetivo	26
Materiais e método.....	27
Resultados	32
Discussão	42
Referências	52
Anexo I: Principais resultados da ANOVA para análise etológica do LCE.....	61

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

BANCA EXAMINADORA

Professora Dr^a. Marta Aparecida Paschoalini (Co-orientadora)
Departamento de Neurociências e Comportamento
Universidade Federal de Santa Catarina

Professor Dr. Renato Malcher Lopes
Departamento de Ciências Fisiológicas
Universidade de Brasília

Professora Dr^a. Marília Barros
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade de Brasília

Professor Dr. Wania de Souza – Suplente
Departamento de Processos Psicológicos Básicos
Universidade de Brasília

HTe look of any intelligent person makes any dignitary stumble.

Don Colacho

Agradecimentos

Agradeço imensamente à professora Marta, pela confiança, oportunidade e pelas ferramentas viabilizadas para a realização deste sonho. Se não desisti no caminho foi exclusivamente para não te desapontar.

Só fazemos com excelência aquilo que realmente amamos e nos motiva, por isso agradeço ao professor Vitor por me aceitar e deixar que eu fosse em busca do que realmente acredito e gosto de pesquisar.

Ao professor Moacir por oferecer seu laboratório para a realização dos testes comportamentais do LCE.

À minha estagiária, amiga e conselheira Thais Alberti, que me possibilitou de “respirar” fora do laboratório, sem peso na consciência, por alguns finais de semana, com a certeza de que *‘everything is gonna be ok’*. Obrigada por dedicar-se a mim e aos nossos ratos. Nós vencemos!!!

Aos colegas de laboratório, Eduardo, Fábio, Larissa, Dani, Cris, Rafa e em especial ao Anderson e Ana Paula que me receberam, me ouviram, me ensinaram e me apoiaram.

Ao Guilherme, por ajudar a colocar no papel as idéias e as conclusões que nem sempre eu consegui expressar. Agradeço por se esforçar e entender o que eu faço na tentativa sempre de melhorar meu trabalho e me ver feliz. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

À professora Vera Tramonte por viabilizar o espaço físico em que se realizou a coleta.

Ao professor Pádua, por abrir as portas do laboratório de maneira acolhedora e permitir que eu fizesse os cortes histológicos. Aos seus alunos agradeço pelo imenso carinho e ajuda sempre que precisei.

À professora Mariana por me ensinar a olhar as lâminas e ao professor Marino pelos ensinamentos e conselhos fundamentais para meu crescimento, bem como pela oportunidade inicialmente me dada.

À minha amiga e *roommate* Karina, por sempre abrir as portas da “nossa” casinha para me receber e ao Luiz por ajudar na organização dos dados.

Aos responsáveis pelo biotério central da UFSC por sempre me atenderem e enviarem os animais.

Às colegas de UnB Marília, Roberta pela disponibilidade, paciência e atenção e as dicas quando cheguei ao desconhecido. À Bibi, pelas incansáveis tardes de companheirismo na tentativa de achar todas as regras da APA.

À minha família pelo apoio, amor e confiança. À minha prima Camila que foi minha “assistente de cirurgia” na primeira vez que tive que operar um grupo inteiro de ratos em dois dias.

Pelo apoio financeiro, em forma de bolsa, agradeço à CAPES.

Novamente, agradeço ao Guilherme, meu Urso (e ao Alfie), dedico esse trabalho a vocês. Obrigada pelo apoio, amor, companheirismo, compreensão dado no decorrer desses anos em regime de dedicação exclusiva, sem férias nem greve.

Lista de Figuras

Figura 1. Média (\pm EPM) do consumo de gordura de G1, em 1 hora entre os grupos HR e LR no decorrer de seis semanas.....	26
Figura 2. Média (\pm EPM) do consumo de gordura de G2, em 1 hora entre os grupos HR e LR no decorrer de quatro semanas. * indica diferença estatisticamente significativa entre HR e LR nas semanas 2 a 4, considerando $p < 0,05$	31
Figura 3. Média (\pm EPM) da quantidade calórica (Kcal) consumida em uma hora pelo grupo HR nas semanas um e quatro. Barras cinza mostram a quantidades de gordura e barras azuis a de ração consumidas em uma hora. * indica diferença estatisticamente significante em relação ao consumo de ração quando há presença de gordura, considerando $p < 0,05$	31
Figura 4. Média (\pm EPM) do consumo de chocolate, em 1 hora entre os grupos HRCHO e LRCHO no decorrer de quatro semanas.....	32
Figura 5: . Média (\pm EPM) do ganho de peso entre as semanas de HR, LR, HRcho, LRcho e GC	
Figura 6: Figura ilustrativa do labirinto em cruz elevado	34
Figura 7: Comportamentos avaliados no teste do LCE.....	27
Figura 8: Média (\pm EPM) do número de Avaliações de risco (imersão da cabeça) entre os grupos HR, LR, HRCHO, LRCHO e GC. * indicam diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle, considerando $p < 0,05$	36
Figura 9: Ilustração com a localização das cânulas implantadas bilateralmente no NAcc. Os números à direita de cada plano indicam a distância em milímetros anterior ao <i>Bregma</i> , tomando-se como referência o atlas de Paxinos e Watson (1998).....	40
Figura 10. Média (\pm EPM) da quantidade de gordura ingerida pelo grupo HR em 1 hora. Comparação intra-sujeito entre a ingestão de gordura na semana 4 (S4) e as aplicações de PBS e	

Bimu-8 (0.01 μ g e 5 μ g/0.2 μ L) respectivamente. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao PBS e # em relação à S4, considerando $p < 0,05$37

Lista de Tabela

Tabela 1. Média (\pm EPM) das porcentagens de tempo de permanência nos braços abertos e do total de entradas do LCE entre os grupos GC, HR e LR.....36

Lista de Abreviaturas

DSM: Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais

5-HT: 5-Hidroxitriptamina (Serotonina).

SNC: Sistema nervoso central.

CEUA: Comitê de Ética ao Uso de Animais.

HR: *High restriction*. Ratos que receberam alimento-teste três dias na semana.

LR: *Low restriction*. Ratos que receberam alimento-teste sete dias na semana.

GC: Grupo controle. Animais que nunca receberam alimento-teste.

SAP: *Stretch attention posture*.

LCE: Labirinto em cruz elevado.

NAcc: Núcleo accumbens.

AP: Antero-posterior.

DV: Dorso-ventral.

(BIMU-8: endo-N-8-methyl-8-zabicyclo [3.2.1] oct-3-yl)-2,3-dihydro-3-isopropyl-2-oxo-1Hbenzimidazol-1-carboxamide hydrochloride.

PBS: *Phosphate-buffered saline* – solução tampão usada como veículo.

MO: Microscópio óptico.

s.c: subcutâneo

i.m: intramuscular

G1: HR e LR que receberam mistura de gordura vegetal com 10% açúcar por seis semanas e viveram em gaiolas individuais (protocolo Corwin & Wojnicki, 2006)

G2: HR e LR que receberam mistura de gordura vegetal com 10% açúcar por quatro semanas e viveram em trios (protocolo adaptado).

G3: HRcho e LRcho que receberam chocolate por quatro semanas e viveram em trios (protocolo adaptado).

DA: Dopamina.

TCAP: Transtorno de compulsão alimentar periódica.

EPM: Erro padrão da média.

ANOVA: Análise de variância.

HL: Hipotálamo lateral

CART: *Cocaine and amphetamine regulated transcript* - transcrito regulado pela cocaína e anfetamina

Resumo

Modelos animais de compulsão alimentar têm contribuído para o entendimento da etiologia desses distúrbios em humanos. Sabe-se que indivíduos com transtornos alimentares também apresentam elevados níveis de ansiedade e depressão. O modelo animal de intermitência é um modelo válido de compulsão, no entanto, pode gerar comportamentos de medo/ansiedade elevados nos animais, como mostrou nosso estudo piloto. O presente trabalho adaptou o modelo de compulsão gerado pela intermitência do acesso à gordura vegetal, retirando a variável isolamento social, e testou o efeito farmacológico da microinjeção bilateral de um agonista dos receptores 5-HT₄, BIMU-8, em duas doses 0.1 e 5µg/0.2µL do núcleo accumbens de ratos machos sobre esse comportamento. Verificou-se que ambas as doses reduzem o consumo de ração e que somente a maior dose diminui o consumo de gordura. Os animais submetidos ao protocolo apresentam significativamente mais comportamentos de avaliações de risco (imersão da cabeça) no labirinto em cruz elevado. Animais que receberam chocolate como alimento-teste não diferiram no consumo, mas ingeriram aproximadamente o dobro da quantidade se comparados aos que receberam gordura com açúcar. Sugere-se que os receptores 5-HT₄ no núcleo accumbens tem papel tanto na ingestão alimentar no seu componente homeostático como no comportamento compulsivo relacionado a ela.

Palavras-chave: Comportamento compulsivo, palatabilidade, núcleo accumbens, receptores 5-HT₄, labirinto em cruz elevado.

Abstract

Animal models for binge-eating behavior have contributed to understand the etiology of these disorders. Individuals with compulsion tend to have high levels of anxiety and depression. The intermittent-access animal model is a valid means to study compulsion, however, it can generate high fear/anxiety behaviors, as shown in the pilot study. The present study adapted the compulsion model generated by the intermittent access to vegetable shortening by removing the social isolation variable and tested the pharmacological effects of a bilateral microinjection of BIMU-8, a 5-HT₄ agonist, in two doses (0.1 and 5µg/0.2µL), in the nucleus accumbens of male wistar rats submitted to this protocol. There was a reduced chow intake for both doses and shortening intake for the larger dose. The animals submitted to the protocol had significantly more risk assessment behaviors (head immersions) in the elevated plus maze. Animals that received chocolate instead of vegetable shortening did not differ in intake, but ate approximately twice as much as those that received sweetened shortening. The present study suggests that 5-HT₄ receptors in the nucleus accumbens play a role both in food consumption and in the compulsive behavior related to it.

Keywords: Compulsive behavior, palatability, nucleus accumbens, 5-HT₄ receptors, elevated plus maze.

O sistema de controle energético homeostático, do ponto de vista evolutivo, leva milhares de anos para adaptar-se às modificações ambientais, enquanto o ambiente é modificado pelo homem de maneira muito mais rápida e constante. Assim, há um descompasso entre os hábitos alimentares contemporâneos (culturalmente determinados, abundantes em alimento industrializado) e os instintos de sobrevivência da espécie, ainda nos moldes pré-históricos. O atraso na adaptação fisiológica a um novo ambiente onde as fontes de alimentos são abundantes vem sendo considerado como uma das causas de morbidades (Eaton & Eaton III, 2000).

Embora haja diversos fatores que influenciam o comportamento alimentar, este pode ser caracterizado pela confluência de dois *drives*¹ complementares: o homeostático e o hedônico. O sistema homeostático controla o balanço energético por meio do aumento da motivação para a procura do alimento quando os estoques energéticos estão diminuídos. Por sua vez, a regulação hedônica baseia-se na recompensa ou no prazer e pode sobrepujar-se ao controle homeostático mesmo não havendo desequilíbrio homeostático, ou seja, mesmo o organismo não carecendo de energia (Lutter & Nestler, 2009). Quando essa regulação passa a gerar comportamentos excessivos e patológicos, podem surgir quadros de compulsão alimentar.

A compulsão alimentar, inicialmente descrita por Stunkard (1959), é caracterizada por episódios rápidos de excessivo consumo de alimentos sob condições em que não há necessariamente sinais fisiológicos de fome (Davis, Levitan & Carter, 2007). Episódios

¹ A motivação é um termo amplo e que se refere a uma variedade de fatores neuronais e fisiológicos que iniciam, sustentam e controlam o comportamento. Os estudos biológicos da motivação, até recentemente era reduzido aos estudos de estados fisiológicos simples ou homeostáticos, chamados estados motivados (Kande, Schwartz & Jessel, 2003), portanto os estados motivados são processos homeostáticos relacionados à fome, sede e regulação da temperatura e compreendem apenas subtipo dos estados motivacionais que controlam o comportamento. Os estados motivados apresentam três funções: direcionam o comportamento em direção a, ou para longe, de um propósito específico; organizam comportamentos individuais em uma sequencia coerente e direcionada a uma meta e aumentam o alerta geral, energizando indivíduo para agir. Fatos que remetem aos processos evolutivos e ao instinto de sobrevivência do ser humano. No controle da ingestão alimentar não apenas fatores homeostáticos controlam o que e quanto o individuo vai ingerir, mas que também fatores hedônicos o fazem.

freqüentes de compulsão alimentar podem, por sua vez, constituir o transtorno de compulsão alimentar periódica (TCAP).

O TCAP não está listado na quarta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais – DMS IV (1994), porém seu diagnóstico segue os critérios de “transtornos alimentares”, previstos no manual. A tomada de consciência dessa condição se espelha em sua especificação como “transtorno de compulsão alimentar” e está determinada na edição revisada do DSM-V, ainda em edição (<http://www.dsm5.org/ProposedRevisions/Pages/EatingDisorders.aspx>). O TCAP constitui um grande problema de saúde pública e de difícil tratamento eficaz, pois, por um lado, está fortemente associado a outras co-morbidades, como obesidade, transtornos de ansiedade (Varela-Casal, Maldonado & Ferre, 2011) e depressão, e, por outro, tem grande interação com variáveis ambientais (Delinsky, Derenne & Becker, 2008; Salett et al., 2008).

Com efeito, as características da compulsão alimentar assemelham-se a comportamentos observados em indivíduos dependentes de droga, quais sejam: perda do controle, impulsividade e ansiedade em períodos de abstinência (Koob, 1992). Ademais, atualmente, outros comportamentos como jogos e sexo (Avena, Rada & Hoebel, 2006), além da própria comida, têm sido definidos como análogos à dependência devido à sua similaridade de diagnóstico, o que possibilita uma interpretação mais ampla do conceito de compulsão (para além da associada às drogas de abuso).

A manifestação dessa perda de controle, no caso da comida, caracteriza-se pelo aumento da freqüência e da quantidade de alimento ingerido (Corwin & Grigson, 2009). Em humanos, geralmente, os episódios de compulsão alimentar acompanham-se de sensação de culpa e desgosto (DSM IV). Por outro lado, nem todo comportamento de comer em excesso se encaixam

nos padrões caracterizados pela dependência, pois, para alguns indivíduos, ingerir grandes quantidades de alimento não gera necessariamente prazer ou recompensa e pode estar relacionada apenas a necessidades fisiológicas (Drewnowski & Darmon, 2005).

A palatabilidade é um fator que está diretamente relacionado a comportamentos de ingestão excessiva. A maioria dos relatos clínicos de indivíduos com distúrbios alimentares, como o TCAP e a bulimia nervosa relatam ingerir alimentos ricos em gordura, carboidratos ou os dois; É difícil de imaginar que alguém tenha compulsão alimentar por brócolis ou cenoura, pois, evolutivamente tais alimentos não proporcionam calorias suficientes para torná-los atraente (Pelchat, 2009).

A compulsão alimentar pode estar associada a outros transtornos psiquiátricos, como a depressão, a dependência, o uso de substâncias de abuso e a ansiedade. Sendo esta última foco do nosso trabalho, a sessão seguinte conceituará ansiedade e apontará as relações entre ansiedade e compulsão alimentar.

Ansiedade

A ansiedade é uma resposta normal a situações ameaçadoras que sinalizam um perigo em potencial, e pode contribuir para o domínio de uma circunstância difícil e para a preservação do ser. Entretanto, pode ser provocada inadequadamente por eventos que não apresentam perigo real. Nesses casos, a ansiedade é considerada patológica: quando for excessiva e crônica ou quando não servir mais para sinalizar perigo (Kandel, Schwartz & Jessell, 2003).

O TCAP está associado a elevados níveis de ansiedade e depressão em humanos, também demonstrado em modelos animais (Avena, Bocarsly, Rada, Kim & Hoebel, 2008; Galanti, Cluck & Geliebter 2007). Ademais, Schulz e Laessle (2010) demonstraram relação direta entre ansiedade e TCAP, independentemente do fator obesidade.

Sob o aspecto fisiológico, pesquisas têm demonstrado o papel de vários neurotransmissores mediadores da ansiedade. Dentre eles encontra-se a serotonina (5-HT), objeto de investigação do nosso estudo. Níveis de 5-HT em áreas de projeção dos núcleos da Rafe aumentam com a ansiedade tanto em animais como em humanos (Andrews, File, Fernandes, Gonzales, Barnes & 1997; Bailer et al., 2005), e a inibição ou ablação dos neurônios serotoninérgicos nesse núcleo reduzem a ansiedade em modelos animais (Andrews et al, 1997; File, Gonzales & Andrews et al 1996; Santos, Andrade & Zangrossi et al, 2005).

5-HT nos Comportamentos de Ansiedade e Ingestão alimentar

A 5-HT exerce influência sobre diversos sistemas fisiológicos, como: ciclo sono-vigília, controle da atividade motora, da temperatura corporal, do comportamento alimentar (De Vry e Schreiber, 2000; Halford, Boyland, Blundell, Kirkham, & Harrold, 2005), da agressividade e do comportamento sexual (Goodnick & Goldstein, 1998,). Além disso, o sistema serotoninérgico atua na regulação de respostas relacionadas com o estresse (Chandler-Laney et al., 2007), com a depressão (Barnes e Sharp, 1999; Millan, 2006) e com a modulação de estados de ansiedade (McNaughton & Gray, 2000; Millan, 2003; Cools, Roberts & Robbins, 2008).

A 5-HT tem vários receptores, e cada um destes subdivide-se em classes. Até o presente momento foram identificados mais de 14 subtipos de receptores, cujo papel no controle homeostático vem sendo demonstrado.

A regulação da ingestão alimentar e do peso corporal envolvem a integração e integridade de várias estruturas do sistema nervoso central (SNC). Leibowitz e Alexandre (1998) reportam o papel da 5-HT no núcleo ventromedial do hipotálamo na mediação da saciedade. Porém, outras regiões do cérebro também participam da regulação do comportamento alimentar.

Gril e Kaplan (2002) demonstram que injeções de agonistas serotoninérgicos no quarto ventrículo também promovem efeito anoréxico em animais.

Em artigo que compila as principais drogas utilizadas para a diminuição do apetite ao longo dos anos, Adan, Vanderschuren, e la Fleur (2008) aponta que os agonistas serotoninérgicos (e também os monoaminérgicos) têm sido usados como inibidores de apetite desde a década de 1920. Assim, agentes farmacológicos que propiciam o aumento da atividade serotoninérgica no SNC inibem a ingestão de alimentos e assim podem promover a perda de peso. Por outro lado, Fetissov e Meguid (2010) concluem que a 5-HT pode agir de maneira diferenciada em animais normais e obesos no controle da saciedade, indicando uma possível resistência serotoninérgica nos animais acima do peso normal.

Não está completamente esclarecido, no entanto, quais os receptores serotoninérgicos que estão envolvidos na homeostase. Além disso, as projeções serotoninérgicas oriundas do núcleo da rafe ramificam-se por quase todo o encéfalo (Heisler, Cowley & Kishi, 2003), o que dificulta o esclarecimento pleno do papel da 5-HT no controle da ingestão alimentar. Outro complicador é o fato de esse controle da ingestão, mediado pela saciedade, diferir entre sujeitos normais e obesos (Fetissov & Meguid, 2010).

Manipulações farmacológicas em humanos e modelos animais têm demonstrado consistentemente que o aumento da atividade serotoninérgica por meio de agonistas de receptores dos tipos 5-HT_{1B} e 5-HT₂, por exemplo, resultam na supressão da ingestão alimentar (Blundell, 1991). Esse efeito anorexígeno é mediado pelo aumento da expressão de pró-opiomelanocortina (POMC) em regiões hipotalâmicas (Heisler, Cowley & Kishi, 2003).

Resultados obtidos por meio de testes com agonistas de receptores 5-HT_{1A}, como o 8-OH-DPAT ou bupirona (ansiolítico serotoninérgico) também demonstraram a ação da 5-HT no

comportamento alimentar, uma vez que as drogas causaram hiperfagia em ratos saciados (Luck, 1992). Os receptores 5-HT_{1A} atuam, portanto, de forma regulatória, e acredita-se que, em condições normais, a 5-HT exerce função tônico-inibitória, influenciando a motivação pela comida.

Estudos em humanos com tomografia computadorizada e ligantes radioativos específicos para 5-HT revelaram alterações nos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} e nos transportadores de 5-HT (Kaye et al., 2005) em indivíduos com distúrbios alimentares. Sugere-se, assim, que alterações nos níveis de 5-HT ativam o gatilho que leva a desordens alimentares como a bulimia e anorexia nervosa (Milano, Siano, Putrella & Capasso, 2005). Baleir (2005) mostra que mulheres recuperadas de bulimia e anorexia nervosa apresentam uma *up-regulation* dos receptores do tipo 5-HT_{1A} tanto nos núcleos da rafe quanto no córtex cerebral e conseqüentemente uma *down-regulation* dos receptores pós-sinápticos 5-HT₂. Ademais, Vickers, Clifton, Dourish e Tecott, (1999) por meio de modelos experimentais com ratos normais e mutantes (*knockout* para 5-HT_{2C}), demonstraram o importante papel desses receptores na expressão da saciedade em resposta ao tratamento com D-fenfluramina (agonista serotoninérgico). Pode-se, portanto, concluir que a regulação da ingestão alimentar é mediada por determinados receptores e por ativação de áreas específicas no SNC.

A relação entre a ansiedade e o comportamento alimentar tem sido demonstrada por Avena, Bocarsly, Rada, Kim, Hoebel (2008), os quais relatam que animais, ao serem privados da ingestão de soluções palatáveis, ricas em carboidratos, apresentam comportamentos similares àqueles apresentados por usuários de drogas em período de abstinência, como elevados níveis de ansiedade.

Assim como drogas de abuso, que promovem um aumento da atividade dopaminérgica, o comportamento alimentar compulsivo também é mediado pelo sistema de recompensa (ativação da via mesolímbica). O alimento em humanos e modelos animais serve como uma espécie de reforço, tal como drogas de abuso.

A 5-HT, assim como a dopamina, está envolvida na regulação de vários sistemas límbicos (Koob, 2001). Antagonistas serotoninérgicos reduzem os níveis de dopamina no córtex pré-frontal e no núcleo accumbens provocados por drogas de abuso (Costall et al, 1990). Assim, a 5-HT deve modular a liberação de dopamina no prosencéfalo límbico por induzir a sua liberação na área tegmental ventral (ATV), (Morgane Galler & Mokler, 2005).

Pratt, Blackstone, Connolly e Skelly (2009) foram os primeiros a demonstrar que a manipulação farmacológica por meio de agonistas dos receptores 5-HT_{1/7} e 5HT_{2C} injetados bilateralmente na região medial do NAcc diminui, de forma dependente da dose, a ingestão alimentar de ratos em duas situações: ração para animais privados e gordura com açúcar para animais saciados. Surpreendentemente, ao utilizarem antagonistas desses receptores não foi observado nenhum efeito no comportamento alimentar, sugerindo então uma função fásica do controle da ingestão alimentar.

Enquanto o papel dos receptores 5-HT_{1,2} na regulação do comportamento alimentar esta bem descrita na literatura, os estudos sobre o papel específico dos receptores 5-HT₄ no comportamento alimentar é recente e foi inicialmente demonstrado por Compan et al. (2004). Foi relatado que tanto animais normais sob a ação de RS39604 (antagonista de 5-HT₄) como animais mutantes (*knockout* para 5-HT₄) apresentaram hipossensitividade para a anorexia induzida pelo estresse. O papel dos receptores centrais de 5-HT₄ nas áreas límbicas também tem sido observado na mediação da ansiedade, memória e cognição.

Núcleo accumbens

O NAcc é uma interface entre a motivação e a ação (Mogeson, 1990; Koob, 1992). O NAcc recebe aferências de estruturas do prosencéfalo límbico, direta ou indiretamente (através da ATV), e envia sinais para o sistema motor através do globo pálido. Está envolvido nas respostas motoras orais, utilizadas na alimentação, na ingestão de água, na vocalização e em outras respostas adaptativas (Mogenson et al, 1980).

Pode-se, dividir anatomicamente o NAcc em duas partes principais, centro (*core*) e concha (*Shell*). A literatura aponta a região da concha do NAcc como uma região responsiva à ingestão de alimentos principalmente no que concerne a ingestão de alimentos palatáveis, ricos em gordura e/ou carboidratos (Bassareo & Di Chiara, 1999; Kelley, Baldo, Pratt & Will, 2005b); Recentemente Crause, German, Taha e Field (2010) mostram, através de registros eletrofisiológicos, que a inativação de uma subpopulação de neurônios do NAcc é necessária para iniciar e manter a ingestão de alimentos palatáveis (solução de sacarose), corroborando o papel dessa estrutura na ingestão alimentar.

O uso de ansiolíticos clássicos (benzodiazepínicos) tendem a aumentar o apetite. Estudos clínicos mostram que injeções de Baclofen (agonistas gabaérgicos) intracerebroventricular (0,1 e 5nmol) mostrou aumentar a ingestão alimentar de ratos saciados, no entanto sabe-se que drogas administradas nessa região se espalham para outras regiões do encéfalo (Ebenezer, 1990). Posteriormente, Ebenezer e Preingle (1992) relataram que Baclofen aumenta a ingestão alimentar em ratos saciados, também quando injetado por via sistêmica. Lopes et al., (2007) ao testarem os efeitos de agonistas gabaérgicos (Baclofen e Muscimol) especificamente na concha do NAcc, discorrem sobre o efeito ansiolítico das drogas em modelos animais de ansiedade, porém não encontram nenhum efeito anorexígeno. Já Buda-Levin, Wojinicki e Corwin (2005) relatam que a

administração periférica de Baclofen promove redução da ingestão de gordura em ratos submetidos ao protocolo de intermitência em duas horas. Esses dados podem sugerir que a modulação do comportamento alimentar no caso da compulsão difere da regulação homeostática, uma vez que foi também relatado um discreto aumento na ingestão de ração.

Modelos animais de Compulsão alimentar

Para se estabelecer um modelo de compulsão alimentar em animais, é preciso estabelecer comportamentos similares ou análogos àqueles presentes em humanos. Busca-se, por meio de diferentes modelos, o excessivo consumo de alimentos em curto período de tempo em quantidade superior do que em grupos controle sob as mesmas condições (Mathes, Kimberly, Brownley, Mo, & Bulik, 2009). Essa característica da compulsão alimentar está presente nas descrições do DSM e é possível de emulação em animais.

É necessário desenvolver modelos animais para avançar o entendimento de comportamentos repetidos intermitentes e excessivos, como é o caso da compulsão alimentar em humanos. Se voltarmos à literatura, veremos que todos os modelos animais até o momento desenvolvidos são baseados em modelos isomórficos. No caso específico de compulsão alimentar, o modelo deve apresentar duas características: 1) ocorrer repetidamente durante longo período de tempo e 2) animais compulsivos devem ingerir significativamente mais comida do que controles em situações semelhantes.

Estão descritos na literatura vários modelos animais que geram comportamentos compulsivos. A maioria dos modelos está associados ao estresse, como é o caso do modelo de isolamento social, proposto por Muller et al.(1969); O de restrição alimentar (privação) seguido pela oferta de alimento, de Hangan e Moss, (1997) e o de restrição seguido por oferta de

alimento acrescido de um choque nas patas porposto por Hagan et.al., (2002). O modelo descrito por Hagan foi inicialmente proposto para bulimia nervosa.

O modelo animal criado por Corwin e por nós escolhido foi o de intermitência ao acesso de gordura, um modelo isomórfico, de validade interna e de constructo. Um ponto positivo deste modelo é, por não privar os animais de ração e água, evita possíveis confusões entre fome e o comportamento compulsivo. (Araujo-Held, Martin, de Sousa Almeida, Luscher, & Corwin, 2002; Corwin & Buda-Levin, 2004; Corwin & Wojnicki, 2006).

Este modelo animal de compulsão baseia-se na intermitência ao acesso de gordura. Sabe-se que a intermitência esta fortemente associado a comportamentos compulsivos e que normalmente indivíduos com distúrbios alimentares ingerem grandes quantidades de alimentos ricos em gordura e/ou açúcar. O modelo é constituído de dois diferentes grupos de animais que recebem a gordura em duas escalas (três dias da semana durante uma hora *versus* sete vezes na semana durante o mesmo período de tempo) , isto é, os animais que tem um menor acesso semanal tende a ingerir quantidades significativamente maior de gordura, mimetizando assim um episódio de compulsão alimentar em humanos. A linha de base, no caso deste modelo é a quantidade de ingestão do grupo com acesso diário a gordura, de forma que se considera um episódio confiável de compulsão quando os animais que tem intermitente (três vezes por semana por uma hora) ingerem significativamente mais gordura do que o grupo com acesso diário. De acordo com a literatura, é a partir da segunda semana que, os animais submetidos à alta restrição de gordura (três vezes por semana) apresentam aumento na ingestão de gordura e, a partir da quarta semana, ingerem significativamente mais gordura do que animais submetidos a uma restrição menor (acesso diário à gordura). Para fins didáticos chamaremos o grupo que recebe gordura ou chocolate (ver material e métodos) de HR, vindo do inglês *High Restriction* (alta

restrição) e os animais que recebem gordura diariamente pelo mesmo período de tempo de *Low Restriction* (baixa restrição). Sugere-se a leitura completa do artigo *Binge Eating in Rats with Limited Access to Vegetable Shortening* (Corwin & Wojnicki, 2006) para compreensão mais completa do desenvolvimento do protocolo.

No referido protocolo, foi oferecida gordura vegetal pura, e os animais apresentaram episódios de compulsão, demonstrando que há fatores para além da palatabilidade dos alimentos que causam o comportamento compulsivo. Dessa forma, Corwin (2004) estabelece relação direta entre a compulsão e a intermitência da oferta de gordura, pois ela demonstra que não há a necessidade de privar o animal de ração no dia anterior. De fato, Corwin, ao isolar os animais consegue mostrar o padrão alimentar diferenciado entre os grupos, ou seja, os animais que recebem gordura de maneira mais intermitente (segundas, quartas e sextas – HR) apresentam uma diminuição no consumo de ração (em 24h) no dia posterior, chegando a ingerir menor quantidade de ração que os animais do grupo controle (aqueles que nunca receberam gordura), de forma a se pensar que o comportamento compulsivo na gordura seria uma compensação calórica devida a auto-restrição no dia anterior. Essa hipótese foi refutada através de experimentos de forma a mostrar que há uma relação direta entre a intermitência do acesso e a ingestão excessiva, sem que esta seja decorrente de uma compensação.

Não há, contudo, como negar que a compulsão alimentar não esteja também relacionada com comidas palatáveis (Davis et al., 2007a), pois, como Kales (1990) relatou, 69% do conteúdo de alimentos consumidos em surtos de compulsão por bulímicos eram ricos em gordura, bem como demonstraram os dados obtidos no presente trabalho.

O protocolo de intermitência prevê que os animais sejam alojados em gaiolas individuais. No entanto, o isolamento social é um fator de estresse e depressão (Matsumoto, Pinna, Puia,

Guidotti, & Costa, 2005); Corroborando a este ultimo relato, em nosso estudo piloto, observamos que os animais, ao serem alojados individualmente apresentaram comportamentos agressivos e estresse elevado, observados pela piloereção, sangramento nasal e secreção da glândula amágrima.

Análise Estatística

Os resultados estão expressos por meio de médias de ingestão de cada grupo \pm erro padrão da média (EPM). Todos os grupos foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-wilk*). Para análises entre grupos analisou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via. O teste de Tukey foi aplicado para identificar as possíveis diferenças entre grupos. Análises intra-sujeito foram procedidas através de teste t para amostras pareadas. Apenas valores com probabilidade de acaso menores do que 5% foram considerados como significativos.

Estudo Piloto

Na sexta semana de protocolo, segundo a ANOVA de uma via, os animais não apresentaram diferença significativa no consumo de gordura (Figura 1) entre HR e LR, ao contrário do que era esperado de acordo com o protocolo de intermitência. Além disso, ao testá-los no LCE, observamos mais de 90% do tempo de permanência dos braços fechados para os três grupos: GC, HR e LR (dados não mostrados).

Analisando a evolução do consumo de gordura semanal de cada grupo isoladamente, não se observou uma diferença entre os grupos HR e LR de G1, embora se observe um aumento progressivo no consumo do alimento para ambos os grupos (figura 1).

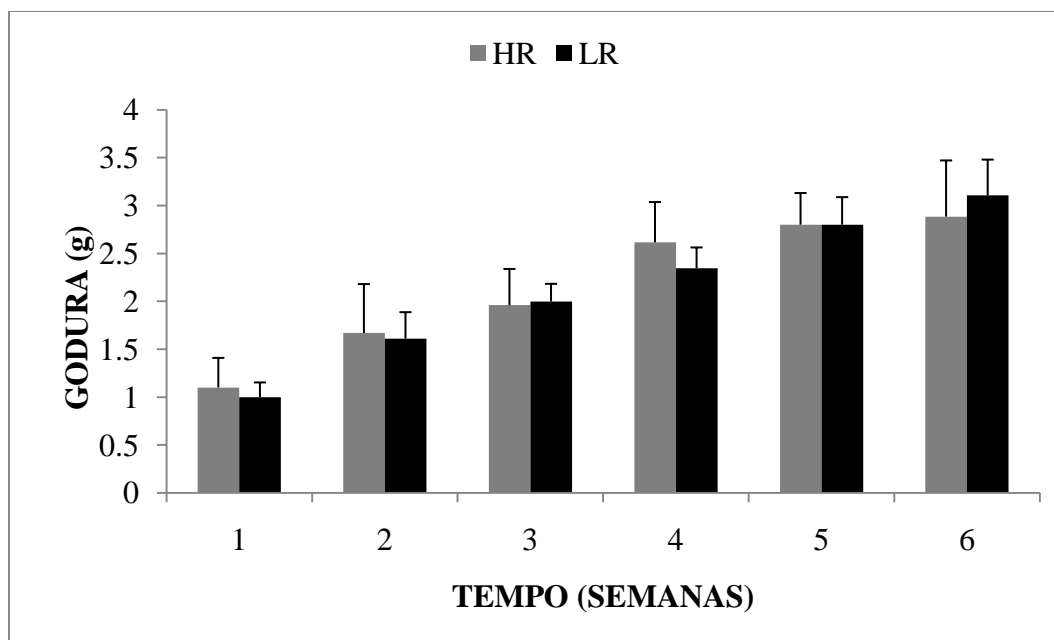


Figura 1. Média (\pm EPM) do consumo de gordura de G1, em 1 hora entre os grupos HR e LR no decorrer de seis semanas.

Por essa razão decidimos adaptar o modelo desenvolvido por Corwin a fim de testar se é possível gerar comportamento compulsivo mesmo com a diminuição das variáveis isolamento social e ambiente restrito, ao manter os animais em trios.

Objetivo

Com base no exposto acima, propomos, primeiramente, adaptar o protocolo, e retirar o fator de estresse do isolamento social para melhor avaliar a intermitência como preditor de comportamento compulsivo.

Propomos ainda a investigar a participação dos receptores 5-HT₄ da concha do NAcc durante a ingestão alimentar de animais submetidos ao protocolo de intermitência ao acesso de gordura adaptado por nós.

Haja vista que a compulsão alimentar em humanos está fortemente relacionada a elevados níveis de ansiedade (Frazonni et al., 2009), Propomo-nos ainda a investigar se os

animais submetidos ao protocolo de Corwin adaptado, apresentam difentes comportamentos de medo/ansiedade através do teste do LCE.

Por fim, pretendemos analisar se a palatabilidade do alimento altera a ingestão alimentar de animais submetidos ao modelo de intermitência adaptado, oferecendo chocolate ao invés de gordura como alimento-teste

Materiais e métodos

O presente estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal; os protocolos de experimentação foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética ao Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC e está subscrito no protocolo PP477.

Animais

Utilizaram-se ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), com aproximadamente 60 dias de vida (\pm 280g de massa corporal), provenientes do biotério central da UFSC. No estudo piloto (grupo 1 – G1), os animais foram mantidos em gaiolas individuais e receberam gordura vegetal como alimento teste. Os animais do grupo 2 e 3 (G2 e G3) foram mantidos em trios (ver adaptação do protocolo) em caixas de polipropileno (49x34x16cm). O G2 recebeu gordura vegetal e o G3 recebeu chocolate. Como poderá ser observado posteriormente esse terceiro grupo foi utilizado para analisar o efeito da palatabilidade,o que justifica a utilização do chocolate. Didaticamente os animais do G3 serão referidos como HRcho e LRcho.

Para todos os grupos, ciclo claro e escuro de 12 horas cada (luzes se apagavam às 18h), temperatura de $23 \pm 2^\circ$ C e água e ração *ad libitum* foram providos durante todas fases do experimento, inclusive no período em que recebiam o alimento-teste.

Dieta

Os animais tiveram acesso à ração em forma de grãos (Nutrilab CR-1) e água *ad libitum*. Neste protocolo de intermitência, optamos por oferecer aos animais gordura vegetal (PRIMOR©) adicionada de 10% de açúcar para proporcionar um alimento mais palatável. Essa mistura de gordura com açúcar (9.4 kcal/g) era servida em xícaras de vidro transparentes com capacidade para 30ml.

Para testar a palatabilidade do alimento, ofertamos chocolate para outro grupo, (G3) de animais, a fim de averiguar se ela influenciaria na quantidade ingerida. Dessa maneira, seguimos o protocolo da mesma maneira que fizemos para o grupo que recebeu gordura com açúcar e ofertamos chocolate branco (GAROTO© - 5.5kcal/g). O chocolate era servido em tabletes colocados dentro de xícaras de vidro do mesmo tipo das do grupo anterior.

Protocolo adaptado

Conforme mencionado, utilizamos o protocolo de intermitência de oferta à gordura, mas não conseguimos replicar os dados de Corwin, de forma que de acordo com a premissa do protocolo (diferença estatística entre o consumo de HR e LR) não poderíamos afirmar que os animais estavam com comportamento compulsivo, embora, como poderá ser observado os ambos os grupos de animais estavam consumindo grandes quantidades de gordura. Portanto, hipotetizamos que o isolamento social, e o pequeno espaço das gaiolas individuais foram fatores que influenciaram no consumo alimentar dos animais deste grupo (G1). Decidimos então, adaptar o protocolo, e manter os animais em trios, e isolá-los apenas no momento em que lhes era oferecido o alimento-teste.

Para analisar a quantidade de gordura ingerida em uma hora, os animais precisaram ser individualizados por esse período. Sabe-se que roedores têm o olfato aguçado e que reconhecem o ambiente pelo cheiro. Portanto, para evitar a neofobia e a interferência de outras variáveis, cada animal foi colocado em uma gaiola individual, do tipo metabólica, durante o experimento com o alimento-teste. Os animais foram cuidadosamente manipulados e transportados até a gaiola onde receberam o alimento-teste prioritariamente 2 horas antes do início do ciclo escuro e passado o período de uma hora retornaram às suas caixas-hospedagem

Antes do início do acesso intermitente, o alimento-teste foi disponibilizado durante a noite nas caixas-hospedagem a fim de permitir o contato inicial e adaptação ao alimento-teste. Feito isso, os animais passaram por um período de habituação de três dias na gaiola metabólica, por uma hora, na presença do alimento-teste. A quantidade de alimento ingerida foi aferida e registrada ao final de cada sessão. Utilizou-se a média de ingestão dos três dias de cada animal para designá-los em grupos. Os grupos foram escolhidos de maneira que a média de ingestão de gordura nos três dias de adaptação não fosse estatisticamente diferente, propiciando assim grupos semelhantes. Os animais que não ingeriram o alimento-teste foram utilizados como controle.

Os grupos experimentais, tanto para os que receberam gordura quanto para os que receberam, chocolate foram assim divididos:

- a) HR e HRcho : “*High Restriction*”: Animais recebem alimento-teste três vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras) durante uma hora.
- b) LR e LRcho: “*Low Restriction*”: Animais recebem alimento-teste sete dias na semana durante uma hora.
- c) GC: Grupo controle: Recebe apenas ração.

Durante todo o período do experimento, incluindo a hora em que os animais receberam o alimento-teste, a ração estava disponível *ad libitum*. Todos os animais de cada grupo experimental foram mantidos sob a dieta por no mínimo quatro semanas. Os registros de ingestão do alimento teste foram realizados diariamente, e o consumo semanal foi determinado pela média de três dias para ambos os grupos (HR e LR).

A figura 2 mostra os resultados referentes a ingestão de gordura vegetal com 10% açúcar durante uma hora dos animais HR e LR enquanto a figura 3 mostra o consumo de ração e gordura do grupo HR nos dias em que é apresentado a gordura e nos dias em que não é, nas semanas um e quatro respectivamente.

Observa-se na figura 2 que após essa adaptação no protocolo, os animais apresentaram diferença significativa a partir da segunda semana, em relação ao consumo de gordura em uma hora [$F(11,29) = 13, p < 0,05$], estabelecendo-se assim o comportamento do tipo compulsivo, conforme a premissa do protocolo. Nota-se que, conforme determina o protocolo, a média da primeira semana entre os grupos não é estatisticamente diferente [$F = (1,34) = 3,21, p < 0,05$]. O teste t para amostras dependentes aponta diferença significativa no consumo de ração do grupo HR entre as semanas 1 e 4 [$t(19) = -3,7, p < 0,05$]. Este evento não é observado no grupo LR [$t(15) = 0,09, p > 0,05$].

Em relação ao consumo de ração nota-se que os animais do grupo HR comem significativamente mais ração em uma hora nos dias em que não há disponível a gordura [$t(16) = -4,3, p < 0,05$]. Em dias que não é apresentado a gordura o grupo HR consome uma quantidade maior de ração do que GC no mesmo período de tempo [$t(21) = 2,7, p < 0,05$].

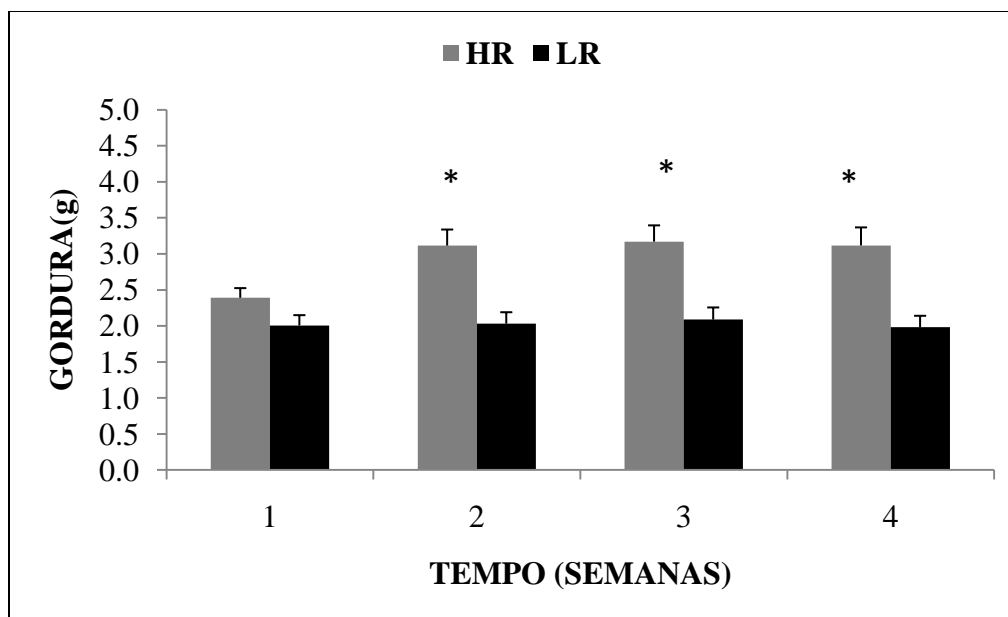


Figura 2. Média (\pm EPM) do consumo de gordura de G2, em 1 hora entre os grupos HR e LR no decorrer de quatro semanas. * indica diferença estatisticamente significativa HR e LR nas semanas 2 a 4, considerando $p < 0,05$.

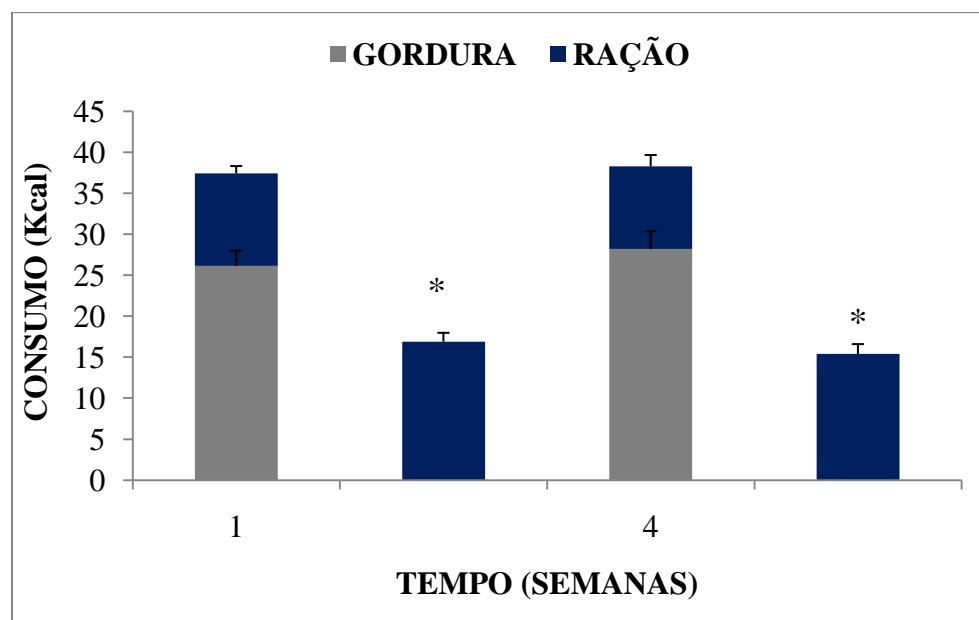


Figura 3. Média (\pm EPM) da quantidade calórica (Kcal) consumida em uma hora pelo grupo HR nas semanas um e quatro. Barras cinza mostram a quantidades de gordura e barras azuis a de ração consumidas em uma hora. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao consumo de ração quando há presença de gordura, considerando $p < 0,05$.

Sob o aspecto da palatabilidade, para um terceiro grupo (G3), oferecemos chocolate em vez de gordura e observamos que o protocolo adaptado não gerou diferença significativa no consumo do alimento em uma hora entre os animais HRcho e LRcho [$F(1,11)=0.2$, $p>0,05$] (Figura 4). Observa-se, no entanto, que a análise intra-sujeito, há um aumento significativo no consumo de chocolate entre a primeira e a última semana dentro de cada grupo. O teste t para amostras pareadas foi significativo tanto para HRcho [$t(7)=-2,3$, $p<0,05$] quanto para LRcho [$t(6)=-3,9$, $p<0,05$], comparando a primeira com a última semana.

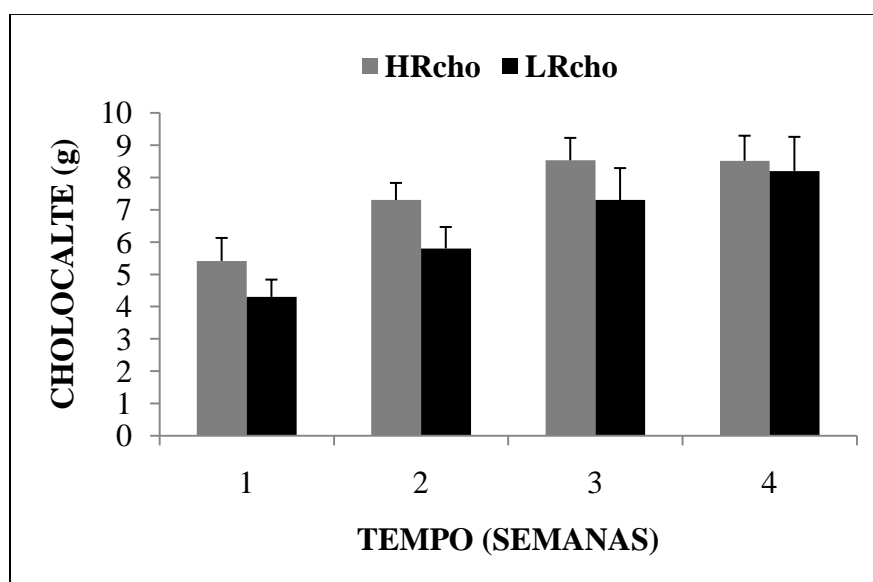


Figura 4. Média (\pm EPM) do consumo de chocolate, em 1 hora entre os grupos HRcho e LRcho no decorrer de quatro semanas.

Em relação ao peso corporal dos animais, não observou-se diferença dignificativa entre os grupos em relação ao GC. A figura 5 mostra o ganho de peso no decorrer das quatro semanas para os grupos, HR, LR, HRcho, LRcho e GC.

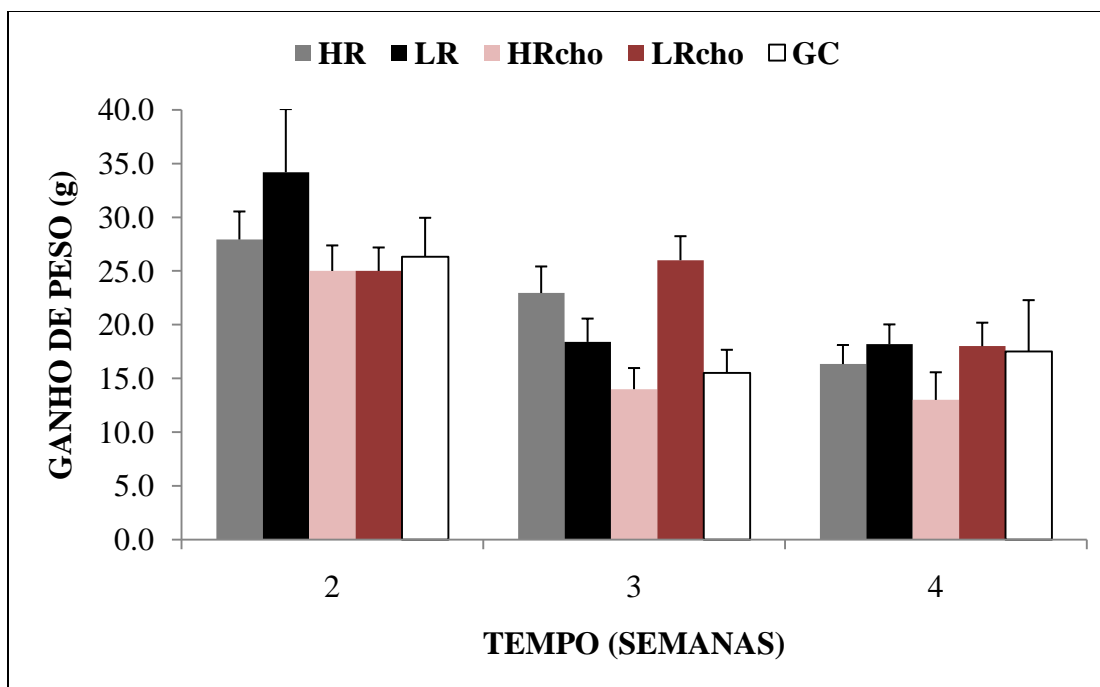


Figura 5: Média (\pm EPM) ganho de peso semanal entre os grupos HR, LR, HRcho, LRcho e GC.

Procedimentos experimentais

Análise comportamental no LCE

Ao final de quatro semanas, os animais do grupo HR, LR, HRcho e LRcho foram testados no LCE a fim de identificar possíveis diferenças comportamentais entre os grupos LR e HR. Todos os animais foram testados no labirinto entre (12 e 13h). Para os do grupo HR testou-se nos dias em que a gordura não era ofertada.

Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE é um dos aparatos utilizados para averiguar o estado de ansiedade dos animais. Esse instrumento é constituído por dois braços abertos e dois fechados, ambos com a mesma medida (50 x 10 cm) e dispostos perpendicularmente (Figura 6). Na junção entre os quatros braços, delimita-se uma área central de 10 cm². Quatro lâmpadas fluorescentes (15 w cada), dispostas igualmente em forma de cruz, 100 cm acima do labirinto, foram utilizadas como fonte

de iluminação do experimento de forma a propiciar as devidas condições causadoras de comportamentos de ansiedade.



Figura 6: Exemplo ilustrativo de labirinto em cruz elevado.

Os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto com a cabeça voltada para o braço fechado e permaneceram no labirinto por cinco minutos. Ao serem submetidos ao teste do LCE, os comportamentos investigados, abaixo listados, foram registrados por meio de uma câmera digital e salvos como arquivos de vídeo no computador. As variáveis foram posteriormente transcritas com o auxílio do Programa Etholog 2.25 (Ottoni, 2000).

Procedeu-se a análise etológica e espaço-temporal dos animais. A figura 7 descreve os comportamentos etológicos que foram analisados.

Após a exposição, o animal foi retirado e recolocado na sua caixa original. Ao fim de cada experimento, o aparato foi limpo com álcool 20% para evitar pistas odoríferas para o próximo animal a ser testado.

Figura 7: Comportamentos avaliados no LCE.

Comportamento	Descrição do comportamento
Auto-Limpeza	O animal apresenta comportamento típico de auto-limpeza, como: limpar a cabeça, as unhas, ou coçar o corpo.
Exploração Vertical	O animal explora o ambiente apoiado somente nas patas traseiras, as patas dianteiras livres e não apoiadas na base do LCE (ereto)
Avaliação de Risco (SAP)	O animal investiga em sua volta com as patas traseiras fixas na base do LCE e as patas dianteiras se move para frente, o animal observa e explora ao seu redor e retorna a posição inicial.
Avaliação de risco (Imersão da Cabeça)	O animal move sua cabeça para fora e para baixo nos braços abertos e no centro do LCE.

Resultados do LCE

A distribuição dos animais foi a seguinte: HR (n=20), LR (n=18), HRcho (n=6), LRcho (n=6) e GC (n=5).

Os níveis de ansiedade, avaliados através do teste comportamental do LCE, para o G2 e G3, não apresentaram significância entre grupos para as variáveis espaço-temporais analisada, ou seja: percentual de tempo e de entradas nos braços abertos. Observou-se também que não há diferença significativa na atividade locomotora entre os grupos, averiguada através do número total de entrada nos braços (Tabela 1).

Nas categorias etológicas analisadas, diferenças significativas [$F(4,21) = 3, p < 0,05$] entre os grupos (HR, HRcho, LR, LRcho e GC) foram encontradas para a avaliação de risco (imersão da cabeça) conforme mostra a figura 8.

Tabela 1. Média (\pm EPM) das porcentagens de tempo de permanência nos braços abertos e do total de entradas do LCE entre os grupos GC, HR e LR.

Grupos	% Tempo abertos (\pm E.P.M)	%Entrada aberto (\pm E.P.M)	Total de entradas
GC	11.31 \pm 5	20 \pm 7.8	25 \pm 6
HR	23.431 \pm 8.3	26.4 \pm 5.2	24 \pm 5
LR	29.9 \pm 6.1	35.8 \pm 5.3	13 \pm 9
HRcho	23.23 \pm 3.4	39.4 \pm 7	24 \pm 5
LRcho	9.58 \pm 4	22.7 \pm 7.6	28 \pm 4

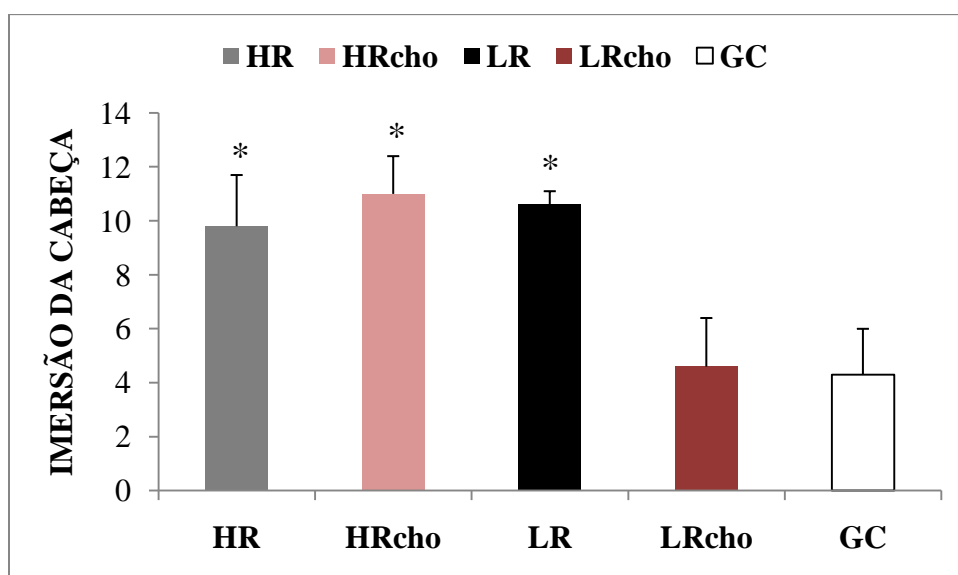


Figura 8: Média (\pm EPM) do número Avaliações de risco (imersão da cabeça) entre os grupos HR, LR, HRcho, LRcho e GC. * indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, considerando $p < 0,05$.

Avaliação da participação dos receptores 5-HT₄ da concha do NAcc

Cirurgia

Ao concluírem-se os testes comportamentais no LCE, os animais do G2, aqueles que receberam gordura vegetal, foram submetidos ao procedimento de cirurgia estereotáxica para a implantação de duas cânulas-guia. Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (87 mg/kg) e xilazina (13 mg/kg), injetada por via intraperitoneal (i.p). Em seguida, os animais eram adaptados ao aparelho estereotáxico (INSIGHT, modelo EFF331), tendo a cabeça fixada por intermédio de barras posicionadas no conduto auditivo e no focinho. Após assepsia com álcool iodado, uma incisão longitudinal foi realizada no escalpo, de forma a expor a calota craniana. A porção exposta do crânio foi raspada e seca para garantir a adesão do acrílico. A seguir, as cânulas-guia, confeccionadas a partir de um segmento de agulha hipodérmica (24G) com 15 mm de comprimento, foram posicionadas bilateralmente de acordo com as seguintes coordenadas a partir do Bregma 2 mm acima do núcleo accumbens: Antero-posterior (AP): +1,6mm; dorso ventral (DV): -5,6 mm; lateral: +1,0 mm e -1,0 mm (Paxinos & Watson, 1998). A partir das coordenadas citadas, duas incisões realizadas por meio de uma broca permitiram a implantação da cânula-guia que posteriormente foram fixadas à calota craniana por meio de dois parafusos e envolvidas por acrílico autopolimerizável.

Na fase pós cirúrgica, os animais foram tratados com 0,3 ml de Banamine®, analgésico com propriedades anti-inflamatórias e antipiréticas, (2,5 mg/ml/s.c) e Agrovét®, um antibiótico de amplo espectro (0,1 ml/i.m), a fim de diminuir o estresse pós-cirúrgico e eventuais complicações relacionadas ao procedimento.

Normalmente, os animais perdem peso após o procedimento cirúrgico, portanto, nenhum animal foi usado nessa etapa experimental enquanto seu peso fosse inferior a 5% daquele

apresentado na fase pré-cirúrgica. Depois de restabelecido o peso corporal, os animais foram tratados com a droga ou veículo para avaliar as alterações da microinjeção da droga em relação ao comportamento alimentar.

Drogas e Doses

Utilizou-se o endo-*N*-8-methyl-8-zabicyclo [3.2.1] oct-3-yl)-2,3-dihydro-3-isopropyl-2-oxo-1*H*benzimidazol-1-carboxamide hydrochloride – **BIMU-8** (SIGMA); agonista dos receptores 5-HT₄, dissolvido em solução PBS estéril e livre de pirogênicos, pH 7,4. Injetou-se, bilateralmente, 0,1 ou 5µg/0,2 µL da droga e para o grupo controle utilizou-se 0,2 µL de PBS (*Phosphate-buffered saline*).

A droga foi injetada imediatamente antes de os animais receberem o alimento-teste. O dia do teste selecionado coincidiu com o dia no qual cada grupo receberia o alimento-teste. Após a injeção, os animais eram retirados da caixa-hospedagem e colocados individualmente nas suas próprias gaiolas metabólicas onde permaneceram por uma hora. Ao final desse período, a quantidade de alimento ingerido era quantificada, e o animal retornava a sua caixa-hospedagem.

Microinjeções

O sistema de microinjeção consistiu em uma agulha gengival (30G curta,) que excedia a cânula-guia em 2 mm, ligada a um tubo de polietileno (PE10) e conectada a uma seringa de Hamilton com capacidade total de 1 µL. O procedimento de microinjeção se deu em aproximadamente 30s, e após esse período a agulha injetora permaneceu dentro da cânula guia por mais 60s a fim de evitar refluxo da droga e favorecer a absorção. Essa manobra foi realizada bilateralmente, e o volume injetado foi de 0.2 µL/lado.

Histologia

Após serem realizados os experimentos, os animais foram anestesiados com CO₂, perfundidos transcardialmente com solução salina 0,9%, seguida de formol 10%. Depois de dissecados, os cérebros permaneceram imersos em formol 10% por um período de 48h. Então, os cérebros foram imersos em solução de sacarose 30% por um período de 24horas, posteriormente, foram rapidamente congelados e cortados em fatias de 50µm de espessura por meio de um criostato. Os cortes foram dispostos em lâminas gelatinizadas e permaneceram secando por aproximadamente uma semana. Utilizou-se o método de Nissl para coloração das lâminas, e as lâminas secaram por igual período de tempo antes de serem analisadas em Microscópio Óptico (MO). A reprodução gráfica dos cortes e dos pontos de injeção foram analisados em MO a partir do atlas do cérebro de rato de Paxinos e Watson (1998).

Resultados da estimulação dos receptores 5-HT₄ da concha do NAcc

A análise histológica revelou que trinta e sete animais tiveram a cânula-guia implantada bilateralmente na região da concha do NAcc: HR (n=19) e LR (n=18). A figura 9 apresenta esquematicamente a região da concha do NAcc com a composição da distribuição dos pontos atingidos pelas microinjeções. A figura 9 ilustra as localizações das cânulas-guia.

Os animais HR (n=19) e os LR (n=18) foram divididos em três grupos e receberam PBS, como veículo, ou BIMU-8 em duas doses (0,1µg ou 5µg /0,2µL). A droga em suas diferentes doses modificou o comportamento dos ratos em relação ao consumo de gordura apenas nos animais do grupo HR. Com a menor dose (0,1µg/0,2µL) aumentou discretamente o consumo de gordura enquanto com a dose maior (5µg/0,2µL) o consumo diminui de maneira significativa comparados com o GC [F(2,22) =5,88, p<0,05].

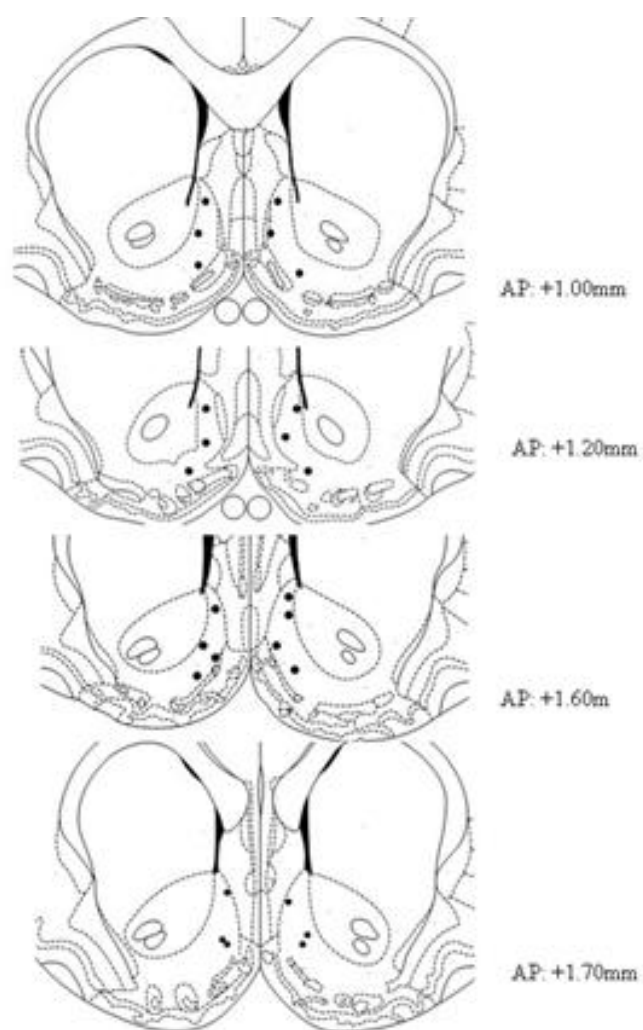


Figura 9: Ilustração com a localização das cânulas implantadas bilateralmente no NAcc. Os números à direita de cada plano indicam a distância em milímetros anterior ao *Bregma*, tomando-se como referência o atlas de Paxinos e Watson (2007).

Análises intra-sujeito também corroboram com a análise entre grupos e aponta diferença significativa para o grupo que recebeu a maior dose da droga [$t(6) = 7.33, p < 0,05$], mas não para o que recebeu a menor [$t(6) = -2,1, p > 0,05$].

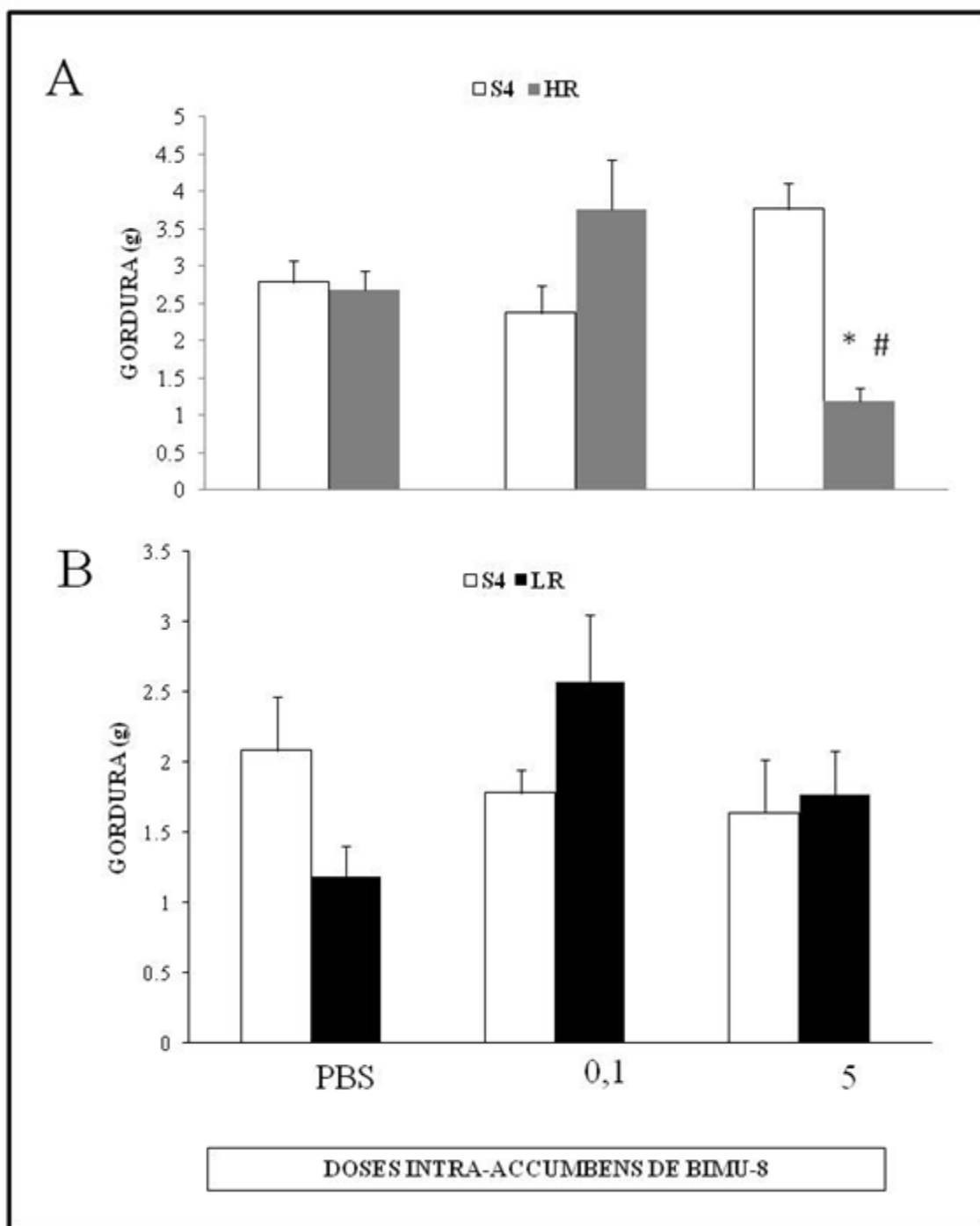


Figura 10. Média (\pm EPM) da quantidade de gordura ingerida pelos grupos HR (A) e LR (B) em hora. Comparação intra-sujeito entre a ingestão de gordura na semana 4 (S4) e as aplicações de PBS e Bimu-8 (0,1 μ g e 5 μ g/0,2 μ L) respectivamente. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao PBS e # em relação à S4, considerando $p < 0,05$.

Sob o efeito da microinjeção de BIMU-8 em relação à quantidade de ração ingerida, observa-se que ocorreu uma diminuição significativa para ambos os grupos de HR em relação ao grupo controle [$F(2,17) = 4,39, p < 0,05$]. No entanto, os animais do grupo LR que também foram submetidos ao teste com a droga, nenhuma diferença estatística foi encontrada [$F(2,15) = 0,9, p > 0,05$].

Discussão

A compulsão alimentar, sendo um distúrbio psicológico, está fortemente relacionada às interações entre o sujeito e o ambiente. Wolff, Crosby, Roberts e Wittrock (2000) apontam que a compulsão alimentar pode ser causada por interação entre dieta e estresse, portanto, um histórico de restrição cíclica de alimento e o estresse causado pelo ambiente podem ser fatores responsáveis pelo início e a manutenção dessa desordem alimentar. Corwin e Wojinick (2006) demonstraram em seu modelo de compulsão que animais sem privação calórica também podem apresentar comportamentos característicos da compulsão alimentar quando o alimento é ofertado de forma intermitente. Nesse caso, a oferta intermitente parece ser mais reforçadora para o animal do que se fosse ofertada *ad libitum*.

O estresse excessivo crônico do grupo que ficou isolado (G1) em gaiolas do tipo metabólica pode ser fator determinante para o comportamento alimentar dos ratos. O LCE demonstrou níveis elevadíssimos de medo/ansiedade, uma vez que os animais não exploraram os braços abertos. A literatura vem apontando que o estresse, p. ex, choque nas patas, contenção, isolamento social, associado à restrição alimentar, é um potente gerador de compulsão alimentar (Artiga et al., 2007, Corwin 2004).

Em nosso estudo piloto não conseguimos replicar o modelo de Corwin, ou seja, não conseguimos demonstrar diferença significativa no consumo de gordura entre HR e LR (figura

1), no entanto observamos que ambos os grupos aumentam de forma gradativa e similar o consumo de gordura. O que pode levar-nos a hipotetizar que ambos os grupos estavam apresentando comportamento do tipo compulsivo.

Embora umas das razões para termos adaptado o protocolo de Corwin foi a inexistência de diferença entre o consumo de HR e LR, nem todos os pesquisadores entendem que haja compulsão apenas quando essa variação seja estatisticamente diferente. McGee, Amare, Bennett e Duncan-Vaidya (2010), usaram o mesmo protocolo de intermitência, por 28 dias e não observaram diferença significativa entre os grupo HR e LR em relação ao consumo de gordura, nem nos comportamentos clássicos de ansiedade analisados no LCE. No entanto, verificaram que os animais HR se comportaram de maneira diferente em relação ao consumo de ração em 24h.

Rada, Avena e Hoebel (2009), descrevem que animais que recebem gordura vegetal acrescida de 10% de açúcar, sete dias na semana, também apresentam comportamento compulsivo, tal como os que recebem gordura três dias da semana. Esses autores também comparam seus grupos de animais HR e LR com um grupo de animais que receberam gordura *ad libitum* e afirmam que ambas as restrições alimentares geram comportamentos compulsivos.

Destarte, pode-se interpretar os dados de modo a entender que ambos os grupos estavam apresentando comportamento do tipo compulsivo, conquanto os dois grupos não diferissem em quantidade. Até mesmo porque, pelo modelo experimental desenvolvido por Corwin, os LR servem como linha de base a fim estabelecer e se certificar da existência do comportamento compulsivo de HR. Optamos pelos critérios e pela premissa de Corwin, pois há maior garantia do comportamento compulsivo nos animais que recebem gordura de maneira mais intermitente, portanto o paradigma pode ser mais reforçador.

Ao adaptarmos o protocolo (ver material e métodos), houve diferença significativa no consumo de gordura entre HR e LR para G2, assim como Corwin relata em seus trabalhos. Embora saibamos que em humanos a compulsão alimentar é eliciada por diversas variáveis, o que a torna de difícil mensuração, conseqüentemente de difícil tratamento, em modelos animais, torna-se mais fácil a aferição de uma determinada variável previamente citada na literatura como sendo importante para gerar comportamentos compulsivos. Sugerimos que a intermitência tem um papel fundamental no comportamento compulsivo. Animais que não estavam privados, que não estavam socialmente isolados, nem apresentavam níveis de ansiedade diferentes de GC ingeriram significativamente mais gordura que os animais LR.

O padrão de ingestão dos grupos diferiu do esperado, enquanto o consumo de HR aumentou da primeira para a segunda semana e atinge um platô, o consumo de LR foi semelhante no decorrer das quatro semanas. Uma hipótese é a de que os animais que tem acesso a gordura sete dias por semana estejam mais saciados do que aqueles que têm acesso apenas três dias na semana. Entretanto, os animais HR além de consumir significativamente mais gordura do que LR em uma hora ingeriam significativamente mais ração que o GC. Além disso, ambos os grupo G3, aquele que consumiu chocolate, ingeriu uma quantidade muito mais elevada que G2, o que de fato relativiza a questão da saciedade. Muito embora reconheçamos que G2 ingere gordura e ração durante uma hora do protocolo enquanto G3 ignora a ração e ingere apenas o chocolate.

Compulsão alimentar não esta diretamente relacionado a fome ou saciedade, conforme a literatura vem apontando.

Poderíamos hipotetizar que os animais que consomem gordura três dias na semana aumentaram o consumo em função do aumento de peso corporal, mas vimos que os animais do

grupo LR também aumentam de peso, de maneira a não diferir estatisticamente do grupo HR e do GC, sem aumentar o consumo de gordura durante as semanas.

Em relação à palatabilidade, os animais que tiveram acesso ao chocolate não apresentaram diferença significativa entre os grupos HRcho e LRcho. Se compararmos, porém, a quantidade em gramas de chocolate que os animais do grupo G3 ingerem, em uma hora, com as do grupo G2 (gordura), observa-se que G3 come aproximadamente duas vezes mais que G2. Um fato interessante observado nos animais do G3 é que, durante exposição ao chocolate, não houve consumo de ração ou este foi negligenciável. Tal observação ilustra a completa preferência pelo chocolate.

Sugere-se, a partir dos nossos resultados, que a palatabilidade dos alimentos altamente calóricos, pode gerar comportamento compulsivo seletivos, enquanto o HR de G2 passou a ingerir grandes quantidades de ração nos dias em que não tinha acesso à gordura, o HRcho de G3 apenas consumia o alimento-teste. Em parte, esse comportamento pode ser explicado pela incapacidade de os animais ingerirem ração por uma razão fisiológica (o consumo de chocolate foi muito maior que o de gordura). Quando a palatabilidade é elevada, talvez a intermitência não seja determinante para gerar compulsão ou podemos ter compulsões específicas em relação a um alimento p. ex. “chocolatras”, ou ainda devemos assumir que o ponto determinante para identificar a compulsão não seja mais bem exemplificado pela diferença estatística entre HR e LR.

Os resultados mostraram que não houve alterações significativas nos níveis de ansiedade entre os grupos de G2 e G3 em comparação com o grupo de animais que nunca receberam o alimento-teste. No entanto, diferenças foram encontradas quando se procederam análises etológicas. A categoria avaliação de risco (imersão da cabeça) foi estatisticamente maior nos

grupos HR, HRcho e LR em comparação com os animais controle. Medidas etológicas pode ser uma ferramenta mais sensível para a avaliação emocional de roedores (Rodgers, Cao, Dalvi & Holmes, 1997). Podemos entender que os animais com maior número de imersões de cabeça apresentaram maior atividade exploratória, conforme (Rodgers, Cao, Dalvi & Holmes, 1997). Uma possível explicação seria a exploração do ambiente em busca do alimento-teste, o que expandiria o rol de comportamentos do tipo compulsivo apresentado pelos ratos submetidos no protocolo. Nosso trabalho é o primeiro, até o momento, a investigar as possíveis alterações comportamentais em animais que são submetidos à modelo de intermitência, mas sugere-se a realização de novos estudos a fim de se estabelecerem as categorias etológicas relacionadas a esse modelo.

Sugere-se que a manipulação dos animais e a convivência social sejam fatores importantes para que os animais diminuam o estresse e conseqüentemente os níveis de ansiedade. É possível que o LCE, para este grupo, não tenha sido o instrumento ideal de análise e que talvez a medição dos níveis de ansiedade por meio de outro parâmetro, a partir da análise de corticosterona, possa trazer informações mais concretas sobre as possíveis alterações comportamentais que este modelo pode causar, uma vez que em outro modelo de compulsão (estresse + restrição, de Artiga et al., 2007) já fora registrado alterações nesses índices bioquímicos.

Uma possível extensão do estudo é a de testar os animais no LCE antes da realização do protocolo, a fim de avaliar os níveis basais de ansiedade. Assim, poder-se-ia analisar a correlação entre a ansiedade do animal e sua pré-disposição ao comportamento compulsivo.

Sabe-se que novos ambientes podem modificar o comportamento alimentar de animais. Muitos estudos relacionados ao comportamento alimentar testam o animal em gaiolas-teste que o

animal desconhece ou lhes é apresentado poucas vezes, o que pode levar à neofobia. O uso de gaiolas próprias e individuais para disponibilizar o alimento-teste permitiu reduzir a possível interferência de neofobia em relação ao teste. Uma vez que os animais podiam associar as gaiolas ao acesso, tanto o teste da droga como o do LCE podem ter menor influência de ambientes novos no teste.

O papel dos receptores 5-HT₄ mediando o comportamento alimentar foi descrito pela primeira vez em 2004 por Compan e colaboradores que demonstraram, a partir de um modelo *knockout* para esse receptor, que, sob condições normais, animais mutantes e normais não apresentam diferenças nos padrões alimentares. Em condições estressantes, entretanto, os animais *knockout* são menos responsivos à hipofagia induzida pelo estresse. Portanto sugere-se que se esses receptores tenham um papel importante para mediação do estresse e da ingestão alimentar.

No presente trabalho, a estimulação farmacológica dos receptores 5-HT₄, na sua dose de 5µg/0.2µL, causou diminuição extremamente significativa da ingestão de gordura no período de uma hora. Jean et al. (2007) relatam que o efeito anorético causado pela estimulação dos receptores 5-HT₄ do NAcc é mediado pelo aumento de CART (*Cocaine and amphetamine regulated transcript* - transcrito regulador de cocaína e anfetamina) em regiões do hipotálamo. Esse mesmo grupo de pesquisadores mostram que, em camundongos *knockout* para 5-HT₄, o efeito anorético é causado e a estimulação dos desses 5-HT₄ não é ocorre.

Pode-se se imaginar que a estimulação dos receptores 5-HT₄, gere um comportamento ansiogênico nos animais e que talvez isso explique o diferente comportamento dos ratos entre as doses.

Geralmente a diminuição da ingestão alimentar é mediada pela estimulação de receptores serotoninérgicos. Animais, *knockout* para os receptores 5-HT_{1B} não respondem aos efeitos anoréticos da fenfluramina. Quando os animais são *knockout* para os receptores 5-HT_{2B} essa resposta é atenuada (Vickers, Dourish & Kennett, 2001). A resposta hipofágica medida por agonistas serotoninérgicos vem sendo explicada em parte pela capacidade de estimulação de regiões do hipotálamo lateral, uma vez que ele é considerado um centro integrador de sinais centrais e periféricos relacionados ao balanço energético (Magni et al., 2009).

Como fora observado, o consumo médio de ração, para o grupo HR de G2, foi maior nos dias em que não era oferecida a gordura, ou seja, pode-se entender que houve uma compensação no consumo. Quando a palatabilidade não está envolvida, a intermitência parece gerar um comportamento compulsivo generalizado.

Nossos resultados mostram que para ambas as doses de BIMU-8 houve redução do consumo de ração. Esses dados corroboram aqueles encontrados por Jean et al, (2007) os quais demonstraram em camundongos, o papel dos receptores 5-HT₄ no consumo de ração em dois diferentes paradigmas: animais saciados e privados. Pode-se entender que a droga antecipa a saciedade, visto que para ambos os paradigmas apresentados por Jean observa-se uma diminuição significativa no consumo de ração.

O NAcc participa do circuito neural que governa a ingestão de alimentos palatáveis. A inibição de neurônios do NAcc, seja por ativação gabaérgica ou pelo bloqueio de receptores AMPA resulta em aumento da ingestão de alimentos em roedores (Lopes et al., 2007; Kelley et al., 2005a, 2005b, Basso & Kelley, 1999). Recentemente demonstrou-se que é necessária uma pausa dos disparos elétricos advindos do NAcc para iniciar e manter a ingestão. Demonstrou-se que grande proporção dos neurônios da concha do NAcc foi inibida durante o consumo de

sacarose e reforçando esse achado, uma rápida estimulação elétrica nessa área promove a pausa da ingestão da solução de sacarose (Krause, German, Taha & Fields, 2010). Esse comportamento pode ser explicado em função das conexões existentes do NAcc com o hipotálamo lateral.

Foi demonstrado por Krause, German, Taha e Fields (2010) que a inativação do NAcc promove ingestão alimentar e que um forte candidato a mediar esse processos são os neurônios do tipo 1 localizados no NAcc. A estimulação elétrica do NAcc inibe a atividade do hipotálamo lateral (HL) resultando na suspensão do apetite.

Pratt, Connolly, Skelly, & Glenn (2009) também se utilizaram da droga BIMU-8 para estimular os receptores 5-HT₄ do NAcc de ratos e observar os efeitos sobre o consumo de gordura vegetal misturada com 10% de açúcar (alimento mais palatável, de acordo com a literatura). Seus resultados, no entanto, mostraram que os animais aumentam o consumo de gordura em função da dose.

Nota-se que os dados apresentados por nós e os de Jean et al (2007) concordam em relação à diminuição do consumo de ração. Pode se entender que esse consumo está relacionado à saciedade, pois o alimento não é novo, e é a única opção de dieta do animal. No experimento de Jean et al. (2007), a gordura oferecida aos ratos no trabalho de Pratt, Connolly, Skelly, & Glenn (2009) teve período de acesso de cinco dias, tempo esse menor do que o tempo de acesso à gordura que se utilizou no presente trabalho, portanto, pode-se entender que a palatabilidade provavelmente foi mais relevante no trabalho de Pratt em função de ser ainda novidade para o animal. Em nosso trabalho, o acesso foi de no mínimo quatro semanas, podendo ter reduzido, em parte, a suscetibilidade ao alimento palatável.

Aceitando que os animais HR apresentam comportamentos compulsivos, o presente trabalho sugere que a estimulação dos receptores 5-HT₄ pode exercer papel importante nessa

mediação. O grupo HR comeu significativamente mais ração comparado ao GC em dias que não lhes era disponibilizada a gordura. A droga reduziu o consumo de gordura em sua dose maior e o de ração em ambas as doses.

Uma vez que foi demonstrado na literatura que é necessário uma inibição dos neurônios do NAcc para iniciar a ingestão alimentar, talvez a estimulação serotoninérgica, mediada pelos receptores 5-HT₄ ativam de maneira indireta os neurônios do NAcc e isso pode gerar uma inibição da ingestão alimentar.

O presente trabalho contribuiu para o esclarecimento da atuação do NAcc na mediação da ingestão alimentar e de comportamentos compulsivos relacionados ao consumo de alimentos, bem como para o desenvolvimento de modelos animais adequados para a compulsão alimentar. A palatabilidade pode interferir tanto no estabelecimento do comportamento compulsivo como nas estruturas responsáveis pela ingestão de alimento. Os receptores 5-HT₄ parecem mediar tanto a ingestão alimentar homeostática como a compulsão alimentar.

Concluimos por fim que os receptores 5-HT₄ do NAcc participam do comportamento alimentar e que em modelos de intermitência a palatabilidade gera diferentes padrões no consumo do alimento-teste. Mais estudos são necessários para investigar a intermitência do acesso quando os animais estão alojados em grupos e o estresse é diminuído. De fato o isolamento social, como fator de estresse, tem um papel importante na compulsão alimentar em modelos animais assim como é relatado em humanos. Sugerimos que este modelo de intermitência dê maior relevância à variável isolamento social.

Delimitações e perspectivas do estudo

Como mencionado acima, este estudo é, até o momento, o primeiro a relatar a participação dos receptores 5-HT₄ do NAcc em ratos submetidos ao modelo de compulsão

alimentar gerado por intermitência. Esse estudo tem algumas delimitações que devem ser pontuadas.

Os animais submetidos ao modelo permanecem na dieta, recebendo o alimento-teste por no mínimo quatro semanas, após isso eles são submetidos à cirurgia estereotáxica. Após a cirurgia os animais diminuem a quantidade de alimento ingerido, de forma que não se deve levar em consideração a quantidade do alimento-teste ingerida no período pós-operatório referente a uma semana; Tempo este necessário para o animal recuperar seu peso corporal. Feito isto os animais são tratados com a droga e testados. É somente após a histologia que se confirmam as posições das cânulas guia e, portanto, se pode incluir o animal no grupo ou não.

Embora os animais façam parte do mesmo grupo, é importante pontuar que nem sempre eles apresentam comportamentos alimentares idênticos, o que reduz, muitas vezes, a diferença entre HR e LR e torna a individualidade fato incontornável. Dessa forma, é interessante que sejam feitas análises do efeito da droga por meio de comparações intra-sujeito.

Nesse protocolo também deve ser pontuado o fato de ter de manipular um número grande de animais simultaneamente, uma vez que é preciso usar o grupo LR como forma de controle da ingestão do alimento teste.

Referências Bibliográficas

Adan R.A, Vanderschuren, L.J, & la Fleur, S.E. (2008). Anti-obesity drugs and neural circuits of feeding. *Trends Pharmacol Sci.* 29(4):208-17

American Psychiatric Association. (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV). *American Psychiatric Association*, 4^a ed, 143-7.

Andrews, N., File, S.E., Fernandes, C., Gonzales, L.E. & Barnes, N.M. (1997). Evidence that the median raphe nucleus-dorsal hippocampal pathway mediates diazepam withdrawal-induced anxiety. *Psychopharmacology*, 130, 228-234.

Araujo-Held, M., Martin, M.L., de Sousa Almeida. S., Luscher, B, & Corwin, R.L. (2002). Anxiety-related behavior in mice is affected by “bingeing” possible involvement of GABA-A receptors. *FASEB Journal* , 16 A283.

Artiga AI, Viana JB, Maldonado CR, Chandler-Laney PC, Oswald KD, Boggiano MM. I8L(2007). Body composition and endocrine status of long-term stress-induced binge-eating rats. *Physiol Behav.* 24;91(4):424-31.

Avena, Carrillo, Needham, Leibowitz, & Hoebel. (2004). Sugar-dependent rats show enhanced intake of unsweetened ethanol. *Alcohol*, 34(2-3), 203-9.

Avena, N.M, Rada, P. & Hoebel, B.G. (2006). Sugar bingeing in rats. *Curr Protoc Neurosci.* Chapter 9:Unit9.23C

Avena, N.M, Bocarsly, M.E, Rada, P., Kim, A., Hoebel, B.G. (2008). After daily bingeing on a sucrose solution, food deprivation induces anxiety and dopamine/acetylcholine imbalance. *Physiology & Behavior*, 94, 309-31.

Avena, N.M, Rada P, Hoebel BG. (2009). Sugar and fat bingeing have notable differences in addictive-like behavior. *Journal of Nutiction*, 139, 623-628.

Baldo B.A, Kelley A.E. (2007). Discrete neurochemical coding of distinguishable motivational processes: insights from nucleus accumbens control of feeding. *Psychopharmacology*, 191, 439-459.

Bassareo, V., & Di Chiara, G. (1999). Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens Shell/core compartments. *Neuroscience*, 89, 637 – 641.

Bailer, U.F., Frank, G.K., Henry, S.E., Price, J.C., Meltzer, C.C., Weissfeld, L., Chester C.A., Drevets, W.C, Wagner, A., Hoge, J., Ziolkowski, S.K, McConaha, C.W. & Kaye, W.H.(2005). Altered Brain Serotonin 5-HT_{1A} Receptor Binding After Recovery From Anorexia Nervosa Measured by Positron Emission Tomography and [Carbonyl-¹¹C]WAY-100635. *Arch Gen Psychiatry*, 62, 1032-1041.

Barnes, N.M. & Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38(8), 1083-152.

Buda-Levin A, Wojnicki FH, Corwin RL.(2005). Baclofen reduces fat intake under binge-type conditions. *Physiol Behav*.15;86(1-2):176-84.

Chandler-Laneya, P.C., Castanedab,E., Pritchetta, C.E. Smith, M.L. Giddingsa, M..

Artiga, A.I & Boggiano, M.M. (2007). A history of caloric restriction induces neurochemical and behavioral changes in rats consistent with models of depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 87(1), 104–114.

Cools, R., Roberts, A.C., & Robbins, T.W. (2008). Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. *Trends Cogn Sci.* , 12(1), 31-4

Compan, V., Charnay, Y., Duscicier, N., Daszuta, A., Hen, R., & Bockaert, J. (2004). Feeding disorders in 5-HT₄ receptor knockout mice. *J Soc Biol*, 198(1), 37-49.

Corwin, R.L (2004). Binge-type eating induced by limited access in rats does not require energy restriction on the previous day. *Appetite*, 42, 139–142.

Corwin, R.L, & Buda-Levin, A.(2004). Behavioral models of binge-type eating. *Physiology Behavior*, 82(1), 123-130

Corwin ,R.L. & Wojnick. Binge eating in rats whit limited access to vegetable shortening. *Current protocol in neuroscience*, 9.23B., 1-9.

Corwin ,R.L., & Grigson, P.S. (2009). Symposium Overview - *Food Addiction: Fact or Fiction?* 617-619

Davis C, Levitan RD, Carter J, Kaplan AS, Reid C, Curtis C, Patte K, Kennedy JL. et al. (2007a). Personality and eating behaviors: a case-control study of binge eating disorder. *International Journal of Eating Disorders*, 40, 243-250.

De Vry, J., & Schreiber, R., (1999). Effects of selected serotonin 5-HT1 and 5-HT2 receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. *CNS Research, Bayer AG, Aprather Weg* 18, D-42096.

Drewnowski, A. & Darmon, N. (2005). Food Choices and Diet Costs: an Economic Analysis. *Journal of Nutrition.*, 135(4), 900-4.

Eaton, S.B & Eaton III, S.B (2000). Paleolithic vs. modern diets – selected pathophysiological implications. *Eur J Nutr*, 39, 67–70

Ebenezer, I.S. (1990). The effect of intracerebroventricular administration of baclofen on food intake in rats. *Neuroreport.*;1(1):73-6.

Ebenezer IS, Pringle AK. The effect of systemic administration of baclofen on food intake in rats. *Neuropharmacology* 1992;31:39– 42

Franzoni, E., Monti, M., Pellicciari, A., Muratore, C., Verrotti, A., Garone, C. et al., (2009). SAFA: A new measure to evaluate psychiatric symptoms detected in a sample of children and adolescents affected by eating disorders. Correlations with risk factors. *Neuropsychiatry. Dis Treat*, 5, 207-214.

Fetissov, S. O., & Meguid, M. M. (2010). Serotonin delivery into the ventromedial nucleus of the hypothalamus affects differently feeding pattern and body weight in obese and lean Zucker rats. *Appetite*, 54(2), 346-53

File S.E.; Gonzalez, L.E.; & Andrews, N. (1996). Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *Journal of Neuroscience*, 16, 4810-5.

Galanti, K., Gluck, M.E., & Geliebter, A. (2007). Test meal intake in obese binge eaters in relation to impulsivity and compulsivity. *Int J Eat Disord.*, 40, 727-732

Grill, H.J., & Kaplan, J.M. (2002). The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front. Neuroendocrinology*, 23, 2-40

Halford, J.C., Boyland, E.J., Blundell, J.E., Kirkham, T.C. & Harrold J.A (2005). Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Curr. Drug Targets*, 6, 201-213.

Heisler, L.K., Cowley, M.A., Kishi, T., et al. (2003) Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 994, 169-174.

Lutter, M. & Nestler, E.J. (2009). Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *J Nutr. Mar*, 139(3), 629-632.

Hagan, M.M & Moss, D.E. (1997). Persistence of binge-eating patterns after a history of restriction with intermittent bouts of refeeding on palatable food in rats: implications for bulimia nervosa. *Int J Eat Disord*;22:411 – 20

Hagan , M.M, Wauford, P.K, Chandler, P.C, Jarrett, L.A, Rybak, R.J & Blackburn, K. (2002). A new animal model of binge eating: key synergistic role of past caloric restriction and stress. *Physiology Behavior*;77: 45–54.

Hopwood, E. & Stamford, J.A. (2001). Noradrenergic modulation of serotonin release in rat dorsal and median raphe nuclei via $\alpha 1$ and $\alpha 2A$ adrenoceptors. *Neuropharmacology*, 41, 433-442.

Jean, A., Conductier, G., Manrique, C., et al. (2007). Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT₄ receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens. *PNAS*, 104, 16335-16340

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (2003). *Principal of neuroscience*. Manole: São Paulo, 4^a ed. 2003. ISBN 85-204-1281-5.

Glanz, K. (2009). Measuring Food Environments: A Historical Perspective. *American Journal of Preventive Medicine*, 36, 93-98.

Kales , E.F. (1990). Macronutrient analysis of binge eating in bulimia. *Physiology of Behavior*; 48, 837-40.

Kaye, W.H., Frank, G.K., Bailer, U.F., Henry, S.E., Meltzer, C.C., Price, J.C., et al. (2005). Serotonin alterations in anorexia and bulimia nervosa: new insights from imaging studies. *Physiology Behavior*, 85, 73-81.

Kelley A.E., Baldo, B.A., Pratt, W.E., & Will, M.J. (2005a). Corticostriatal–hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiology, Behav.* 86, 773-795.

Kelley A.E, Baldo, B.A, Pratt, W.E, Will, M.J. (2005b). Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav* 86:773–795.

Krause, M., German, P.W., Taha, S.A., & Fields, H.L. (2009) Activation of nucleus accumbens neurons produces a pause in sucrose consumption. *Soc Neurosci Abstr* 35:583.510.

Krause, M., German, P.W., Taha, S.A., Fields, H.L. (2010). A pause in nucleus accumbens neuron firing is required to initiate and maintain feeding. *J Neurosci.*, 31, 30(13), 4746-56.

Koob, G.F. (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Tips*, 13, 177-184.

Lopes, A.P., Cunha I.C., Steffens, S.M., Ferraz, A., Vargas J.C, T.C. Lima , Marino – Neto, J.Faria, M.S & Paschoalini, M.A (2007). GABA_A and GABA_B agonist microinjections into medial accumbens shell increase feeding and induce anxiolysis in an animal model of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 184, 142–149.

Lowry, C.A. (2002). Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinol.* 11, 911-923.

Magni P, Dozio E, Ruscica M, Celotti F, Masini MA, Prato P, Broccoli M, Mambro A, Morè M, Strollo F. (2009). Feeding behavior in mammals including humans. *Ann N Y Acad Sci.*, 1163, 221-32.

Mary M. Boggiano, Paula C. Chandler, Jason B. Viana, Kimberly D. Oswald, Christine R. Maldonado, and Pamela K. Wauford.(2005). Combined Dieting and Stress Evoke Exaggerated Responses to Opioids in Binge-Eating Rats. *Behavioral Neuroscience*,119(5), 1207–1214.

Mathes, W.F., Kimberly A. Brownley, K.A., Mo, X. & Bulik. C.M., (2009). The biology of binge eating. *Appetite*, 52, 545-553.

Matsumoto, K., Pinna, G., Puia, G., Guidotti, A. & Costa, E.(2005). Social isolation stress-induced aggression in mice: a model to study the pharmacology of neurosteroidogenesis. *Stress*, Jun, 8(2), 85-93.

McNaughton, N., & Gray, J.A. (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *Journal of Affect Disorder.*, 61(3), 161-176.

Michael, L. & Nestler, E.J (2009). Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. *Journal of Nutrition*. 629-632.

Milano, W., Siano, C., Putrella C., & Capasso, A. (2005). Treatment of bulimia nervosa with fluvoxamine: a randomized controlled trial. *Adv. Ther.* 3, 278-283.

Millan, M.J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*, 70(2), 83-244.

Millan, M.J. (2006). Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol Ther.* 110(2), 135-370.

Miller, R.E., Mirsky, I.A., Caul, W.F. & Sakata, T. (1969). Hyperphagia and polydipsia in socially isolated rhesus monkeys. *Science*, 165, 1027–8.

Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ (2005). A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol.*;75(2):143-60.

Nestler, E.J.(2001). Molecular neurobiology of addiction. *American Journal of Addict*, 10(3), 201-17.

Otoni, E.B. Etholog 2.2: (2000). A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Res Methods Instrument Computer*, 32, 446-449.

Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates, fourth edition*. San Diego: Acedemic Press.

Pelchat, M.L. & Schaeffer, S., (2000). Dietary monotony and food cravings in young and elderly adults. *Physiol. Behav.* 68, 353– 359.

Pelchat, M.L., Johnson, A., Chan, R., Valdez, J. & Ragland, J.D. (2004). Images of desire: food-craving activation during fMRI. *Neuroimage.* 4, 1486-93

Pelchat, M.L (2009). Food Addiction in Humans. *Journal of Nutrition.* 139, 620–622

Rodgers, R.J., Cao, B.J., Dalvi, A., Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res*, 30, 289–304.

Sallet, P.C., De Alvarenga, P.G., Ferrão, Y., De Mathis, M.A., Torres, A.R., Marques, A., et al., (2009). Eating Disorders in Patients with Obsessive–Compulsive Disorder: Prevalence and Clinical Correlates. *International Journal of Eat Disord.* : 1-11

Santos, L., De Andrade, T.G., Zangrossi, Jr. H. (2005). Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the rat elevated T-maze test of anxiety. *Psychopharmacology*, 179, 733-741.

Stratford, T.R., & Kelly, A.E. (1997) GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci.*, 17, 4434–40.

Stratford TR. (2005). Activation of feeding-related neural circuitry after unilateral injections of muscimol into the nucleus accumbens shell. *Brain Research*, 28;1048(1-2):241-50

Schulz S, Laessle RG. (2010). Associations of negative affect and eating behaviour in obese women with and without binge eating disorder. *Eat Weight Disorder*. 15(4):e287-93

Tecott, L.H. (2007). Serotonin and the orchestration of energy balance. *Cell Metab.*, 6, 352–361.

Vickers S.P., Clifton P.G., Dourish C.T., & Tecott L.H. (1999). Reduced satiating effect of d-fenfluramine in serotonin 5-HT (2C) receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 143(3),309-314.

Varela-Casal, P., Maldonado, M.J . & Ferre, F., (2011). Study of the clinical profiles of patients with eating disorders in specific units. *Actas Esp Psiquiatr*. 39(1),12-9.

Wolff, G.E., Crosby, R.D., Roberts, J.A., & Wittrock, D.A. (2000). Differences in daily stress, mood, coping, and eating behavior in binge eating and nonbinge eating college women. *Addict Behav.*, 25, 205–16.

Vickers SP, Dourish CT, Kennett GA (2001) Evidence that hypophagia induced by d-fenfluramine and d-norfenfluramine in the rat is mediated by 5-HT_{2C} receptors. *Neuropharmacology* 41:200–209.

Anexo I – principais resultados da ANOVA para a análise etológica do LCE

Descrição do comportamento	GC	HR	HRcho	LR	LRcho	ANOVA (Main effects)
% entrada nos braços abertos	20± 7.8	26.4± 5.2	39.4± 7	35.8± 5.3	22.7± 7.6	(4,21)=1.39
% Entrada nos braços fechados	79.9± 7.8	73.5± 5.2	60.5± 5	64.2± 5.3	77.2± 7.6	(4,21)=1.39
Total de entradas	25.3± 3.7	24.2± 1.9	24± 4.6	31± 5.6	27.6± 4.4	(4,21)=0.5
% tempo nos braços abertos	11.3± 5	23.4± 8.3	23.2± 3.3	29.9± 6.4	9.5± 4	(4,21)=1.37
% tempo nos braços fechados	88.6± 5	76.5± 8.3	76.7± 3.3	70± 6.4	90.4± 4	(4,21)=1.37
Avaliação de risco (SAP)	3± 1	5.1± 0.4	4± 0.4	6± 1.2	5.6± 1	(4,21)=1.36
Exploração vertical	16± 4.7	12.1± 1.3	17.2± 1.6	16.3± 1.9	18.6± 1.7	(4,21)= 1,4
Ponta do braço Aberto	1.6± 0.6	2.6± 0.8	2.7± 0.8	3.6± 0.9	1.4± 0.7	(4,21)=1