

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Marli Teresinha Sita Scalcon

**Efeito da microinjeção
intracerebroventricular de
somatostatina nos comportamentos
apetitivos e de ingestão alimentar de
ratos**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2013**

Marli Teresinha Sita Scalcon

**Efeito da microinjeção
intracerebroventricular de
somatostatina nos comportamentos
apetitivos e de ingestão alimentar de
ratos**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre

Orientador: Dr. Alberto Antonio Rasia Filho

**Porto Alegre
2013**

“Não há nada de bom nem mau a não ser estas duas coisas: a sabedoria que é um bem e a ignorância que é um mal”.

Platão

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo exemplo de determinação e honestidade que me inspiram a seguir em frente.

Ao meu tio, Luis Fernando Sita, pelos primeiros livros que me deu na infância e a oportunidade de ler os diversos livros que adquiriu e que contribuíram de forma incomensurável para que eu avançasse em busca do conhecimento.

À minha prima Jane, pelos jantares e almoços oferecidos a mim neste período de estudos intensos temperados com palavras encorajadoras.

A todos os meus amigos e familiares, em especial à Jaqueline, Isolete e Leoni, pelo incentivo oferecido.

Ao meu estimado Professor, Alberto Rasia, pela oportunidade oferecida, pela confiança depositada, pelos ensinamentos e incentivos constantes e pelo privilégio de participar de um projeto de pesquisa experimental e vivenciar as dificuldades de “fazer ciência”.

À técnica de Laboratório de Patologia de Pós-Graduação da UFCSPA, Keli C. Reiter, pela gentileza com que sempre me recebeu e disponibilidade que sempre manifestou para atender às minhas solicitações.

Às técnicas do Laboratório de Fisiologia, Carmem Rocha e Monice Santana dos Santos, por sua valiosa colaboração.

À Profa. Dra. Helena Schmidt, pelo empréstimo de algumas das gaiolas metabólicas utilizadas no trabalho.

À Inês, do Biotério, pela alegria com que nos recebe diariamente, pelas conversas diárias, pelo cuidado e respeito que tem com os animais.

A todos os alunos e colegas do Laboratório de Fisiologia, pelo convívio e colaborações; em especial a Edson Quagliotto, Ananda Rucatti, Ana Paula Ferreira, Ana Amélia Duarte, Jadson Alves, Douglas Rossato e à minha querida amiga Bruna Dietrich, pelas longas conversas, pelas trocas realizadas, tanto das alegrias ou frustrações, e por ser a sua amizade uma das minhas maiores alegrias na realização desta caminhada.

A Bruna Marmett, aluna da iniciação científica, por sua disponibilidade, competência e bom humor na realização de todas as atividades.

À Secretaria de Pós-Graduação da UFCSPA, em especial à Maristela, pelo seu auxílio constante e a gentileza com que sempre me recebeu.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia e seus professores, pela oportunidade e ensinamentos.

À CAPES e PIBIC-PIC, pelas bolsas e financiamentos para a execução deste trabalho.

A Deus, que me fortalece.

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1 Comportamento Alimentar	16
1.2 Somatostatina	27
2 Objetivos e Metas	41
2.1 Objetivos	41
2.1.1 Geral	41
2.1.2 Específico	41
2.2 Meta	41
3. Artigo científico redigido em inglês	42
4 Considerações Finais	65
5 Anexos	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP: Proteína relacionada ao agouti

α -MSH: α - melanocortina

ARC: Núcleo arqueado do hipotálamo

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

CART: Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina

CCK: Colecicstocinina

CRH: Hormônio liberador de corticotrofina

DMH: Hipotálamo dorsomedial

2-DG: 2-deoxi-D-glicose

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GHRH: Hormônio do crescimento

GLP-1: Peptídeo semelhante ao glucagon

Icv: intracerebroventricular

LH: Área hipotalâmica lateral

MCH: Hormônio concentrador de melanina

MC4Rs: 4 melanocortina

NAc: Núcleo acumbens

NPY: Neuropeptídeo Y

NTS: Núcleo do trato solitário

ORX: Orexina

OXI: Ocitocina

OXM: Oxintomodulina

POMC: Pró-opiomelanocortina

PRL: Prolactina

PVN: Núcleo paraventricular

PYY: Peptídeo YY

SNC: Sistema nervoso central

SST: Somatostatina

TRH: Hormônio liberador de tireotrofina

VMH: Hipotálamo ventromedial

VTA: Área tegmental ventral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: “Experimental design”	58
---------------------------------------	----

RESUMO

Introdução: Diversos estudos evidenciaram a ação de neuropeptídeos no comportamento alimentar e seleção de macronutrientes a serem ingeridos para a homeostasia energética. Essas ações envolvem complexas conexões de diversas áreas do sistema nervoso central (SNC). A somatostatina (SST) é um neuropeptídeo cuja ação nos comportamentos ingestivos ainda é pouco estudada, porém, nos relatos existentes, há efeitos contraditórios sobre o comportamento alimentar em ratos.

Objetivos: Estudar o efeito da microinjeção intracerebroventricular (icv) de SST nos comportamentos apetitivo e consumatório alimentar de ratos no modelo de acesso à dieta de seleção de macronutrientes isolados (com composição preferencial glicídica, proteica ou lipídica).

Material e Método: O desenho experimental envolveu 16 dias sequenciais para cada grupo experimental, em projeto aprovado pelo CEUA/UFCSPA (protocolo nº 066/11). Ratos Wistar adultos machos, inicialmente mantidos em condições padrão de biotério, compuseram aleatoriamente os seguintes grupos experimentais (n = 8 em cada grupo): controle geral submetido a procedimento “sham” para microinjeção icv, animais microinjetados com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF, 5 µl) ou com SST (nas doses de 1 µg e 10 µg/5 µl). Todos os animais foram colocados isoladamente em gaiolas metabólicas e a adaptação adequada dos ratos a cada nova condição experimental foi avaliada ao longo de todo o estudo. Foram registrados os resultados do consumo alimentar tanto de dieta padrão quanto das dietas de seleção de macronutrientes. As microinjeções ocorreram no último dia

experimental e, como teste para os grupos experimentais, o comportamento alimentar foi analisado durante 2 horas de livre acesso às dietas seletivas, após período de jejum forçado. Os comportamentos apetitivos analisados foram o de busca pelos potes contendo alimento e o número de vezes que o animal procurou comer qualquer uma das dietas. O consumo alimentar foi avaliado pelo peso (em gramas) efetivamente ingerido de cada dieta seletiva. Os dados foram analisados com comparações “intragrupo” e entre os grupos experimentais e o nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados: Em todos os grupos experimentais, ratos preferiram ingerir dieta hiperglicídica. A microinjeção de ambas as doses de SST aumentou a ocorrência dos comportamentos apetitivos em relação aos grupos controle, mas não promoveu maior consumo da dieta hiperglicídica.

Conclusão: No presente modelo experimental em ratos, SST por via icv gerou aumento da procura por alimento, mas não a ingestão de dieta seletiva de macronutrientes isolados, o que indica ser este peptídeo um neuromodulador do comportamento alimentar mais do que uma substância crucial para sua ocorrência.

ABSTRACT

The central control of feeding behavior in rats involves different neuropeptides with orexigenic and anorexigenic modulatory actions. Here, it was studied the effects of intracerebroventricular (icv) microinjection of somatostatin on the appetitive and consummatory ingestive behaviors of rats under the paradigm of the self-selection macronutrient isolated diets [high-carbohydrate (high-CHO), high-protein and high-lipid food pellets]. Adult male rats were submitted to a sham procedure (n=8) or received icv microinjections of artificial cerebrospinal fluid (aCSF; 5 μ L, n=8) or somatostatin (1 μ g and 10 μ g/5 μ L, n=10 and 8, respectively). Control and test data were obtained after a fasting protocol. Feeding behavior was evaluated along a 2-hr test period of free access to the selective diets. Rats in all groups adapted well to the experimental condition and preferred the high-CHO diet. Animals from the sham and aCSF groups showed similar results. Interestingly, both doses of somatostatin increased appetitive behaviors but there was a high variability in the basal consumption of the high-CHO diet that precluded further comparisons of the somatostatin effects with those from the control groups. When testing “within- groups” effects, both doses of somatostatin did not induce significant changes neither in consummatory feeding behavior. These data impose new and relevant methodological improvements for the evaluation of feeding responses in rats, notably on the use of “within-groups” comparisons, and evidence effects of central somatostatin as a neuromodulator of the appetitive display in the present behavioral model.

1. Introdução

O equilíbrio energético de um organismo animal, processo conhecido como homeostase energética, busca promover a estabilidade entre ingestão alimentar e gasto metabólico, incluindo-se as reservas de energia corporal, e é influenciado por fatores diversos como os genéticos, ambientais, de controle neuroendócrinos e emocionais. A ingestão alimentar e o gasto energético são controlados por um sistema neural envolvido com milhares de genes que refletem sua importância biológica (Lenard e Berthoud, 2008). O sistema nervoso central (SNC) integra informações sobre diferentes aspectos do comportamento alimentar com sinais diretos e indiretos por neurotransmissores/ neuromoduladores e hormônios relativos à fome, saciedade e níveis de estoque de energia na forma de tecido adiposo (Cota *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos iniciais referentes à atuação do SNC no comportamento alimentar demonstrou a regulação exercida pelos diversos núcleos do hipotálamo (Hetherington e Ranson, 1940; Brobeck, 1946; Valenstein e Mittleman, 1984). As áreas hipotalâmicas envolvidas com comportamentos ingestivos e o balanço energético estabelecem conexões que permitem a troca de informações entre a disponibilidade de nutrientes, os diversos neurotransmissores e neuropeptídeos presentes nas regiões hipotalâmicas com o controle do comportamento alimentar e hormônios que atuam nesses locais (Abizaid 2006). Neste sentido, lesões na área hipotalâmica médio-basal, particularmente no núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH), provocaram um aumento na ingestão alimentar e foram associados

com desenvolvimento de obesidade e resistência insulínica, enquanto lesões na área hipotalâmica lateral (LH) foram associadas com anorexia em diferentes espécies (Heterington e Ranson, 1940; Heterington e Ranson, 1942; Brobeck 1946; Valenstein et al., 1968; Valenstein e Mittleman, 1984). A estimulação elétrica dessas regiões apresentava efeitos opostos, no VMH resultava em diminuição do comportamento alimentar, enquanto a estimulação do LH apresentava efeito orexigênico (Valenstein *et al.*, 1968; Valenstein e Mittleman, 1984; York, 1999). Por sua vez, o núcleo arqueado (ARC) desempenha papel integrador na regulação da ingestão de alimento e projeta eferências para outros núcleos hipotalâmicos, como o paraventricular (PVN) e o VMH demonstrando que a ação hipotalâmica sobre a homeostase e ingestão alimentar não está resumida somente ao LH e ao VMH (Schwartz *et al.*, 2000; Berthoud, 2004; Stanley, 2005). É interessante que esses núcleos se encontram nas proximidades do terceiro ventrículo e podem ser estimulados, diretamente ou indiretamente, por substâncias microinjetadas nos ventrículos laterais.

Estudos adicionais demonstraram que existem outros núcleos encefálicos capazes de modular o comportamento alimentar em ratos (Galaverna *et al.*, 1993; King *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2003). É o caso do envolvimento dos núcleos da amígdala na regulação homeostática energética e no comportamento alimentar com preferência por determinados macronutrientes (King *et al.*, 1998; Rosa *et al.*, 2010). De fato, estudos realizados na década de 1950 já apontavam os núcleos amigdalianos como envolvidos no comportamento alimentar (Grossman, 1963) e a existência de conexão entre as áreas lateral e medial da amígdala com o hipotálamo foi

postulada a seguir (Fonberg, 1977), incluindo-se a possibilidade de relação entre a regulação da alimentação e comportamento emocional (Carlini *et al.*, 2004). Aqui também é possível que microinjeções intracerebroventriculares venham a modificar o funcionamento de núcleos amigdalianos e modular a ocorrência de comportamentos apetitivos e consumatórios alimentares em ratos.

O aprimoramento da metodologia de estudo do comportamento alimentar conduziu à utilização de dietas de seleção, onde macronutrientes são oferecidos isoladamente, possibilitando monitorar as preferências e as quantidades consumidas por ratos em laboratório e, desta forma, avançar na compreensão dos fatores que regem a procura, a escolha e o consumo de dietas específicas (Anderson, 1981; Blundell, 1983; Kanarek, 1985; Tordoff, 2001). Por exemplo, o comportamento alimentar e a seleção dietética podem ser influenciados por vários neuropeptídeos e inibidores metabólicos. Esses neuropeptídeos atuam como potentes inibidores ou estimuladores da alimentação, e por vezes determinando apetites específicos com preferências alimentares. Assim, o neuropeptídeo Y (NPY) (Zarjeveski *et al.*, 1993; Peters *et al.*, 2007), o b-mercaptoacetato e a 2-deoxi-D-glicose promovem uma preferência pela ingestão de carboidratos (Kanarek *et al.*, 1983; Bray *et al.*, 1996). A preferência por uma dieta hiperlipídica é estimulada pelos receptores opioides do tipo Kappa (Shor-Posner *et al.*, 1986; Ookuma *et al.*, 1997) enquanto que a bombesina, (neuropeptídeo B) apresenta nítida ação anorexigênica (López *et al.*, 2007).

No presente estudo, deter-nos-emos na somatostatina (SST), peptídeo que parece exercer efeitos contraditórios sobre o comportamento alimentar

(Feifel e Vaccarino, 1990). A SST é largamente distribuída em todo o corpo, sendo um importante regulador endócrino hipotalâmico-hipofisário e modular do funcionamento sináptico ao longo do SNC (Pietro *et al.*, 2010). Ela pode interagir com cinco receptores, denominados sst1-5 (Stengel *et al.*, 2010), e está largamente distribuída no córtex cerebral e em estruturas límbicas onde, no hipotálamo, é predominantemente expressa no PVN e, de forma menos intensa, no ARC e VMH (Finley *et al.*, 1981; Moga *et al.*, 1985). SST microinjetada no PVN altera aspectos importantes do balanço energético. Em altas doses (5 µg), SST produz uma diminuição rápida do gasto energético e diminuição do consumo alimentar; enquanto que em doses baixas (0,05 µg), aumenta esse consumo. De acordo com Atrens (1993), SST microinjetada no PVN promove a utilização preferencial de lipídios e uma economia de carboidratos no metabolismo geral (Atrens *et al.*, 1993). Já a administração de SST (0,5 -1,5 µg) no hipotálamo lateral (LH) causou redução no consumo alimentar e notável anorexia em ratos (Lim *et al.*, 1987). Ademais, mudanças no comportamento alimentar foram observadas quando SST foi administrada por via intracerebroventricular (icv) (Aponte *et al.*, 1984). Não obstante, em ratos com acesso livre à dieta completa padrão, resultados inconsistentes e bifásicos foram obtidos, incluindo-se comportamentos orexigênicos e anorexigênicos (Rezek *et al.*, 1976; Aponte *et al.*, 1984; Tachibana *et al.*, 2009). Essas diferenças muito bem podem estar relacionadas com as doses de SST utilizadas (a estimulação da ingestão era produzida a partir de baixas doses enquanto inibição se seguia depois de altas doses) em ratos (Feifel e Vaccarino, 1993). Uma das hipóteses adicionais é de que altas doses microinjetadas por via icv alcançam a circulação e podem estar relacionadas

com a diminuição da grelina, hormônio orexigênico, e consequente diminuição do consumo alimentar (Silva AP *et al.*, 2005). Mais ainda, mudanças no comportamento locomotor, como a ocorrência de movimentos de rotação do corpo e de autolimpeza excessiva, também podem interferir no comportamento alimentar (Stengel *et al.*, 2013).

A presente dissertação busca avançar o conhecimento sobre a regulação do comportamento alimentar e contribuir para que se possa avançar no entendimento das ações da SST no comportamento alimentar. Para tanto, SST será microinjetada por via icv e ratos serão testados no modelo que permite escolha de dietas com macronutrientes isolados (glicídios, proteínas e lipídios). O avanço no conhecimento dos mecanismos que controlam o comportamento alimentar é imprescindível para que se encontrem alternativas eficazes no tratamento e prevenção de distúrbios alimentares cada vez mais frequentes na população mundial, como a anorexia nervosa, bulimia e a obesidade. Mais informações são apresentadas a seguir para fundamentar a presente dissertação e os resultados experimentais obtidos serão apresentados e discutidos em artigo específico.

1.1 Comportamento Alimentar

O controle da ingestão alimentar e o metabolismo energético dependem da interação de vários fatores genéticos, fisiológicos (cognitivos, emocionais e sociais) e advindos do meio ambiente. Esta interação envolve uma rede neural com diversas áreas do SNC e periférico, com aferências sensoriais e eferências motoras e que determinam ou modulam o comportamento alimentar do animal em determinado momento (Grossman, 1975; Leibowitz, 1980; Hoebel, 1984; Benarroch, 2010; Berthoud, 2004; Petrovich, 2013). Esta complexa inter-relação ainda estabelece estímulos que motivam o organismo a iniciar e terminar uma refeição (nas sensações de fome e de saciedade), a preferência alimentar (ou, quando ainda mais direcionado, um apetite específico), bem como a regulação do consumo alimentar em relação aos requerimentos energéticos corporais e que variam de forma dinâmica e ao longo da vida do indivíduo (Blundell, 1991; York, 1999; Grimm *et al.*, 2011).

Assim, por meio de um processo geral conhecido como homeostase energética, o consumo alimentar é ajustado continuamente por questões adaptativas e para a sobrevivência de um organismo animal. Informações sensoriais, como a visão, olfato e paladar da comida, são processadas e interagem com sinais fisiológicos/ metabólicos internos que, ligados ao status nutricional e energético orgânico, determinam a busca e ingestão de uma composição da refeição e sua quantidade (York, 1999; Morton *et al.*, 2006). Neste sentido, o aumento do consumo alimentar desencadeado por um período de jejum é um exemplo da regulação da ingestão alimentar (Schwartz, 2000). De acordo com as modificações nas reservas de energia, como, por exemplo, a

mobilização do tecido adiposo e a produção de leptina ou os efeitos desencadeados pelo aumento da atividade metabólica geral produzidos pelos hormônios tireoideanos, há um ajuste na ingestão alimentar visando promover o equilíbrio entre obtenção e demanda de nutrientes (Barros, 2010). O resultado pode ser tanto aumento quanto diminuição do consumo alimentar, dependendo da condição experimentada pelo animal naquele instante e da disponibilidade de alimento no meio onde se encontra (Schwartz *et al*, 2006), e desde que não haja qualquer perigo para sua sobrevivência realizar um ou outro comportamento.

Os mecanismos básicos de gênese e controle da homeostase energética residem no SNC dos mamíferos estudados até o momento, incluindo-se o ser humano. Este é um processo ativo e complexo, como se poderia depreender a partir da sua dinâmica e importância para sobrevivência (Berthoud, 2002; López *et al.*, 2007), e diversos neurotransmissores e neuromoduladores afetam tanto o controle do metabolismo energético como a relação entre ingestão e saciedade alimentar (Milagro e Marques, 2002; Barros, 2010; Williams e Elmquist, 2012; Zeltser *et al.*, 2012). Adicionalmente, diversos hormônios, ou com capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica ou que se ligam em receptores presentes em terminais vagais aferentes, geram sinais fisiológicos e neurais que derivam do trato gastrointestinal para modular o comportamento alimentar (Berthoud, 2002; Barros, 2010). São exemplos a colecistocinina, a insulina e a grelina, cujos níveis circulantes modulam o início e o término de uma refeição (Arora, 2006; López *et al.*, 2007). Apesar de muitos mecanismos de regulação central da ingestão alimentar permanecerem desconhecidos, o envolvimento de algumas regiões do SNC é notável (Rollins

e King, 2000; Williams e Elmquist, 2012; Petrovich *et al.*, 2013). E, embora haja ação em vários locais do SNC, parece ocorrer grande convergência de informações para os núcleos do hipotálamo, que igualmente apresentam vários neuropeptídeos e neurotransmissores intrínsecos que influenciam a ingestão de nutrientes (Arora, 2006; Hill *et al.*, 2008; Bennaroch, 2010; Zeltser *et al.*, 2012).

A importância do hipotálamo na regulação do comportamento alimentar foi primeiramente demonstrada pelo uso de lesões químicas e eletrolíticas que mostravam que danos no VMH induziam a hiperfagia e obesidade enquanto danos no LH induziam a afagia e perda de peso (Brobeck, 1946; York, 1999; Schwarz, 2000; Abizaid, 2006; Benarroch, 2010). Esses achados iniciais foram muito mais detalhados a seguir, o que não fez sustentar a existência de “centros” da fome e da saciedade (Arora, 2006; Woods e Stricker, 2013). Preferentemente, esses núcleos hipotalâmicos formam circuitos neuronais interconectados que respondem a mudanças no status energético por alterar a expressão de neurotransmissores e neuropeptídeos específicos, resultando em mudanças no gasto e consumo de energia e nos comportamentos associados a esses processos (López, 2007; Flier, 2004; Abizaid *et al.*, 2006; Kalra *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado que existem circuitos neuronais que operam para regular apetites específicos e onde estão o ARC, o núcleo dorsomedial (DMH) e PVN hipotalâmicos (Milagros e Marques, 2001; Woods e Stricker, 2013).

O ARC é um dos locais integradores da aferência de informações sensoriais e para modulação da homeostase energética e suas influências para outras áreas centrais. Nele encontram-se dois grupamentos neuronais que

exercem influências opostas na ingestão alimentar e no gasto energético. Um grupo localizado na porção lateral do núcleo arqueado sintetiza pró-opiomelanocortina (POMC) e peptídeos derivados, incluindo-se o hormônio estimulante de melanócitos (MSH) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), é estimulado pela leptina circulante e nível de glicose local e gera efeitos anorexigênicos (Berthoud, 2004; Leonard e Berthoud, 2009; Benarroch, 2010). Um segundo grupo de neurônios localizado na porção medial do ARC sintetiza ácido γ -aminobutírico (GABA), NPY e o peptídeo relacionado ao Agouti (AgRP) (Yeo *et al.*, 2012). Segundo esses mesmos autores, tais neurônios são mediadores-chave para os efeitos orexigênicos da grelina e são inibidos por sinais anorexigênicos da leptina, da insulina e da própria glicose. O AgRP é liberado por neurônios específicos do ARC e influencia o balanço energético predominantemente pela ação em receptores para melanocortinas do tipo MC4Rs e por inibir diretamente neurônios que sintetizam a POMC por liberação local de GABA. Ademais, no ARC, os neurônios que expressam POMC e AgRP são sensíveis aos sinais nutricionais advindos da periferia, incluindo-se aqueles do tecido adiposo, do estômago e hormônios pancreáticos (revisado em Yeo *et al.*, 2012 e referências).

No PVN, neurônios sintetizam hormônio liberador de corticotrofina (CRH), hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e ocitocina (OXT) e que aumentam o metabolismo energético com projeções para outros núcleos, como o VMH, o DMH e o LH (Cowley *et al.*, 1999; Kalra *et al.*, 1999; Leibowitz e Hoebel, 2004; Morton *et al.*, 2006). O VMH contém notável população de neurônios responsivos à glicemia e que mediam os efeitos da leptina, inibindo o consumo alimentar e estimulando o gasto energético (Benarroch, 2010). Tais

neurônios recebem impulsos originados nos neurônios que expressam POMC no ARC e sintetizam o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), o qual é um potente mediador da redução do consumo alimentar induzido pela leptina (Benarroch, 2010).

O LH contém populações de neurônios reciprocamente conectadas no controle do comportamento alimentar e do metabolismo energético, onde se sintetizam orexina (ORX) e MCH, a atividade neuronal é inibida por leptina, ativada por grelina (Broberger *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 1998b; Benarroch, 2010; Woods, 2002). Ademais, há conexões recíprocas com neurônios do ARC e outras áreas hipotalâmicas envolvidas no controle da homeostase energética e projeções para neurônios envolvidos no circuito mesolímbico e controle hedônico do comportamento alimentar (Broberger *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 1998b; Benarroch, 2010; Woods, 2002). Neste contexto geral, substâncias relacionadas com a dieta, neurotransmissores, neuropeptídeos, hormônios e demais fatores hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar citados acima são encontrados na Tabela a seguir.

Tabela1: Substâncias que demonstram efeito orexigênico e /ou anorexigênico em modelos animais.

Orexigênicos	Anorexigênicos
β -endorfina Corticosterona Dopamina Dinorfina Endocanabinóides Galanina Glutamato Grelina Hormônio concentrador de Melanina (MCH) Hormônio do Crescimento Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento Motilina Noradrenalina Neuropeptídeo Y (NPY) Orexinas A e B (ORX A e B) Peptídeo relacionado ao Agouti (AgRP)	Ácidos graxos de cadeia longa Adiponectina Amilina Bombesina Colecistocinina (CCK) Enteroestatina Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF) Hormônio estimulador de melanócitos, fração α (α -MSH) Hormônio Liberador de Corticotrofina Insulina Interleucinas 1 e 6 Leptina Nesfatina 1 Neuromedina B, S e U Neuropeptídeo B, K, S e W Neurotensina Ocitocina Oxintomodulina Peptídeo Semelhante ao Glucagon -1 (GLP-1) Peptídeo YY3-36 (PYY) Polipeptídeo Pancreático (PP) Resistina Serotonina (5-HT) Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART)

Adaptada de López et al. (2007).

O comportamento alimentar também está associado a mecanismos motivacionais amplos (Berridge, 1996). As comidas preferidas são consideradas para prover recompensa, sensação de alívio de alguma situação estressante ou caracteres hedônico e social (Kupfermann *et al.*, 2000). Historicamente, esses fatos sugerem a participação de áreas do sistema

límbico e do córtex cerebral no comportamento ingestivo (Cuples, 2003). Por exemplo, em experimentos com roedores, a presença de comidas altamente palatáveis provocou liberação intensa de dopamina no núcleo accumbens (Nac) e sua mediação nos aspectos motivacionais da ingestão de comida em um circuito que envolve interações entre vários sinais, incluindo o sistema opioide, dopaminérgico e endocanabinoide (Flier, 2004; Di Marzo & Matias, 2005; Hommel *et al.*, 2006). O ARC pode modular a atividade do sistema dopaminérgico mesolímbico, com projeções diretas do Nac, o que integraria aspectos motivacionais e cognitivos da ingestão alimentar pelas conexões com o córtex pré-frontal, núcleos da amígdala e área hipotalâmica lateral (Benarroch, 2010) ou, indiretamente, pela ativação de hipocretinas/ ORX ou do hormônio concentrador de melanina (MCH) em vias que se projetam para a área tegmental ventral (VTA) e o Nac (Abizaid e Tamas, 2008). Neste contexto, a percepção da comida como “recompensa” começa com informações gustativas que são transmitidas ao núcleo do trato solitário (NTS) por fibras sensoriais específicas aferentes (Scott, 2013). Essas informações do NTS são enviadas para várias áreas como o VTA, o Nac, o estriado de forma geral, núcleos talâmicos e parte do córtex cerebral, mormente aquelas envolvidas com a gustação e seu processamento associativo subsequente (Kelley *et al.*, 2005; Morton, 2006). A dopamina atuando nessas áreas prosencefálicas aumenta o esforço para obter um estímulo de recompensa, mas não é diretamente responsável pela experiência hedônica em si (Kelley e Berridge, 2002; Rolls, 2005; Morton, 2006).

Núcleos amígdalianos, como o basolateral, o basomedial, o central e o lateral, também exercem influência sobre a ingestão alimentar e, em conjunto

com outras regiões corticais, podem prover alguns dos circuitos para comportamentos aprendidos, aversões alimentares e aspectos prazerosos da alimentação (Fisher, 1969; Flier e Maratos-Flier, 1998; revisado recentemente em Petrovich, 2013). Por outro lado, o papel de uma região ampla, não definida especificamente em termos citoarquitetônicos, histogenéticos ou hodológicos e denominada de “região posterodorsal”, tem sido recentemente debatido por causa de dados prévios envolvendo-a com o desenvolvimento de obesidade em ratas (King *et al.*, 1998; Rollins e King, 2000; King *et al.*, 2003). Mais especificamente, o subnúcleo póstero-dorsal da amígdala medial (MePD) está conectado diretamente e/ou indiretamente às regiões hipotalâmicas moduladoras do comportamento alimentar (Dong *et al.*, 2001; Petrovich *et al.*, 2001), porém a microinjeção local de glutamato resultou em aumento muito discreto no consumo alimentar em ratos (Rosa *et al.*, 2011). Uma possibilidade é de que outros transmissores químicos no MePD seriam capazes de modificar o comportamento apetitivo e ingestivo alimentar (Dietrich, 2012).

Por outro lado, circuitos neuronais complexos participam da regulação do consumo alimentar e do peso corporal (Berthoud, 2006; López *et al.*, 2007). Alterações monogênicas nos níveis centrais de melanocortinas, leptina, serotonina e BDNF têm demonstrado a participação de diversos mecanismos de sinalização no equilíbrio energético e peso corporal normal (Yeo *et al.*, 2012). O controle da ingestão alimentar envolve sinais neurais e humorais que sinalizam a saciedade relacionada com a ingestão de nutrientes, distensão gástrica e liberação de hormônios intestinais, incluindo-se a colecistocinina (CCK), o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), a oxitomodulina (OXM), a ORX, a grelina e o peptídeo YY (PYY), dentre outros (Gibbs *et al.*, 1973; López *et al.*,

2007). Mais informações estão descritas em trabalhos recentes e servem como referências adicionais neste campo do saber (por exemplo, Leonard e Berthoud, 2009; Barros *et al.*, 2010; Dietrich, 2012; Williams and Elmquist, 2012; Zeltser *et al.*, 2012; Petrovich, 2013).

Com base no acima exposto, tem havido um interesse crescente no papel do SNC na gênese e regulação no comportamento alimentar e, principalmente, como um campo de estudo amplo, no apetite específico pelo consumo de macronutrientes isolados nas dietas ricas em carboidrato, proteína ou lipídio (Kanarek, 1985; Rosa *et al.*, 2011; Dietrich, 2012). Estudos realizados com a utilização de dietas de seleção, onde macronutrientes foram oferecidos isoladamente, permitiram monitorar as preferências e quantidades consumidas por ratos em laboratório. Separam-se assim alguns efeitos relacionados com fome inespecífica de apetite específico ou comportamento com um objetivo alimentar específico (do inglês, “goal-oriented behavior”). As escolhas feitas por ratos no modelo animal de exposição a dietas seletivas podem ser influenciadas por diferentes neurotransmissores/ neuromodulares, hormônios, alterações metabólicas (durante o jejum ou período de saciedade pós-prandial), fatores ambientais (como variações circadianas durante os períodos de ciclo claro e escuro) ou diferenças entre linhagens ou espécies animais (Kanarek, 1985; Smith *et al.*, 1997, Tordoff, 2001, Rosa *et al.*, 2011). Ademais, pode-se testar se essas modulações atuam estimulando ou inibindo comportamentos apetitivos (de orientação e busca de alimento disponível), de fome e apetite ou saciedade e, por vezes, determinando a preferência alimentar. Por exemplo, NPY promove uma preferência por ingestão maior específica de carboidratos na dieta (Kanarek, *et al.*, 1983; Bray *et al.*, 1986; Stanley *et al.*, 1985; Dietrich,

2012); a preferência por uma dieta hiperlipídica é estimulada pelos receptores para opioides do tipo kappa (Ookuma *et al.*, 1997); e a ingestão de proteínas é estimulada pelo hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) e parece ser inibida pelo glucagon (Meyer, 1974; Dickson *et al.*, 1995). Assim, além de auxiliar na compreensão da organização neural de comportamento ingestivo e social, elucidando pontos ainda incógnitos ou controversos, este tipo de estudo também pode contribuir para estudos da fisiopatogenia de distúrbios alimentares, como a anorexia, a bulimia, ou o desenvolvimento de obesidade (Barros, 2010). O modelo animal de estudo do consumo de dietas seletivas (dito, do inglês, “self-selection macronutrient diet paradigm”) foi empregado na presente dissertação, como será descrito com maiores detalhes no artigo anexo.

Igualmente, para o que se estudou no presente trabalho, a SST surge neste contexto como um neuropeptídeo que parece exercer efeitos contraditórios sobre o comportamento alimentar, incluindo-se possibilidades de atuação como agente orexigênico ou anorexigênico (Aponte *et al.*, 1984; Ishikawa *et al.*, 1997; Cummings *et al.*, 1998; Watanobe *et al.*, 2002; Stengel *et al.*, 2010), tornando relevante estudar a ação da SST na modulação dos vários parâmetros que compõem o comportamento alimentar de ratos e, mormente, quanto à sua capacidade de induzir o consumo de uma dieta seletiva. De fato, são restritos os estudos que estão disponíveis nesta área do conhecimento e estes não empregaram o presente modelo de estudo dos comportamentos apetitivo e consumatório alimentar. Mais dados sobre a SST e suas ações centrais são apresentados a seguir.

1.2 Somatostatina

A SST é um peptídeo com 14 aminoácidos dispostos em cadeia única, peso molecular de 1640 dáltons, e que foi primeiramente descrito em 1973 como um hormônio hipotalâmico com capacidade de inibir a secreção do hormônio do crescimento (GH ou somatotrofina, de onde deriva também o nome da SST) pela hipófise anterior (Brazeau, 1973; Moller *et al.*, 2003; Olias *et al.*, 2004). Existem duas formas biológicas ativas da SST e que são peptídeos denominados SST-14 e SST-28 e que contêm 14 e 28 aminoácidos, respectivamente, e são provenientes da parte C-terminal, como subproduto de um precursor maior pró-SST (Weckebecker *et al.*, 2003). Ou seja, esses compostos são um tetradecaptídeo (SST-14, ou seja, com 14 aminoácidos carboxiterminal) e uma forma estendida N-terminal (SST-28, ou seja, formada pela SST-14 mais 14 aminoácidos da sequência aminoterminal da pró-SST; Machado *et al.*, 2008), embora ambas se liguem com alta afinidade a receptores acoplados à proteína G de membrana celular (Moller *et al.*, 2003; Brazeau, 1973). A SST 14 é muito encontrada no SNC, mas a SST 28 é considerada a variante mais potente dos mamíferos por inibir o GHRH, o GH, a prolactina (PRL), o hormônio tireotrófico (TSH) e de insulina (Gugger *et al.*, 2004; Barrett *et al.*, 2010). A SST-14 também age de forma potente como inibidora da secreção de insulina e glucagon pancreáticos, sobre a secreção exócrina gástrica e sobre o fluxo sanguíneo esplâncnico (Gugger *et al.*, 2004). Evidencia-se, com isso, que a SST pode ter ação central e outra periférica, com possibilidades de processamento pós-traducionais do gene da pró-SST de formas diferentes, embora esta última não seja abordada no presente estudo

(mais informações podem ser obtidas em Machado *et al.*, 2008; Barrett *et al.*, 2010).

Além da SST ser um hormônio presente no hipotálamo e no trato gastrointestinal, vários estudos imunohistoquímicos demonstraram sua presença em outras áreas do SNC, sugerindo que este peptídeo poderia ter também uma importante função neuromodulatória (Schindler *et al.*, 1996), neuroendócrinas e comportamentais (Tannenbaum, 1985). A liberação da SST por neurônios e outras células secretoras depende usualmente da despolarização da membrana ou do aumento da concentração citosólica de Ca^{++} , sendo desencadeada por diversos secretagogos (Patel, 1999). Por exemplo, a liberação de SST é afetada por diversos transmissores químicos, entre eles a serotonina e o BDNF (Kakigi *et al.*, 1992). Por sua vez, a SST pode atuar como um neuromodulador sináptico, afetar a liberação de neurotransmissores em diferentes áreas do SNC (Schindler, 1996), além de inibir a secreção de hormônios gastrointestinais como a gastrina e a grelina (Schimada, 2003; Fung, 1997).

Os receptores para a SST são divididos em sst1, sst2A, sst2B, sst4 e sst5 (Panetta *et al.*, 1994; Olias *et al.*, 2004) e, embora a SST possua afinidade com todos os seus receptores, a maior afinidade é observada com o receptor sst2 (Lamberts *et al.*, 1990) e com ampla distribuição central (Stengel *et al.*, 2013). De fato, a SST é encontrada em várias áreas do SNC, exceto no cerebelo, e mapeamentos imunohistoquímicos da distribuição da SST mostra sua expressão em diferentes partes do córtex cerebral, estruturas límbicas, núcleo central da amígdala e diversos núcleos do hipotálamo (Finley *et al.*, 1981; Johansson *et al.*, 1984). No hipotálamo, a SST é predominantemente

expressa no PVN e, em menor grau, também no ARC e no VMH (Finley *et al.*, 1981; Johansson *et al.*, 1984 ; Moga *et al.*, 1985). Quantidades moderadas a abundantes de SST foram encontradas nos corpos das células e fibras terminais nos subnúcleos da amígdala medial (Micevych *et al.*, 1988; Singewald *et al.*, 2008) enquanto receptores para SST são encontrados em vários outros subnúcleos da amígdala (Moller *et al.*, 2003). Essa presença da SST e a distribuição de seus receptores é absolutamente relevante porque sugere uma possibilidade de ação em regiões que modulam o comportamento alimentar, conforme anteriormente mencionado.

De fato, a administração de SST parece ter um papel relevante no comportamento alimentar e regulação do peso corporal em ratos e outros animais (Pietro *et al.*, 2010). No hipotálamo, a microinjeção direta de SST no PVN promove a utilização preferencial de lipídios e uma economia de carboidrato no metabolismo geral (Atrens, 1993). Porém, os resultados obtidos até o momento e que buscaram avançar na compreensão das ações da SST no comportamento alimentar são controversos devido às ações deste peptídeo nas funções gastrointestinal e central (Pietro *et al.*, 2010). Por exemplo, SST microinjetada diretamente no LH causou redução no consumo alimentar e notável anorexia em ratos (Lim *et al.*, 1987), mas quando SST foi administrada por via intracerebroventricular (icv), em ratos com acesso livre à dieta completa padrão, resultados inconsistentes e bifásicos foram observados, incluindo-se tanto comportamento orexigênico quanto anorexigênico (Rezek *et al.*, 1976; Aponte *et al.*, 1984; Tachibana *et al.*, 2009). Tais diferenças bem podem estar relacionadas com as doses de SST utilizadas. Ou seja, a estimulação da ingestão alimentar era produzida a partir de baixas doses enquanto a inibição

se seguia depois de altas doses e, adicionalmente, a microinjeção de SST somente aumentava significativamente a alimentação durante o ciclo claro, mas não no ciclo escuro dos animais (Feifel e Vaccarino 1993; Scalera, 1998). Notavelmente, a administração icv de SST pode estimular a ocorrência de atividades motoras de autolimpeza, movimentos rotatórios ou diminuição da motricidade (Stengel, 2013), o que poderia potencialmente afetar os resultados de estudos comportamentais (Stengel *et al.*, 2010).

Além disso, sugere-se que altas doses microinjetadas por via icv alcançam a circulação e podem estar relacionadas à diminuição da grelina, hormônio orexigênico (Silva *et al.*, 2005), o que se relaciona com estudo realizado por Shimada *et al.* (2003) que demonstraram que a injeção intravenosa de SST em ratos reduziu significativamente o nível de grelina no plasma. A SST também serve como inibidor da secreção e da motilidade gástrica (Fung *et al.*, 1997; Barrett *et al.*, 2010). A SST pode também interagir com a leptina e reduzir a atuação desta nas regiões hipotalâmicas associadas com o comportamento alimentar em ratos (Stepanyan, 2007). Ao contrário, a leptina pode alterar a secreção de SST no ARC, gerando aumentos ou diminuições de níveis em associação com a estimulação da secreção de GH (Watanobe, 2002). Em condições ainda mais complexas, a microinjeção de SST14 por via icv modificou a resposta de ratos à situação de estresse. Ou seja, estímulo estressante é capaz de induzir redução da ingestão alimentar, mas este efeito pode ser revertido pela SST (Stengel *et al.*, 2013).

Os estudos disponíveis na literatura evidenciam que a SST pode ter efeitos contraditórios sobre o comportamento alimentar, embora também indiquem que diferenças metodológicas podem ser responsáveis por tais

discrepâncias. Na presente dissertação, testou-se o efeito da microinjeção de SST no comportamento alimentar (apetitivo e consumatório) de ratos submetidos ao modelo de escolha de dietas seletivas de macronutrientes. Foi intenção contribuir com dados adicionais para procurar elucidar os efeitos da SST nesse comportamento de ratos em situação experimental controlada. É o que será descrito em detalhes no artigo a seguir.

1.3. Referências Bibliográficas

Abizaid A, Gao Q, Horvath TL. Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance. *Neuron*. 2006;51:691–702.

Abizaid A, Tamas, L. Brain Circuits Regulating Energy Homeostasis. *Regul Pept*. 2008;149(1-3):3–10.

Anderson GH. Diet, neurotransmitters and brain function. *Br Med Bull*. 1981;37:95-100. Arora Sarika. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity. *Neurop*. 2006;40: 375-401.

Atrens DM, Menéndez JA. Somatostatin and the paraventricular hypothalamus: modulation of energy balance. *Brain Resear*. 1993: 238-244.

Aponte G. ,Leung P., Gross D., Yamada T. Effects of somatostatin on food intake in rats. *Life Scien*. 1984; 35: 741-746.

Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. Ganong's Review of Medical Physiology. New York, Mc Graw Hill. 2010: 714.

Barros AGA. Regulação da homeostase energética pelo sistema dopaminérgico no modelo *Caenorhabditis elegans*. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais, 2010, pp. 152.

Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav*. 2002; 26: 393-428.

Berthoud HR. Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol. Behav*. 2004;81:781–793.

Berridge KC. Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci. Biobehav*. 1996;20:1–25.

Berridge KC. Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol. Behav*. 2004;81:179–209.

Blundell JE. Processes and problems underlying the control of food selection and nutrient intake. In: Wurtman Ri, Wurtman ii, eds. *Nutrition and the brain*. Vol.6. New York, NY: Raven Press. 1983:164-221.

Blundell JE. The control of appetite: basic concepts and practical implications. *Schweiz Med. Wochenschr*. 1999; 129: 182-8.

Blundell J. Pharmacological approaches to appetite suppression. *TIPS*. 1991;12:47-57.

Bray GA, LK Singer, DA York. Macronutrient intake following 2-deoxy-D-Glucose or 2-mercaptoacetate administration in rats. *Faseb J.* 1996; 10: A221.

Broberger CD, Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the protein systems. *J. Comp. Neurol.* 1998; 402(4): 460-74.

Brobeck JR. Mechanisms of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol. rev.* 1946; 26: 541–559.

Brazeau P., Vale W., Burgus R. Ling N., Butcher M., Rivier J and Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science.* 1973; 179: 77-79.

Benarroch EE. Neural control of feeding behavior overview and clinical correlations. *Neurology.* 2010; 74: 1643-1650.

Cummings SI, Truong GB, Gietzen DW. Neuropeptide Y and somatostatin in the anterior piriform cortex alter intake of amino acid-deficient diets. *Peptides.* 1998; 19: 527-535.

Cota D, Marsicano G, Lutz B, Vicennati V, Stalla GK, Pasquali R et al. Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int. j. obes. Relat. Metab. Disord.* 2003a; 27: 289–300.

Cupples WA. The motivated hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284: R1375.

Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF, Cone RD. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron.* 1999; 24: 155–163.

Carlini VP, Varas MM, Cragolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN, Barioglio SR. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 313(3): 635-641.

Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.* 2005; 8: 585–589.

Dickson PR, Feifel D, Vaccarino FJ. Blockade of endogenous GRF at dark onset selectively suppresses protein intake. *Peptides.* 1995; 16: 7-9.

Dietrich, BM. Participação da amígdala medial pósterio-dorsal sobre o comportamento alimentar de ratos: expressão da proteína fos após microinjeção intracerebroventricular de neuropeptídeo Y. Dissertação de

Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2012.

Dong HW, Petrovich G, Swanson LW. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Rev.* 2001; 38: 192-246.

Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, et al. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron.* 1998;21:1375–1385.

Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell.* 2004; 116:337–350.

Fisher AE. The role of limbic structures in the central regulation of feeding and drinking behavior. *Ann NY Acad Sci.* 1969; 157: 894-901.

Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell.* 1998; 92:437-40.

Fonberg E. Changes in alimentary behavior after medial amygdala damage in dog, cat and rat. In: KATSUKI Y, SATO M, TAKAGI SF, OOMURA Y. (Eds.). *Food Intake and chemical senses.* Tokyo: Japan Scientific Society Press. 1977; 437-52.

Feifel D, Vaccarino FJ. Central somatostatin: a re-examination of its effects on feeding. *Brain Res.* 1990; 535: 189-94.

Feifel D, Vaccarino FJ, Rivier J, Vale WW. Evidence for common neural mechanism mediating growth hormone-releasing factor-induced and somatostatin-induced feeding. *Neuroendocrin.* 1993; 57: 299-305.

Finley JC, Moderdrut JL, Roger LJ, Petrusg P. The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuro.* 1981; 6: 2173-92.

Fung LC, Greenberg GR. Characterization of somatostatin receptor subtypes mediating inhibition of nutrient-stimulated gastric acid and gastrin in dogs. *Regul Pept.* 1997; 68: 197-203.

Gugger M, Waser B, Kappeler A, Schonbrunn A, Reubi JC. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor sst2 in human gut and lung tissue: possible implications for physiology and carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci.* 2004; 1014: 132-6.

Grossman SP, Grossman L. Food and water intake following lesion or electrical stimulation of the amygdala. *Am. J. Physiol.* 1963; 205:761–765.

Grossman SP. Role of the hypothalamus in the regulation of food and water intake. *Psychol Rev.* 1975; 82:200-24.

Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1973;84:488-495.

Galaverna OG, Seeley RJ, Berridge KC, Grill HJ, Epstein AN, Schulkin J. Lesions of the central nucleus of the amygdala. I: effects on taste reactivity, taste aversion learning and sodium appetite. *Behav Brain Res.* 1993;59 11-17.

Grimm RE, Steinle N. Genetics of eating behavior: established and emerging. *Nutr Rev.* 2011; 69: 52-60.

Hetherington AW, Ranson SW. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat. Rec.* 1940;78:149.

Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294: E827-E832.

Hoebel BG. Neurotransmitters in the control of feeding and its rewards: monoamines, opiates, and brain-gut peptides. In: Stunkard AJ, Stellar, E, eds. *Eating and its disorders*, New York, NY: Raven Press, 1984:15-38.

Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu ZW, Gao XB, et al. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron.* 2006; 51:801-810.

Huang T, Yan J, Kang Y. Role of the central amygdaloid nucleus in shaping the discharge of gustatory neurons in the rat parabrachial nucleus. *Brain Res. Bull.* 2003; 61:443-452.

Inui A. Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved? *Trends Pharmacol. Sci.* 1999; 20:43-46.

I

shikawa M, Mizobuchi M, Takahashi H, Bando H, Saito S. Somatostatin release measured by in vivo microdialysis: variation and effect of prolonged food deprivation. *Brain Res.* 1997; 749: 226-231.

Johansson O, Hokfelt T, Elde RP. Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuro.* 1984; 13: 265-339.

Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra OS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr. Ver.* 1999;20:68-100.

Kakigi T, Maeda K. Effect of serotonergic agents on regional concentrations of somatostatin and neuropeptide y-like immunoreactivities in rat brain. *Bra Resear*. 1992; 599: 45-50.

Kanarek RB, Marks-Kaufman R, Ruthazer R, Gualtieri L. Increased carbohydrate consumption by rats as a function of 2-deoxy-D-glucose administration. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1983;18:47–50.

Kanarek RB. Determinants of dietary self-selection in experimental animals. *Am J Clin Nutr*. 1985;42:940-950.

Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J. Neurosci*. 2002; 22: 3306–3311.

Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol. Behav*. 2005; 86:773-795.

King BM, Rossiter KN, Stines SG, Zaharan GM, Cook JT, Humphries MD, et al. Amygdaloid-lesion hyperphagia: impaired response to caloric challenges and altered macronutrient selection. *Am J Physiol*. 1998;275:485-493.

King BM, Cook JT, Rossiter KN, Rollins BL. Obesity-inducing amygdala lesions: examination of anterograde degeneration and retrograde transport. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 284: R965-R962.

Kupfermann I, Kandel ER, Iversen S. Motivational and addictive states. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of Neural Scien*. New York. McGraw-Hill. 2000: 998-1013.

Lamberts SW, Vanderlely AJ, Herder WW, Hofland LJ. Somatostatin analogs: future directions. *Metabol*. 1996; 45: 104-6.

Leibowitz SF. Neurochemical systems of the hypothalamus control of feeding and drinking behavior and water-electrolyte excretion. In: Morgane PJ, Panksepp J, eds. *Handbook of the hypothalamus. Behavioral studies of the hypothalamus*. Vol.3. New York, NY: Marcel Dekker, 1980:229-437.

Leibowitz SF, Hoebel BG. Behavioral neuroscience and obesity. In: Bray, GA.; Bouchard, C., editors. *Handbook of Obesity. Etiology and Pathophysiology*. New York, NY: Marcel Dekker; 2004.

Lenard NR, Berthoud HR. Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Dec;16 Suppl 3:S11-22.

López M, Tovar S, Vásquez MJ, Williams LM, Diéguez C. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc*. 2007;66:131-155.

Lin MT, Chen JJ, Ho LT. Hypothalamic involvement in the hyperglycemia and satiety actions of somatostatin in rats. *Neuroendo.* 1987; 45: 62-7.

Machado UF, Carpinelli AR, Zecchin HG, Saad MJA. Pâncreas endocrine. In: Aires MM. *Fisiologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008, pp. 1032-1050.

Micevych PE, Matt DW, Go VL. Concentrations of cholecystokinin substance P, and bombesin in discrete regions of male and female rat brain: sex differences and estrogen effects. *Exp Neurol*. 1998; 100: 416-25.

Moga MM, Gray TS. Evidence for corticotrophin - releasing factor neurotensin and somatostatin in the neural pathway from the central nucleus of the amygdala to the parabrachial nucleus. *J Comp Neurol*. 1985; 241: 275-84.

Moller LN, Stidesen CE, Hartmann B, Holst JJ. Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1616: 1-84.

Meyer JH. Release of secretin and cholecystokinin. In: Chey WY, Brooks FP, eds. *Endocrinology of the Gut*. Thorofare, NJ: Charles B. Slack. 1974;241-52.

Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Natu*. 2006;443:289–295.

Milagro F, Marques-Lopes I. Sistema nervioso y obesidad. *Na. Sist. Sanit. Navar*. 2002; 25(1):41-52.

Ookuma KC, Barton C, York DA, Bray GA. Effect of enterostatin and kappa-opioids on macronutrient selection and consumption. *Peptides*. 1997;18:785–791.

Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. Regulation and function of somatostatin receptors. *J of Neurochem*. 2004; 89: 1057-1091.

Panetta R, Greenwood MT, Warszynska A, Demchyshyn LL, Day R, Niznik HB, Srikant CB, Patel YC. Molecular cloning, functional characterization, and chromosomal localization of a human somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin – 28. *Mol Pharmacol*. 1994; 45: 417-27.

Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front in Neuroendocrinol*. 1990; 20: 157-198.

Peters JH, Simasko SM, Ritter RC. Leptin Analog Antagonizes Leptin Effects on Food Intake and Body Weight but Mimics Leptin-Induced Vagal Afferent Activation. *Endocrino*. 2007;148(6): 2878–2885.

Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Rev.* 2001; 38: 247-289.

Petrovich GD. Forebrain networks and the control of feeding by environmental learned cues. *Physiol Behav.* 2013;doi:10.1016/j.physbeh.2013.03.024

Prieto MS, Guillén M, Sáiz PG, Portolés O, Corella D. The rs1466113 polymorphism in the somatostatin receptor 2 gene is associated with obesity and food intake in a mediterranean population. *Ann Nutr Metab.* 2010; 57: 124-131.

Rosa CB, Goularte JF, Trindade NA., De Oliveira AP. e Rasia-Filho AA. Glutamate Microinjected in the Posterodorsal Medial Amygdala Induces Subtle Increase in the Consumption of a Three-Choice Macronutrient Self-Selection Diet in Male Rats. *Anat. Rec.* 2011; 294(7):1226-1232.

Rolls ET. Taste, olfactory, and food texture processing in the brain, and the control of food intake. *Physiol. Behav.* 2005; 85:45-56.

Rollins BL, King BM. Amygdala-lesion obesity: what is the role of the various amygdaloid nuclei? *Am J Physiol.* 2000; 279:1348–56.

Rezek M, Havlicek V, Hughes KR, Friesen H. Central site of action of somatostatin (SRIF): role of hippocampus. *Neuropharm.* 1976; 15: 499-504.

Scott K. Chemical senses: taste and olfaction. In: Squire LR, Berg D, Bloom FE, Du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC. *Fundamental Neuroscience.* Waltham. Academic Press. 2013: 513-530.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nat.* 2000;404:661–671.

Schindler M, Humphrey PPA, Emson PC. Somatostatin receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 1996; 50: 9-47.

Singewald N, Chicchi GG, Thurner CC, Tsao KL, Spetea M, Schmidhammer H, Sreepathi HK, Ferraguti F, Singewald GM, Ebner K. Modulation of basal and stress – induced amygdaloid substance P release by the potent and selective NK1 receptor antagonist L-822429. *J Neurochem.* 2008; 106: 2476-88.

Shor-Posner G, Azar AP, Filart R, Tempel D, Leibowitz SF. Morphine-stimulated feeding: analysis of macronutrient selection and paraventricular nucleus lesions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986;24: 931–939.

Smith BK, Berthoud H, York DA, Bray GA. Differential effects of baseline macronutrient selection after galanin, NPY, and an overnight fast. *Peptides.* 1997; 18: 207-11.

Stanley BG, Daniel DR, Chin AS, Leibowitz SF. Paraventricular nucleus injection of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides*. 1985; 6: 1205-11.

Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol. Rev.* 2005;85:1131–1158.

Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, Monnikes H, Taché Y. Selective central activation of somatostatin receptor 2 increases food intake, grooming behavior and rectal temperature in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2010; 61: 399-407.

Stengel A, Rivier J, Taché Y. Central actions of somatostatin – 28 and oligosomatostatin agonist to prevent components of the endocrine, autonomic and visceral responses to stress through interaction with different somatostatin receptor subtypes. *C Pharmacol Desin.* 2013; 19: 98-105.

Scalera G, Torozzi G. Somatostatin administration modifies food intake, body weight, and gut motility in rat. *Peptides*. 1998; 19: 991-997

Stepanyan Z, Kocharyan A, Behrens M, Koebinck C, Pyrski M, Meyerhof W. Somatostatin, a negative-regulator of central leptin action in the rat hypothalamus. *J Neuroch.* 2007; 100: 468-478.

Schimada M, Date Y, Mondal MS, Toshinai K, Shimbara T, Fukunaga K et al. Somatostatin suppresses ghrelin secretion from the rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 302: 520-525.

Silva AP, Bethmann K, Raulf F, Schmidt HA. Regulation of ghrelin secretion by somatostatin analogs in rats. *Eur J Endocrinol.* 2005; 152: 887-94.

Tachibana T, Cline MA, Sugahara K, Ueda H, Hiramatsu K. Central administration of somatostatin stimulates feeding behavior in chicks. *Gen Comp Endocrinol.* 2009; 161: 354-59.

Tannenbaum GS, Patel YC. On the fate centrally administered somatostatin in the rat: massive hypersomatostatinemia resulting from leakage into the peripheral circulation has effects on growth hormone secretion and glucoregulation. *Endocrinology.* 1986; 118: 2137-43.

Tordoff M. Obesity by choice: the powerful influence of nutrient availability on nutrient intake. *Am J Physiol Regul Intg Comp Physiol.* 2002; 282: 1536-1539.

Valenstein ES, Cox VC, Kakolewski JW. Modification of motivated behavior elicited by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Science.* 1968; 159: 1119–1121.

Valenstein ES, Mittleman G. Ingestive behavior evoked by hypothalamic stimulation and schedule- induced polydipsia are related. *Scien.* 1984;224:415–417.

Weckbecker G, Lewis I, Rainer A, Herbert SA, Hoyer D, Bruns C. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat.* 2002; 2: 999-1017.

Watanobe H, Habu S. Leptin regulates growth hormone-releasing factor, somatostatin, and α - melanocyte-stimulating hormone but not neuropeptide Y release in rat hypothalamus in vivo: relation with growth hormone secretion. *J Neurosci.* 2002; 22: 6265-6271.

Willians KW, Elmquist JK. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nat Neurosci.* 2012; 15: 1350-1355.

Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, Seeley RJ. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol.* 2000; 51: 255-277.

Woods SC, Stricker EM. Food intake and metabolism. In: Squire LR, Berg D, Bloom FE, Du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC. *Fundamental Neuroscience.* Waltham. Academic Press. 2013; 767-782.

York AD. Peripheral and Central Mechanisms Regulating Food Intake and Macronutrient Selection. *Obes. Surg.* 1999; 9: 471-479.

Yeo GH, Heisler L. Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nat.* 2012; 15: 1343-1349

Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinol.* 1993;133:1753–1758.

Zelster LM, Seeley RJ, Tschöp MH. Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance. *Nat Neurosci.* 2012;15: 1336-1342.

2 Objetivos e Metas

2.1 Objetivos

2.1.1 Geral

Estudar a modulação neuropeptidérgica do comportamento alimentar de ratos.

2.1.2 Específico

Estudar o efeito da microinjeção intracerebroventricular da somatostatina nos comportamentos apetitivo e consumatório alimentar de ratos submetidos ao modelo de acesso a dietas de seleção de macronutrientes isolados em condições de laboratório.

2.2 Meta

Os resultados advindos do presente estudo podem contribuir para avançar o conhecimento sobre a base neural de controle do comportamento alimentar em ratos. Busca-se desvendar as ações da somatostatina no comportamento alimentar, uma vez que, baseado em estudos prévios, sua participação ainda não está plenamente elucidada.

3. Artigo científico redigido em inglês

Elaborado de acordo com as normas da revista Behavioral Brain Research
(<http://www.journals.elsevier.com/behavioural-brain-research/>)

“Effect of centrally microinjected somatostatin on the appetitive and feeding behaviors of rats tested in the self-selection macronutrient diet paradigm”.

Effect of centrally microinjected somatostatin on the appetitive and feeding behaviors of rats tested in the self-selection macronutrient diet paradigm

**Marli Sita Scalcon¹, Bruna Mombach Dietrich¹, Bruna Marmett² and
Alberto A. Rasia-Filho^{1,2 *}**

¹ Post Graduation Course in Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

²Department of Basic Sciences/Physiology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Running title: Somatostatin, appetitive and feeding behavior

*Correspondence to:

Prof. Alberto A. Rasia-Filho

Federal University of Health Sciences / Dept. Basic Sciences / Physiology

R. Sarmiento Leite 245

Porto Alegre 90170-050 RS

Brazil

E-mail: rasiafilho@pq.cnpq.br, aarf@ufcspa.edu.br

Phone: + 55 51 33038752

ABSTRACT

The central control of feeding behavior in rats involves different neuropeptides with orexigenic and anorexigenic modulatory actions. Here, it was studied the effects of intracerebroventricular (icv) microinjection of somatostatin on the appetitive and consummatory ingestive behaviors of rats under the paradigm of the self-selection macronutrient isolated diets [high-carbohydrate (high-CHO), high-protein and high-lipid food pellets]. Adult male rats were submitted to a sham procedure (n=8) or received icv microinjections of artificial cerebrospinal fluid (aCSF; 5 μ L, n=8) or somatostatin (1 μ g and 10 μ g/5 μ L, n=10 and 8, respectively). Control and test data were obtained after a fasting protocol. Feeding behavior was evaluated along a 2-hr test period of free access to the selective diets. Rats in all groups adapted well to the experimental condition and preferred the high-CHO diet. Animals from the sham and aCSF groups showed similar results. Interestingly, both doses of somatostatin increased appetitive behaviors but there was a high variability in the basal consumption of the high-CHO diet that precluded further comparisons of the somatostatin effects with those from the control groups. When testing “within- groups” effects, both doses of somatostatin did not induce significant changes neither in consummatory feeding behavior. These data impose new and relevant methodological improvements for the evaluation of feeding responses in rats, notably on the use of “within-groups” comparisons, and evidence effects of central somatostatin on the appetitive display in the present behavioral model.

Keywords: central control of appetite, eating behavior, motivation, neuropeptides.

1. INTRODUCTION

Multiple neural systems dynamically control energy homeostasis, feeding behavior and body weight in rats [1-4]. The central organization of feeding behavior requires the integrated action of neurotransmitters, neuropeptides and hormones for eating motivation, cue-induced feeding, associative learning, decision making, reward or punishment to the ultimate modulation of hunger, appetite and satiety [3-6]. For example, the major excitatory neurotransmitter glutamate increases food consumption when microinjected in the hypothalamic lateral nucleus [7,8], which functional cooperation is also needed to display the potent orexigenic effects of neuropeptide Y (NPY) in this area [9]. Moreover, the integration of feeding behavior with emotional processing and associative learning involves various hypothalamic nuclei, such as the ventromedial, the arcuate and the paraventricular (PVN) ones, as well as other extra-hypothalamic forebrain areas, including distinct amygdaloid nuclei [6,10-14]. In common, these areas integrate various sensory inputs and can modulate adaptive behaviors, including food intake and energy balance [1,2].

Somatostatin (SST) is a centrally expressed neuropeptide in the rat brain [15-18] and a putative candidate to elicit feeding responses because of its presence and possible actions in these above-mentioned brain areas [16,18]. Indeed, SST is involved in the modulation of energy balance acting in the PVN as a signaling substance of increased body fat and to bring about sympathetic-induced blood glucose level rise [16] and would increase amino acids or fat

ingestion [17,19; respectively). However, it is remarkable that there are restrict and controversial findings involving the modulatory effects of SST on eating display. Evident methodological differences involving different species and food disponibility to tested animals, discrepant uses of low to higher doses of somatostatin or motor behavior side-effects such as “scratching”, grooming and rotational movements [compare data in different reports as 16-23] preclude the current establishment of a conclusive action for this neuropeptide on the feeding behavior of rats. Then, this is an open venue that deserves further experimental elaboration.

Here, we tested the effects of intracerebroventricular (icv) microinjections of SST on the appetitive and consummatory ingestive behaviors of rats under the paradigm of major macronutrient-specific dietary selection. This behavioral approach allows the animal to choose the preferred energy source to be ingested and can reveal if animals have more pronounced motivational and/or ingestive responses induced by different doses of a specific neurotransmitter/neuromodulator [14,24].

2. MATERIALS AND METHODS

The methodological approach described below appeared previously in Rosa et al. [14] and Dietrich et al. [24], this latter adapted for the present icv microinjections of somatostatin.

2.1. Animals

All animals were adult male Wistar rats (3-4 months old, N= 34), not siblings, initially housed in groups with standard lab chow (Bio Base/Bio-Tec,

Brazil) and water *ad libitum*, room temperature maintained around 22°C and a 12 h light/dark cycle (lights on at 6 a.m.). All rats were manipulated according to international laws for the ethical care and use of laboratory animals (European Communities Council Directive of November 1986, 86/609/EEC). The present project was approved by the local Ethics Committee (Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Brazil; protocol no. 066/11).

2.2. Experimental Procedure

The procedural design involved adapting periods and control and test recordings along 16 experimental days (EDs; represented schematically in Figure 1). The first ED corresponded to the placement of each rat in an individual metabolic cage (21 x 24 x 21 cm³ of length, size and height, respectively; in accordance with the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, National Academy of Science, USA, 1996). An initial period of 4 days was allowed for the acclimatization of the rat to its new environment. During this period, it was offered free access to food pellets of a full nutrient diet based on the AIN-93M (composition shown in Table 1; consumption values in Table 2, ED 4). Water was available along all the EDs. The urine aspect and volume did not indicate the occurrence of dehydration in any moment (data not shown). In every ED, food intake was evaluated by the difference between the initial weight of the available food and its final weight at the end the monitoring period. Spillage was collected on paper towels and subtracted from food consumption to correct the values obtained. Rat body weight was evaluated each day along the experiment. No behavioral test for depression or plasma stress hormones measurements were done to directly determine possible side-effects of isolation

in rats. This was done to avoid undue stress to the rats. Nevertheless, during this initial period of isolation, and more notably thereafter, rats displayed a constant and homogeneous increase in body weight and no signs of illness or abnormal behaviors, as reported elsewhere [14,24].

On the EDs 5 to 8, rats received a three-choice self-selection macronutrient isolated diets [pellets made from high-carbohydrate (high-CHO), high-protein and high-lipid diets as depicted in Table 1]. Diets were offered in separate dishes attached to the metabolic cage. The location of each dish inside the cage was changed daily to avoid biases resulting from a conditioned place preference. The “palatability” of the high-CHO diet was not intentionally enhanced by adding sweet monosaccharides and disaccharides. Although it is possible that few corn starch had been broken in less complex sugars, heating temperature that induce the formation of a final high amount of dextrin was avoided during the diet preparation [c.f., 14]. Values of daily intake of these selective diets are shown in Table 2 (on ED 8).

On the ED 10, rats were food deprived for 4 hr per day (from 8 a.m. to 12 a.m.) and, thereafter, allowed to eat the macronutrient isolated diets during 2 hr. During this period, it was recorded the rat searching for food (i.e., the number of attempts to reach the dishes containing each macronutrient isolated diet), the number of times each rat ate a pellet of any diet (both parameters evaluated as appetitive behaviors) and the amount of food intake of each self-selection diet (in grams, indicative of food consumption/consummatory behavior). These values served as the basal, “within group” control recordings (Table 2, on ED 10) to be compared with the effects obtained on the upcoming test day .

On the ED 11 (beginning at 8 a.m.), rats were anesthetized with ketamine and xylazine (80 and 10 mg/kg, i.m., respectively) and stereotactically implanted with a stainless steel guide cannula (0.6 mm of outer diameter, OD) in the right lateral ventricle of the brain. The stereotaxic coordinates were: 1.0 mm posterior to the bregma, 1.5 mm lateral to the midsagittal suture and 3.5 mm below the dura-mater [adapted from 25]. The upper incisor bar was positioned horizontally to the interaural line.

On the EDs 12 and 13, animals were on the post-surgical recovering period and had free access to the isolated macronutrient diet. On the EDs 14 and 15, rats were gently manipulated to simulate the icv microinjection procedure (described below) and were again allowed to eat the macronutrient isolated diets until the next day.

On the ED 16, rats were deprived of food for 4 hr and, thereafter, a microinjection needle (0.3 mm OD) was introduced in the stereotaxic guide cannula for the icv microinjections. Rats were randomly assigned to receive artificial cerebrospinal fluid (aCSF, 5 μ L, n= 8) or SST (1 μ g or 10 μ g/5 μ L diluted in aCSF, n= 10 and 8, respectively). The aCSF composition was: NaCl 126mM, KCl 2.5mM, NaH_2PO_4 1.25mM, MgCl_2 2mM, CaCl_2 2mM, NaHCO_3 26mM, and glucose 10mM [26]. SST was purchased from Sigma Chemicals Co. (USA). Both doses of SST were previously reported as able to promote marked feeding behavior effects [20,21]. The displacement of liquid and an air bubble inside the catheter connecting a 1- μ L Hamilton microsyringe (USA) to the icv cannula was used to monitor the microinjection. This lasted for 1 minute and the needle remained inside the cannula for an additional minute to avoid reflux [14,24]. No obvious alterations in behavior were noted after microinjections. The

control group assigned for sham microinjection (n= 8) was manipulated as the other experimental groups, had a needle inserted in the icv cannula to mimic the procedure of microinjection, but did not receive any treatment.

Immediately afterwards, rats returned to their metabolic cage and had access to the three-choice macronutrient self-selection diet. The consumption of each diet was evaluated at the end of 2 hr following microinjection (shown in Table 2, on ED 16). It was counted the occurrence of the appetitive behaviors and the ingested amount of each macronutrient isolated diet.

At the end of the experiment, rats were deeply anesthetized as aforementioned and icv microinjected with methylene blue to identify the location of the microinjection site. Rats were transcardially perfused with phosphate buffer solution (PBS, 0.1 M, pH 7.4) followed by 4% paraformaldehyde diluted in PBS. Brains were removed from the skull, remained in the same fixative solution for 12 hr, stayed in a 30% sucrose solution at 4°C for at least 1 week and, thereafter, were sectioned using a vibratome (Leica, Germany; 50 µm-thick coronal sections) to identify the path of the icv cannula. No animal with signals of large mechanical lesions or brain hemorrhage was included in the studied groups.

2.3. Statistical Analysis

The weight gain of the rats along the EDs 1, 10 and 16 was subjected to an analysis of variance (ANOVA) test for repeated measures followed by the Newman-Keuls test. Appetitive behaviors evaluated as the number of searches for the dishes containing the selective diets and the frequency that each rat ate a “pellet” of food were compared among groups on ED 16 by the non-

parametric Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test. Due to the evident variability in the basal amount of diet consumption, the amount of high-CHO diet ingested on EDs 10 and 16 were compared within groups by the non-parametric Wilcoxon test for paired measures. The low consumption of the high-protein and the high-lipid selective diets prevented further statistical comparisons among groups. In all cases, results were considered significant when $P \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Body weight

Animals in all groups showed increased values of body weight along the EDs 1, 10 and 16 [mean $\pm$ standard deviation (SD), 254.4 ± 22.8 ; 264.9 ± 24.5 and 272.5 ± 23.5 grams, respectively], which were statistically significant [$F(2,34) = 16.1$; $P < 0.01$] and different from each other ($P < 0.05$ in all cases).

3.2. Appetitive behaviors and selective diet intake

Data are shown in Tables 2 and 3. Animals adapted to the experimental conditions and ingested the AIN-93M diet along the first EDs (see mean values on ED 4). When rats had free access to the self-selection macronutrient diet, all groups showed a clear preference for the high-CHO diet when compared to the other energy sources (see mean values on ED 8). Following 4 hr of food deprivation and the subsequent 2 h of free access to the 3-choice self-selection macronutrient diet, rats in all groups also ate more of the high-CHO diet (see mean values on ED 10). Rats ingested the high-protein and the high-lipid diets, but it occurred in small amounts (Table 2). However, it is worth noting that

animals that were randomly assigned to the microinjections of SST showed an unexpected high food consumption on ED 10, for example, and, then, prior to additional experimental manipulation.

There was a statistically significant difference among experimental groups in the appetite behaviors of searching for food dishes and the frequency of eating the pellets of any selective diet on the ED 16 (KW test, $P < 0.01$ in both cases). For these both parameters, the *post hoc* test showed that values from the sham group and the group microinjected with aCSF were not statistically different ($P > 0.05$), whereas both doses of SST, although not differing between each other, increased these appetitive behaviors when compared to the aCSF control group ($P < 0.05$; Table 3).

There were no statistically significant within-group differences in the intake of the high-CHO diet. That is, control data obtained on ED 10 compared to values on the post-microinjection period on ED 16 were not different in the sham ($P = 0.62$), aCSF ($P = 0.12$), SST 1 μg ($P = 0.82$) or SST 10 μg ($P = 0.46$; Table 2).

4. DISCUSSION

Rats had a continuous body weight gain along the EDs and a preference for the high-CHO selective diet. Sham and aCSF microinjected groups had similar results and served as control data [24]. SST induced appetite behaviors but did not enhance food consumption of the high-CHO diet. However, variability in basal data occurred and need further methodological considerations.

The present behavioral model has been used for revealing the participation of putative neuroanatomical areas in the central control of feeding behavior in rats [14,24]. In effect, recently it was revealed [24] that icv microinjected NPY increased ingestive behavior with an dose-dependent, inverted “U” shape relationship under the present behavioral paradigm. Microinjection of NPY 1 μ g was able to stimulate searching for food, the number of times the rat ate a selective diet and promoted a higher CHO intake, either when compared to within-group control recording or among groups after microinjection. This NPY-mediated orexigenic effect (on consummatory ingestive behavior rather than on appetitive behaviors) also strongly correlated with the number of Fos-immunoreactive cells in the MePD. On the other hand, NPY 10 μ g stimulated appetitive behaviors, but did not consistently affect the consummatory ingestive behavior or the Fos expression in the MePD when compared to the aCSF microinjected group [24].

Here, it was shown that SST increased appetitive behaviors but did not enhance consummatory feeding behavior. It is likely that the central network for ingestive behavior responds differently to neurotransmitters and neuromodulators that code for the specific “fine-tuning” of behavioral displays. Nevertheless, it must be mentioned that SST microinjected animals showed a surprisingly basal high food intake even being reared under the same conditions than the control groups. This inherent variability in the data imposed the need for a “within-group” analysis, which is more indicated when values can not be reliably compared between groups due to an expected difference in basal, pre-treatment data. Using this approach, it was possible to track the variations of the individual members of the group by the use of a paired comparison and