



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE GLUTAMATO NO NÚCLEO PÓSTERO-
DORSAL DA AMÍGDALA MEDIAL SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR
DE RATOS**

CAROLINA BÖETTGE ROSA

**PORTO ALEGRE
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS e
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA GERAL E EXPERIMENTAL
LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS CLÍNICA E EXPERIMENTAL**

**EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE GLUTAMATO NO NÚCLEO PÓSTERO-
DORSAL DA AMÍGDALA MEDIAL SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR
DE RATOS**

Carolina Böettge Rosa

Orientador: Prof. Dr. Alberto Antonio Rasia Filho

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**PORTO ALEGRE
2008**

Dedico este trabalho à minha família, fonte de alegria e inspiração para minha vida. Aos meus irmãos (brinquedos mais queridos da minha infância!), por me mostrarem quão grande e incondicional é o amor. Aos meus pais, Loiva e Moacir, verdadeiros mestres, modelos reais de dedicação, altruísmo, amor, respeito, paciência e tolerância. Pela graça de tê-los comigo, por serem presença constante em minha vida, pelo amor, carinho e estímulo que sempre me ofertaram e, principalmente, pelos valores morais e éticos que me transmitiram.

*A vida é escuridão,
exceto quando há impulso,
e todo impulso é cego,
exceto quando há saber,
e todo o saber é vazio,
exceto quando há trabalho,
e todo trabalho é vazio,
exceto quando há amor.*

Kahlil Gibran

AGRADECIMENTOS

A Deus pela luz no meu caminho.

Ao Ricardo, pelo amor e apoio que não cabem em uma lista, ao qual também dedico este trabalho. Obrigada por sua amizade, paciência, compreensão e, acima de tudo, por ter trazido à minha vida paz e felicidade.

Ao meu orientador e querido mestre, Prof. Dr. Alberto A. Rasia Filho, que norteou meus passos até aqui, por todos os ensinamentos, carinho, incentivo, oportunidade, paciência e confiança.

Ao estimado Prof. Dr. Pedro Dall'Ago, pelo suporte de informática (além das soluções mágicas!), carinho e atenção com que sempre me acolheu.

À Profa. Dra. Márcia Giovenardi, pelo carinho e por sua dedicação ao bom andamento do Laboratório de Fisiologia da UFCSPA.

À Profa. Dra. Liane Rotta pela atenção e colaboração na etapa final deste trabalho.

À Profa. Dra. Marilda Fernandes e às técnicas do Laboratório de Patologia da Pós-Graduação da UFCSPA, Rosalva e Terezinha, pela atenção e por permitirem a utilização do laboratório para algumas das técnicas utilizadas no trabalho.

À Profa. Dra. Matilde Achaval pela colaboração no empréstimo do vibrátomo e pelo uso do laboratório de Histofisiologia Comparada da UFRGS.

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

À Técnica do Laboratório de Fisiologia, Carmem Rocha, por sua valiosa colaboração, carinho e dedicação que vão além do excelente apoio técnico.

A todos os alunos e colegas do laboratório de Fisiologia da UFCSPA, pelo convívio, sugestões e colaborações. Especialmente aos amigos: Alexandre Paim, Edson Quagliotto e Helinton Neckel, por terem me recebido e ensinado muitas das técnicas deste trabalho, além de participarem ativamente do planejamento e execução do mesmo; aos queridos: Ramiro Barcos, Rodrigo Jaenisch, Vitor Scotta, Deise Pacheco e Daniela Haas pelo convívio, carinho, amizade e indispensável companhia, sem os quais certos momentos seriam difíceis; e a minha grande e insubstituível amiga Elisa De Leon, por sua obstinação que me fortalece, por ter dividido comigo todos os momentos destes dois anos, por manter meus níveis séricos de cafeína elevados e, principalmente, por me entender como poucos.

Aos Alunos de iniciação científica Jéferson Goularte e Nathália Trindade por sua dedicação e empenho por este trabalho.

Ao Alexandre Masliniewsky, pela paciência, carinho, amizade e apoio técnico nos experimentos.

À Secretaria de Pós-Graduação da UFCSPA, em especial à Nice, pelo auxílio, carinho e atenção.

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

À CAPES e PIBIC-PIC pelas bolsas e financiamento para execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 AMÍGDALA	18
2.1.1 AMÍGDALA MEDIAL	21
2.2 GLUTAMATO	28
2.3 COMPORTAMENTO ALIMENTAR	31
3 OBJETIVOS.....	39
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA	40
5 ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	54
6 ARTIGO EM INGLÊS.....	83
7 CONCLUSÃO	113

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Amígdala anterior
AAP	Área amigdalar piriforme
ABL	Amígdala basolateral
ABLa	Amígdala basolateral anterior
ABLI	Amígdala basolateral lateral
ABLp	Amígdala basolateral posterior
ABMa	Amígdala basomedial anterior
ABMp	Amígdala basomedial posterior
ACe	Amígdala central
ACO	Amígdala cortical
ACOa	Amígdala cortical anterior
ACOm	Amígdala cortical medial
ACOl	Amígdala cortical lateral
ACOp	Amígdala cortical posterior

ACOppm	Amígdala cortical pósteromedial
ACOppl	Amígdala cortical pósterolateral
AgRP	Proteína relacionada ao agouti
AL	Amígdala lateral
α -MSH	α -melanocortina
AMe	Amígdala medial
AMeAD	Amígdala medial ântero-dorsal
AMeAV	Amígdala medial ântero-ventral
AMePD	Amígdala medial pósterodorsal
AMePV	Amígdala medial pósterovernal
AMPA	a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
AOB	Bulbo olfativo acessório
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
ATC	Área tegmental central
ATV	Área tegmental ventral
Bi	Núcleo basal, subdivisão intermediária
BMmc	Núcleo basomedial, subdivisão magnocelular
BMpc	Núcleo basomedial, subdivisão parvocelular
BNST	Núcleo intersticial da estria terminal
BO	Bulbo olfatório
BOT	Núcleo intersticial do trato olfatório

Bpc	Núcleo basal, subdivisão parvocelular
BST	Núcleo próprio da estria medial
CART	Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
CCK	Colecistocinina
CEc	Núcleo central, subdivisão capsular
CEl	Núcleo central, subdivisão lateral
CEm	Núcleo central, subdivisão medial
COa	Núcleo cortical, subdivisão anterior
COp	Núcleo cortical, subdivisão posterior
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DMH	Hipotálamo dorsomedial
2 - DG	2-deoxi-D-glicose
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon
HA	Histamina
Icv	intracerebroventricular
In	Núcleos intercalados da amígdala
LHA	Área hipotalâmica lateral
MCH	Hormônio concentrador de melanina
MPOA	Área pré-óptica medial
NAc	Núcleo acumbens
NMDA	N-metil-D-aspartato

NTS	Núcleo do trato solitário
NPY	Neuropeptídeo Y
ORX	Orexina
OXM	Oxintomodulina
PBN	Núcleo parabraquial
Pir	Córtex piriforme
POMC	Pró-opiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular
PYY	Peptídeo YY
ST	Estria terminal
TO	Trato óptico
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
VMH	Hipotálamo ventro-medial

1 INTRODUÇÃO

Em mamíferos, a ingestão alimentar faz parte de um comportamento de regulação homeostática de nutrientes para uso imediato ou *a posteriori*, como forma de garantir substratos metabólicos de forma contínua para os tecidos corporais com base nas necessidades de cada período e na demanda imposta às reservas energéticas formadas previamente. De modo simplista, poder-se-ia considerar que, excluindo o que ocorre com seres humanos, nos outros animais parece que a ingestão alimentar é influenciada pelos mecanismos que regem a fome, a saciedade e os mecanismos fisiológicos que unem a ingestão alimentar com o fornecimento de calorías, gasto celular e o peso corporal.

Na década de 40 do século passado, descreveu-se que ratos tornavam-se hiperfágicos e obesos após lesões bilaterais no núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) enquanto, ao contrário, lesões bilaterais na área hipotalâmica lateral (LHA) restringiam bastante a fome e a sede do animal e, a menos que houvesse alguma ação imposta ao mesmo, este morreria de inanição (HETHERINGTON; RANSON, 1942). Partindo dessas observações, Stellar (1954) sugeriu a hipótese dos dois “centros” de regulação do comportamento alimentar, onde o VMH seria o “centro da saciedade” e a LHA, o “centro da fome”, estando ambos numa interrelação funcional para as atividades realizadas pelos animais. Próximo desta época propôs-se que sinais inibitórios gerados em proporção aos conteúdos de tecido adiposo branco atuariam no

encéfalo reduzindo a ingestão alimentar e que a perda de peso causada por uma restrição calórica faria diminuir estes sinais, resultando em um aumento da ingestão calórica até que a deficiência energética fosse corrigida (KENNEDY, 1953). Porém, com a identificação de várias outras estruturas encefálicas com papel importante no comportamento alimentar, que lesões hipotalâmicas poderiam gerar respostas inespecíficas ao alterar a fome ou a saciedade, e que microinjeções de transmissores químicos modificam amplamente o padrão de ingestão seletiva de macronutrientes, a noção de “centros” encefálicos que deveriam estar controlando a ingestão alimentar e o peso corporal deu lugar ao conceito de que há várias vias neuronais integradas que são responsáveis pelos sinais aferentes relacionados às mudanças da homeostasia energética corporal (WOODS *et al.*, 1998).

A percepção de saciedade constitui-se em um processo basicamente previsível provocada pela ingestão de nutrientes que causam distensão gástrica e liberação de hormônios intestinais incluindo a colecistocinina (CCK), o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), a oxintomodulina (OXM), a orexina (ORX), a grelina e o peptídeo YY (PYY), dentre outros (STRUBBE; WOODS, 2004; LÓPEZ *et al.*, 2007). Embora muitos nutrientes (por exemplo, ácidos graxos livres e glicose), citocinas (a citar, interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa) e hormônios (como os glicocorticóides e o hormônio liberador de tireotrofina –TRH-) possam modular a ingestão alimentar, somente a leptina e a insulina satisfazem todos os critérios teóricos impostos para serem considerados mecanismos transdutores de retroação negativa para a manutenção de comportamento alimentar de fome ou apetite específico (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Esses sinais de saciedade são gerados inicialmente pela interação dos alimentos com mecanorreceptores e quimorreceptores que estão distribuídos ao longo do trato gastrointestinal, sendo que, durante e após sua absorção, os nutrientes também interagem com o tecido adiposo ou órgãos associados, como o fígado e o pâncreas. Esses sinais, após processamento pelo sistema nervoso intrínseco gastrointestinal, podem ser transmitidos a

neurônios sensitivos aferentes das fibras vagais, aos neurônios das raízes dorsais da medula e dessas porções ao encéfalo. Os locais inicialmente envolvidos no processamento de informações sensoriais e que podem modular o comportamento alimentar são o núcleo do trato solitário (NTS) e a área postrema no bulbo (conforme revisado em BERTHOUD *et al.*, 2006).

Ademais, alguns dos principais neurônios envolvidos na homeostase energética e que respondem aos níveis circulantes de leptina e insulina estão localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC). Nesse núcleo, quando ocorrem níveis diminuídos de leptina em circulação sanguínea, um grupo de neurônios que co-expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao agouti (AgRP), que são orexígenos, fica estimulado; outro grupo de neurônios locais que co-expressam pró-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), ambos anoréxicos, fica inibido (BROBERGER *et al.*, 1998; ELIAS *et al.*, 1999). Esses dois grupos de neurônios do ARC projetam-se parcialmente para o núcleo paraventricular (PVN) e a LHA, desempenhando um papel crucial na integração dos sinais metabólicos e hormonais nos sistema simpático e parassimpático (COWLEY *et al.*, 1999;2001). O núcleo acumbens (NAc), que tem interações recíprocas com a LHA (STRATFORD; KELLEY, 1999) e é sede dos circuitos orexígenos que influenciam comportamentos alimentares pelas suas projeções para o núcleo medial dorsal do tálamo, substância nigra e córtex pré-frontal (GROENEWEGEN *et al.*, 1999), tem também papel relevante na percepção hedônica dos alimentos e modula a saciedade de maneira natural ou condicionada (BERRIDGE, 1991). Na LHA, no ARC e no PVN, neurônios contendo o hormônio concentrador de melanina (MCH) participam de respostas orexígenas (QU *et al.*, 1996), principalmente no início da fase escura do dia dos animais (ROSSI *et al.*, 1997, 1999; ABBOTT *et al.*, 2003). Informações viscerais e gustativas também podem influenciar o NAc por meio das conexões com o núcleo do trato solitário, com a via gustatória afetando o núcleo

parabraquial (PBN), pelos núcleos basolateral (ABL) e central da amígdala (ACe) e pela área tegmental ventral (MCDONALD; JACKSON, 1987).

Neste contexto, a amígdala é área telencefálica essencial para a compreensão da base neural de gênese e organização do comportamento alimentar. Historicamente, tem-se relacionado a amígdala com muitos aspectos da regulação do comportamento alimentar (FISHER, 1969). No final da década de 30 do século passado, Klüver e Bucy descreveram que lesões amplas no terço anterior do lobo temporal de macacos geravam agnosia visual, fazendo com que os animais levassem à boca toda sorte de objetos, mas também passando a ingerir o que antes não era parte normal de sua dieta. Em 1977, Fonberg postulou a existência de uma correlação anatômica entre as áreas lateral e medial da amígdala com núcleos do hipotálamo. Lesões eletrolíticas em diferentes núcleos da amígdala influenciavam de modo controverso o comportamento de ingestão hídrica e alimentar, aparentemente devido às múltiplas conexões existentes com distintas partes do hipotálamo (OOMURA *et al.*, 1970; SUTIN *et al.*, 1975; FONBERG, 1977; De OLMOS *et al.*, 1985; LUITEN *et al.*, 1987; ALHEID; HEIMER, 1988). Recentemente, King e colaboradores têm demonstrado que lesões bilaterais amplas que envolvem também o subnúcleo póstero-dorsal da amígdala medial (AMePD) provocam degeneração do VMH e desencadeiam comportamento hiperfágico e notável ganho de peso em ratas, o que é diferente entre os sexos (maior em fêmeas do que em ratos machos). Embora passível de discussão quanto aos resultados estatísticos, relatou-se que ratos com lesão ampla na AMePD e áreas adjacentes parecem apresentar hiperinsulinemia após ingestão calórica depois de período de restrição alimentar (KING *et al.*, 1996a) e possuem alta preferência por dietas ricas em carboidratos (KING *et al.*, 1998). Em parte, esses dados suscitaram os experimentos empregados na presente dissertação.

Nos últimos anos, na tentativa de desvendar se existem áreas encefálicas que poderiam estar relacionadas com este comportamento de preferência alimentar, muitas pesquisas têm-se

utilizado de modelos nos quais são oferecidas duas ou mais dietas com fontes distintas de macronutrientes e avaliadas as mudanças na preferência de ingestão após injeções e procedimentos farmacológicos (THIBAUT; BOOTH, 1999). É notável que, apesar das descobertas feitas sobre a regulação neural e periférica do comportamento de ingestão alimentar, ainda não há um pleno conhecimento de quais mecanismos neurofisiológicos guiam a seleção e procura de alimentos específicos em mamíferos. Mas, por exemplo, carece-se ainda de informações básicas relevantes sobre o efeito do glutamato, principal neurotransmissor excitatório de mamíferos, em áreas precisas do encéfalo e sua repercussão na fome, apetite e saciedade. Com este sentido amplo, tendo presente que é preciso ter um modelo animal para estudar variáveis da ingestão de diferentes componentes da dieta, que é importante estudar separadamente os núcleos e subnúcleos da amígdala que modulam o comportamento alimentar e que sua neuroquímica local é relevante neste propósito, a presente dissertação se propõe a apresentar um método para estudo do consumo alimentar de dieta completa ou de macronutrientes isolados para ratos e, a seguir, testar os efeitos da microinjeção de glutamato na AMePD sobre o comportamento alimentar de ratos com acesso à dieta de seleção com macronutrientes isolados. Para justificar esses procedimentos, a seguir, apresentar-se-á uma revisão da literatura pertinente ao assunto e, na forma do primeiro artigo desta dissertação, será abordado o problema e a metodologia de desenvolvimento do modelo empregado para estudo e descrição qualitativa do comportamento alimentar normal e induzido pelo jejum em ratos. Após a revisão sobre a divisão conceitual e a função dos componentes da amígdala e, mais especificamente, da AMe e de seu subnúcleo AMePD, no segundo artigo será descrito o efeito de sua manipulação experimental, após cirurgia estereotáxica para implantação de cânula e de microinjeção de glutamato, quanto aos efeitos desse neurotransmissor, comparativamente a condição e substância controle, no comportamento alimentar, glicemia e insulinemia pós-prandiais de ratos machos adultos. Este artigo apresenta

resultados inéditos desta última parte experimental e está na forma tal qual a ser submetido para publicação.

Ou seja, o primeiro objetivo do presente estudo é o de estabelecer um modelo para estudo do comportamento alimentar, glicemia e insulinemia de ratos mantidos em condição de laboratório e frente a formulações dietéticas diferentes permitindo e quantificando as escolhas dos animais estudados. O segundo objetivo da presente dissertação é estudar o efeito da microinjeção de glutamato diretamente na AMePD de ratos e testar o comportamento alimentar, glicemia e insulinemia de ratos mantidos nas mesmas condições experimentais e frente a escolhas de formulações dietéticas diferentes. Ambos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFCSPA (parecer nº 139/06). O primeiro artigo, em português, está colocado nos moldes da Revista de Nutrição / *Brazilian Journal of Nutrition* (instruções para autores: <http://www.scielo.br/revistas/rn/pinstruc.htm>) e o segundo, em inglês, para ser submetido à *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* e de acordo com suas normas para autores (<http://www.the-aps.org/publications/i4a/index.htm>).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AMÍGDALA

A amígdala, ou complexo amigdaliano¹, constitui-se de núcleos subcorticais que se situam na porção medial do lobo temporal, lateral ao hipotálamo, ventral ao estriado e estendendo-se até a parte terminal do corno inferior do ventrículo lateral no encéfalo de mamíferos (KNAPSKA, 2007).

Ao longo do tempo, diversas formas de divisão para a amígdala foram propostas. Existe, no entanto, considerável debate sobre sua subdivisão em núcleos em várias espécies animais (SWANSON; PETROVICH, 1998; NEWMAN, 2002, PITKÄNEN *et al.*, 2000; RASIA-FILHO *et al.*, 2000, 2004). Outro motivo de discussão refere-se aos limites anatômicos extremos da amígdala, os quais permanecem ainda controversos (SWANSON; PETROVICH, 1998; de OLMOS *et al.*, 1999; NEWMAN, 2002; de OLMOS *et al.*, 2004). Price e colaboradores (1987) propuseram um esquema único de classificação dos núcleos amigdalianos de ratos, gatos e macacos dividindo a amígdala desses animais em três grandes

¹ Embora a terminologia anatômica nomeie esta estrutura como “corpo amigdalóide” na parte basilar do telencéfalo, por definição encontrada em dicionário da língua portuguesa, “amigdaliano” é algo relativo ou pertencente à amígdala, enquanto “amigdalóide” é semelhante à amígdala (RASIA-FILHO; HILBIG, 2005).

porções: núcleo basolateral (ABL), do qual fariam parte os subnúcleos lateral (ABLI), basal, e basal acessório e que estariam amplamente interconectados com o neocórtex; porção cortical medial (ACOM), que corresponderia aos subnúcleos cortical, à amígdala medial (AMe, tema desta dissertação e para a qual dar-se-á maior atenção a seguir), o córtex periamigdalóide e o núcleo do trato olfatório lateral, relacionados com o sistema olfativo principal e acessório; e, por último, ACe e área amigdalóide anterior (AA), que estariam envolvidos com atividades “vegetativas” que, neste texto, serão tratadas como simpáticas e parassimpáticas (para comentário sobre o termo “vegetativo”, veja-se RASIA-FILHO, 2006).

Swanson e Petrovich (1998) sugeriram que a amígdala, que não é nem uma unidade anatômica e nem funcional, pudesse agrupar um número de núcleos que parecem ser partes diferenciadas do córtex cerebral, do claustró e do estriado, pertencendo a quatro sistemas funcionais: 1) do simpático e parassimpático, composto pela ACe; 2) cortical fronto-temporal, composto pelos núcleos ABL e ABL anterior (ABLa) e ABLI; 3) do bulbo olfatório acessório (AOB), formado pela AMe e, 4) olfatório principal, relacionado com os demais núcleos. Em outras palavras, estruturalmente, a amígdala poderia consistir de uma divisão estriatal, formada pela AA e pela AMe e a ACe, e de uma divisão cortical que corresponderia à ABLa e posterior (ABLp), aos núcleos basomedial anterior (ABMa) e posterior (ABMp), cortical pósteromedial (ACOpM) e pósterolateral (ACOpL), cortical anterior (ACOA), lateral (ACOL) e posterior (ACOP), área amigdalóide piriforme (AAP) e área piriforme de transição (SWANSON; PETROVICH, 1998; PETROVICH *et al.*, 2001).

Estudos recentes, sobre a classificação da amígdala em ratos apresentam-na dividida em três regiões (FIGURA 1), de acordo com critérios citoarquitetônicos, quimioarquitetônicos e de suas conexões, a saber: 1) amígdala basolateral, que é constituída por uma extensão ventromedial da camada mais profunda do córtex cerebral (núcleos lateral, basal e basolateral); 2) amígdala centromedial, que é uma extensão ventromedial especializada do

estriado (sendo dividida em ACe e AMe, assim como da parte amigdalóide do núcleo intersticial da estria terminal - BNST -) e, 3) amígdala com características corticais, que é subdividida em porções relacionadas com as vias olfativa e vomeronasal (KNAPSKA *et al.*, 2007). Além disso, a amígdala também possui regiões de transição, situadas entre a porção ventral do estriado e o hipocampo, núcleos intercalados e núcleos ainda não classificados (ALHEID *et al.*, 1995; de OLMOS *et al.*, 2004). Ainda neste sentido, uma das classificações mais utilizadas foi sugerida por de Olmos e colaboradores (como revisado em de OLMOS *et al.*, 2004) que considera a AMe e a ACe como pertencentes à “amígdala expandida”, pois ambos os núcleos parecem ter estruturas homólogas que avançam os limites anatômicos da amígdala.

Qualquer que seja o modelo atual de estudo da organização da amígdala indica que, de fato, ela não é homogênea em termos estruturais ou funcionais, mas sim é definida como um conjunto heterogêneo de grupos celulares que originalmente foram considerados como de uma mesma estrutura por causa de sua proximidade anatômica (SWANSON; PETROVICH, 1998). Em ratos, esses núcleos desempenham uma variedade de funções, incluindo percepções de estímulos olfativos e hormonais, a modulação de respostas emocionais, como as relacionadas a estímulos estressantes, respostas a estímulos gerados por medo e ansiedade, modulação do comportamento reprodutivo e participação na aquisição do aprendizado e da memória condicionada, dentre outras ações relevantes (KLING; BROTHERS, 1992; LeDOUX, 1992; EVERITT, 1995; KONDO; ARAI, 1995; WOOD; NEWMAN, 1995; QUIRK *et al.*, 1995; CANTERAS *et al.*, 1997; GUILLAMÓN; SEGOVIA, 1997; SWANSON; PETROVICH, 1998; DAVIS, 2000; PITKÄNEN, 2000; MARCUZZO *et al.*, 2007; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; 2008). Baseado em suas conexões intrínsecas e extrínsecas, Gallagher e Chiba (1996) sugeriram que os diversos núcleos da amígdala servem não somente para a regulação dos estados emocionais internos que motivam comportamentos,

mas podem também ser importantes para a avaliação cognitiva do impacto emocional de informações sensoriais complexas. Uma dessas regiões relevantes para tanto é a AMe.

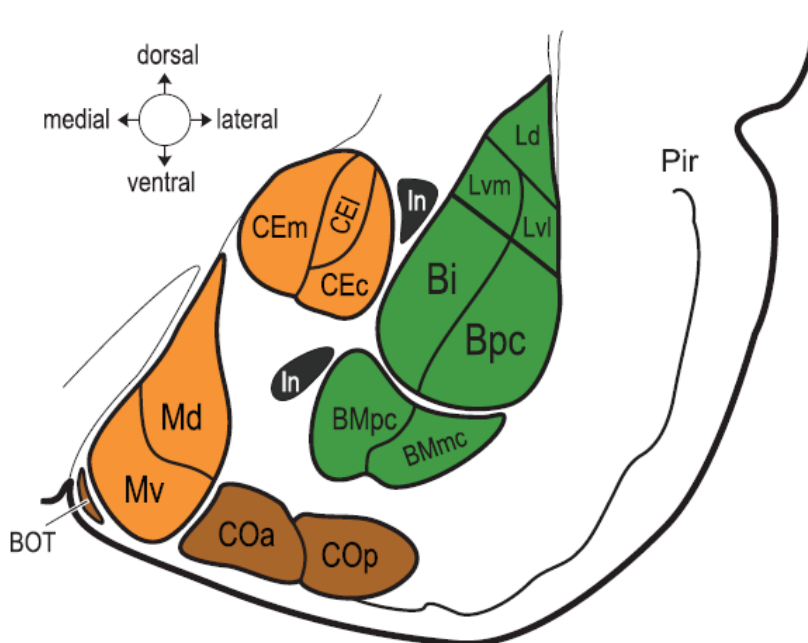


FIGURA 1. Desenho esquemático da parte ventral do encéfalo do rato, a partir de secção coronal. Divisões e subdivisões da amígdala de ratos. O complexo amigdalóide poderia ser dividido em três grupos: amígdala basolateral (verde); amígdala centromedial (laranja), e amígdala cortical (marrom). Os núcleos intercalados são indicados em cinza escuro (In). BOT, núcleo intersticial do trato olfatório; CEC, núcleo central, subdivisão capsular; CEI, núcleo central, subdivisão lateral; CEm, núcleo central, subdivisão medial; COa, núcleo cortical, subdivisão anterior; Cop, núcleo cortical, subdivisão posterior; Bi, núcleo basal, subdivisão intermediária; Bpc, núcleo basal, subdivisão parvocelular; BMmc, núcleo basomedial, subdivisão magnocelular; BMpc, núcleo basomedial, subdivisão parvocelular; Ld, núcleo lateral, subdivisão dorsal; Lvm, núcleo lateral, subdivisão ventromedial; Lvl, núcleo lateral, subdivisão ventrolateral; Md, núcleo medial, divisão dorsal; Mv, núcleo medial, divisão ventral; Pir, córtex piriforme, abreviatura conforme original. Figura adaptada de KNAPSKA *et al.* (2007).

2.1.1 Amígdala Medial

Em ratos, a AMe é uma estrutura igualmente heterogênea e é um dos núcleos superficiais do complexo amigdaliano que, ao longo de sua extensão, está em contato direto com a região lateral do trato óptico (TO) e ventral à estria terminal (ST) em sua parte mais posterior. A AMe encontra-se em posição medial e posterior ao núcleo do trato olfatório e,

como limite posterior, localiza-se aproximadamente onde surgem os ventrículos cerebrais no lobo temporal (de OLMOS *et al.*, 2004). Dorsalmente a AMe é separada da porção medial da ACe por uma região pobre em células, a qual é substituída mais ventralmente e caudalmente pelo BNST (ALHEID *et al.*, 1995). Caudalmente, o grupo de núcleos intercalados (In) da amígdala separa a AMe da ABL. Também caudalmente, e em posição dorsal, grupos de fibras que trafegam pela ST apresentam-se interpostas entre a AMe e outros núcleos adjacentes da amígdala (ALHEID *et al.*, 1995; PETROVICH *et al.*, 2000; PITKÄNEN, 2000; de OLMOS *et al.*, 2004).

Conforme Pitkänen (2000), a AMe poderia ser dividida em três regiões: rostral, central (porção dorsal e ventral) e caudal. Alheid *et al.* (1995), Canteras *et al.* (1995) e de Olmos *et al.* (2004) dividem-na nos subnúcleos ântero-dorsal (AMeAD), ântero-ventral (AMeAV), AMePD e pósterio-ventral (AMePV; FIGURA 2). E, em função de suas conexões, ela pode ser organizada em uma região rostral ou anterior, da qual fazem parte a AMeAD, a AMeAV e a AMePV, e uma região caudal ou posterior, constituída pela AMePD (CANTERAS *et al.*, 1995). Resultados mais recentes e achados hodológicos funcionais não permitem considerar a AMeAD e a AMePV como se fossem componentes de uma única região “ventral” (DALL’ÓGLIO *et al.*, 2008). Com isso e outros dados imunocitoquímicos, Wood e Newman (1995) propuseram que a região anterior da AMe estaria principalmente sendo influenciada por informações olfativas e a região posterior, pelos hormônios gonadais. Essa divisão anátomo-funcional não é absolutamente restritiva, porque há receptores para esteróides sexuais e conexões sinápticas recíprocas em todas as regiões da AMe (LEHMAN *et al.*, 1982; ÖSTERLUND *et al.*, 1998; NEWMAN, 2002; SIMERLY, 2004). Não obstante, as regiões anterior e posterior da AMe devem ser estudadas separadamente a fim de que particularidades tanto morfológicas quanto funcionais dos subnúcleos nessas duas porções possam ser melhor detectadas. Isto é, ao contrário de identificar propriedades únicas para uma mesma estrutura

heterogênea como é a AMe, com esse maior detalhamento é possível que diferenças sutis entre seus subnúcleos possam ser encontradas (LEHMAN *et al.*, 1982; NEWMAN, 2002; MAREN, 1996; ÖSTERLUND *et al.*, 1998; RASIA-FILHO *et al.*, 1999, 2002, 2004; SIMERLY, 2004; DALL'OGGIO *et al.*, 2008).

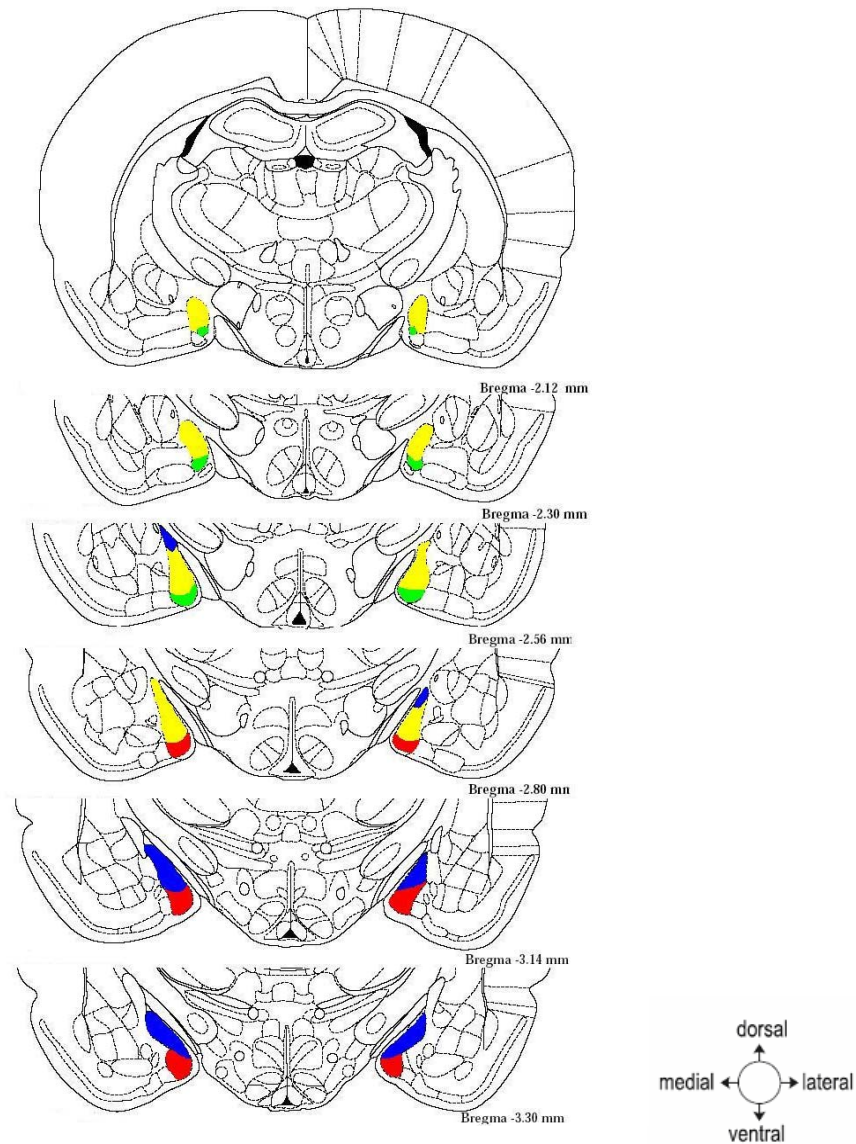


FIGURA 2. Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatro subnúcleos da amígdala medial, a saber: ântero-dorsal (AMeAD, em amarelo), ântero-ventral (AMeAV, em verde), póstero-dorsal (AMePD, em azul) e póstero-ventral (AMePV, em vermelho). Os valores em mm colocados no lado direito das imagens referem-se às distâncias posteriores ao bregma. As coordenadas espaciais referem-se ao hemisfério direito e são dorsal (D), ventral (V), medial (M) e lateral (L). Figuras adaptadas do atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998) e reproduzida com a autorização de Quagliotto (2006).

A AMePD, situada de forma adjacente ao TO e ventral à ST na parte do telencéfalo ventral (FIGURA 3), em cortes histológicos coronais corados pela técnica de Nissl aparece com a forma de um triângulo alongado, com uma base ventral que se estende no terço caudal da AMe (ALHEID *et al.*, 1995; de OLMOS *et al.*, 2004). A AMePD apresenta, como característica citoarquitetônica, uma região de células densamente agrupadas medialmente, as quais se estendem superficialmente e profundamente, que estão separadas por uma região intermediária de células esparsas, e relativamente distantes de uma terceira coluna de células orientadas paralelamente e mais lateralmente, estas já no limite provável deste subnúcleo (ALHEID *et al.*, 1995; de OLMOS *et al.*, 2004; FIGURA 3).

A parte celular da AMePD tem no contorno medial uma “camada molecular” constituída de poucas células e que se estreita dorsalmente e rostralmente até desaparecer por completo na AMeAD (de OLMOS *et al.*, 2004; WINANS; SCALIA, 1970). Esta dita “camada molecular” corresponde na verdade ao feixe de axônios que forma a via eferente do núcleo próprio da via olfatória acessória (de OLMOS *et al.*, 2004) e que, de forma equivocada, foi incluída como constituinte da AMePD em estudo recente (GUIRADO *et al.*, 2008).

A maioria das aferências neuronais que chegam aos subnúcleos da AMe são provenientes diretamente do AOB, que envolve estímulos de ferômonios que atuam no órgão vomeronasal (OTTERSEN *et al.*, 1980; PITKÄNEN, 2000; WESTBERRY, 2003). Basicamente, as demais aferências são provenientes do córtex cerebral pré-frontal, do BST e de vários núcleos do hipotálamo, algumas claramente recíprocas, envolvidas com a modulação da atividade neuroendócrina e da emissão de vários comportamentos sociais (McDONALD, 1998; PETROVICH *et al.*, 2001; DONG *et al.*, 2001). Há, também, aferências mais modestas de regiões do telencéfalo basal, e de núcleos do tálamo, da região dorsal da ponte relacionada com informações somáticas e viscerais, de grupos celulares da rafe

mesencefálica e do locus ceruleus (JONES *et al.*, 1977, 1999; AZMITIA *et al.*, 1978; OTTERSEN *et al.*, 1979, 1980, 1981; GROOVE, 1988; OHTAKE; YAMANDA, 1989; HERBERT *et al.*, 1990; McDONALD, 1998; PITKÄNEN, 2000; KNAPSKA *et al.*, 2007; FIGURA 3).

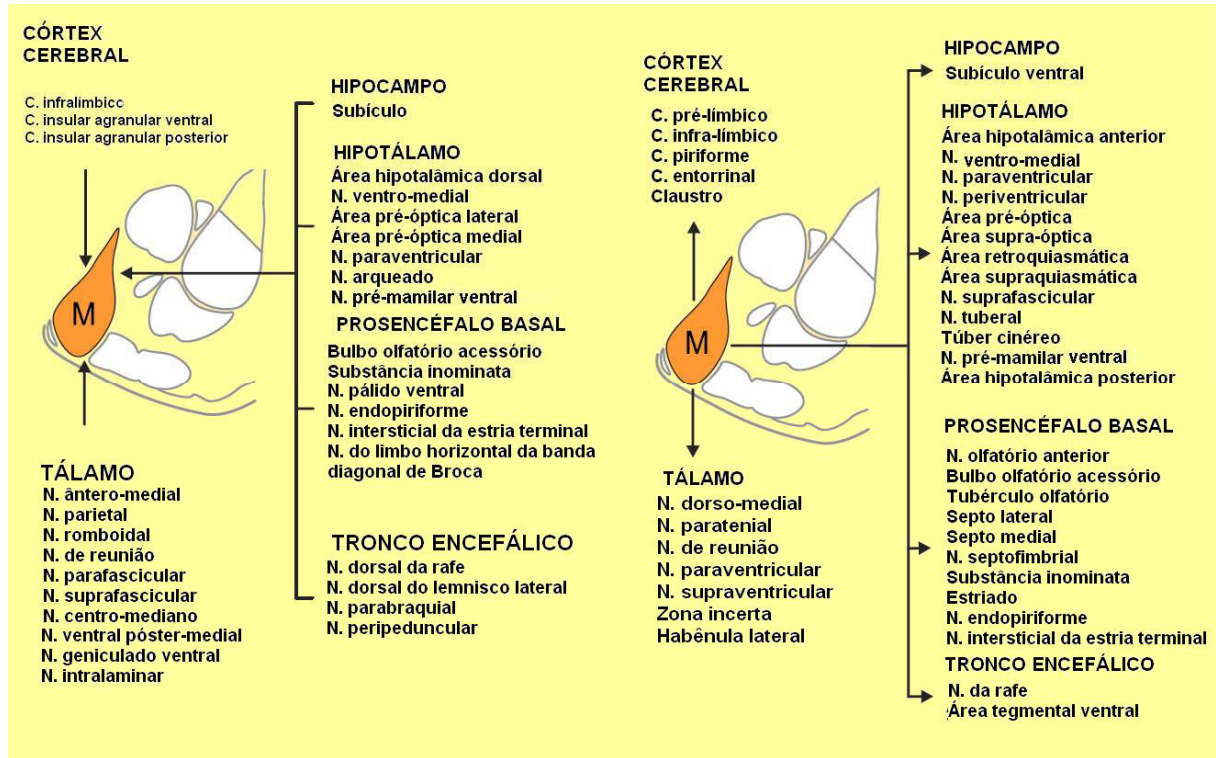


FIGURA 3. Conexões aferentes (à esquerda) e eferentes (à direita) demonstradas de forma geral para os componentes do núcleo medial da amígdala de ratos. Figura modificada de KNAPSKA, 2007.

Grande parte dos axônios de projeção deixa a AMe via ST ou pela alça peduncular (via amígdalo-fugal) indo, a seguir, em direção a regiões telencefálicas ou diencefálicas. A AMeAD pode utilizar a alça peduncular, enquanto a AMePV e a AMePD valem-se da ST como via eferente preferencial (SWANSON *et al.*, 1979; de OLMOS *et al.*, 2004; SIMERLY, 2004). Para suas funções, os quatro subnúcleos da AMe apresentam evidentes conexões entre si, relacionam-se com outros núcleos intra-amigdalianos, como a AA, a ACe, o ABL, os

núcleos corticais, a AL, o núcleo posterior (zona de transição amígdala-hipocampal), a AAP e o trato olfatório acessório, e com uma grande quantidade de estruturas encefálicas como o AOB, núcleo olfatório anterior, córtex pré-frontal, córtex piriforme, núcleo endopiriforme, a faixa diagonal de Broca, o estriado e o claustro, o NAc, a área septal, área entorrinal e o subículo, a substância inominata, o BST e seus componentes, vários núcleos hipotalâmicos [pré-óptico, anterior, VMH, dorsomedial (DMH), LHA, ARC, periventricular, posterior e pré-mamilar ventral], vários núcleos talâmicos, a área tegmental ventral e os núcleos da rafe (CANTERAS *et al.*, 1995; McDONALD, 1998; PETROVICH *et al.*, 2001; DONG *et al.*, 2001; CAVALCANTE *et al.*, 2006, FIGURA 3). Com relevância à presente dissertação, há conexões ou aferentes ou eferentes com os núcleos hipotalâmicos previamente relacionados com o comportamento alimentar, a saber o VMH, o ARC e a LHA, além do NAc, associado funcionalmente e importante para a plena expressão de tal atividade (BERTHOUD, 2002).

Ademais, a AMe tem sido descrita como uma região moduladora da memória e do aprendizado onde o componente emocional esteja envolvido (ALLEN; ALLEN, 1974; AGGLETON; BLINT, 1989; SHINDOU *et al.*, 1993; CANTERAS *et al.*, 1995; WATANABE *et al.*, 1995; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 1996; RASIA-FILHO *et al.*, 2000). Isso foi observado em testes de esquiva inibitória (ROOZENDAAL; MCGAUGH, 1996), nas respostas neuroendócrinas a um evento estressor (MCGAUGH, 1992; LU *et al.*, 1995; DAYAS *et al.*, 1999) e em uma série de testes de comportamentos sociais, tais como o agressivo (SLODDART-APTER; MAC DONNELL, 1980; VOCHTELOO; KOOLHAAS, 1987; SIEGEL; BRUTS 1990; HINES *et al.*, 1992; DIELENBERG *et al.*, 2001), defensivo (SHAIKH *et al.*, 1993; BOLHUIS, 1984), sexual (RASIA-FILHO *et al.*, 1991; KONDO, 1992; WONG *et al.*, 1993; MEISEL; SACHS, 1994; KONDO; ARAI, 1995; NEWMAN, 1999; DOMINGUEZ; HULL, 2001) e maternal (NUMAN *et al.*, 1993; MORGAN *et al.*, 1999; SHEEHAN *et al.*, 2000). Isso pode ser importante porque se considera que o controle

da ingestão alimentar depende da habilidade dos animais em codificar e representar na memória uma variedade de informações sobre suas experiências com o que foi comido (TRACY *et al.*, 2001).

Para o que tange esta dissertação, dentre as atividades amplas da AMe e outros núcleos associados, a amígdala foi relacionada com muitos aspectos da regulação do comportamento alimentar (FISHER, 1969) como, por exemplo, com a existência de uma ligação morfológica entre as áreas lateral e medial da amígdala com o hipotálamo, de forma geral (FONBERG, 1977). Lesões eletrolíticas em núcleos da amígdala influenciaram o comportamento de ingestão hídrica e alimentar, embora com resultados controversos (OOMURA *et al.*, 1970; SUTIN *et al.*, 1975; FONBERG, 1977; De OLMOS *et al.*, 1985; LUITEN *et al.*, 1987; ALHEID; HEIMER, 1988). Por causa de sua hodologia e função descrita até o momento, esta dissertação buscou esclarecer se a AMePD participa do controle neural do comportamento alimentar valendo-se de glutamato, principal neurotransmissor excitatório no SN de mamíferos, para tanto, como será descrito a seguir. A AMePD, além de ter conexão sináptica com a AL, a ABL e a ACe, estabelece conexões sinápticas recíprocas com o córtex entorrinal, o qual envia conexões para os componentes do sistema olfatório, inclusive a ABL (CANTERAS *et al.*, 1995; SMITH *et al.*, 1997; VINADER-CAEROLS *et al.*, 1998; PETROVICH *et al.*, 2001). Isso poderia colocar a AMePD em condição direta para modular o circuito que emite projeções entre o hipocampo, outros núcleos amigdalianos e a formação de memória declarativa de longa-duração, inclusive no que diz respeito a transmissão de informação social e ambiental que pode afetar a preferência alimentar (CANTERAS *et al.*, 1995; STETTER *et al.*, 1995).

Ainda, a AMePD é influenciada por informações vomeronasais provenientes do AOB que chega, primeiramente, na AMeAD (BRESSLER, 1996; GUILLAMÓN; SEGOVIA, 1997; McDONALD, 1998; MEREDITH; WESTBERRY, 2004). A AMePD, por sua vez,

reconhece a relevância social do estímulo olfativo e, via núcleos intercalados da amígdala, determina se a AMePD será estimulada ou não (MEREDITH; WESTBERRY, 2004). Essa aferência à AMePD envolve um componente direto excitatório e interneurônios locais inibitórios (BIAN *et al.*, 2008), que, a seguir, ativam vias de projeção a núcleos hipotalâmicos igualmente ou excitatórias ou inibitórias (CARRER *et al.*, 1978; POLSTON *et al.*, 2004; BIAN *et al.*, 2008). Fatores sociais e estímulos sensoriais influenciam a preferência alimentar como a exposição ao odor o que, experimentalmente, pode se refletir em uma situação em que o animal prefere uma dieta com algum odor familiar em relação a uma dieta completamente nova (STETTER *et al.*, 1995). Como resultante, a AMePD, processa informações olfatórias e essas são enviadas para áreas motoras e neuroendócrinas envolvendo diferentes núcleos do hipotálamo e, a seguir, também para o tronco encefálico (LEHMAN *et al.*, 1982; CANTERAS *et al.*, 1995; KONDO *et al.*, 1995; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2001; PETROVICH *et al.*, 2001).

2.2 GLUTAMATO

Claro está que todas as interações entre as áreas do SNC, mecanismos de regulação e controle neural do comportamento alimentar envolvem sinapses e seus neurotransmissores. O glutamato, por ser o principal neurotransmissor excitatório do encéfalo de mamíferos (OZAWA *et al.*, 1998; TANAKA *et al.*, 2000; TAPIERO *et al.*, 2002), tem sido investigado quanto ao envolvimento na modulação do comportamento alimentar.

O glutamato é sintetizado nos terminais pré-sinápticos principalmente a partir da glutamina e pela ação da glutaminase e é estocado em vesículas onde sua concentração pode chegar a 100 mM (MELDRUM, 2000; FIGURA 4). Os receptores para o glutamato são classificados em ionotrópicos (iGluRs), estruturalmente contendo um canal iônico, e

metabotrópicos (mGluRs). Os mGluRs, por sua vez, são receptores acoplados a proteínas ligantes de guanosina trifosfato por proteína G e, baseado na seqüência de aminoácidos que apresentam, podem ser agrupados em três grupos distintos: Grupo I, do qual fazem parte os subtipos mGluR1 e mGluR5; Grupo II, que inclui os subtipos mGluR2 e mGluR3; e Grupo III, que compreende os subtipos mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 (OZAWA *et al.*, 1998; MATSUMURA *et al.*, 1999). Esta subdivisão também leva em consideração características farmacológicas e os mecanismos de transdução dos diferentes subtipos de mGluRs. Os mGluRs do Grupo I estimulam a fosfolipase C e a hidrólise de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, enquanto os mGluRs dos Grupos II e III inibem a adenilato ciclase e, conseqüentemente, a síntese de adenosina monofosfato cíclica (OZAWA *et al.*, 1998; MATSUMURA *et al.*, 1999; TAPIERO *et al.*, 2002).

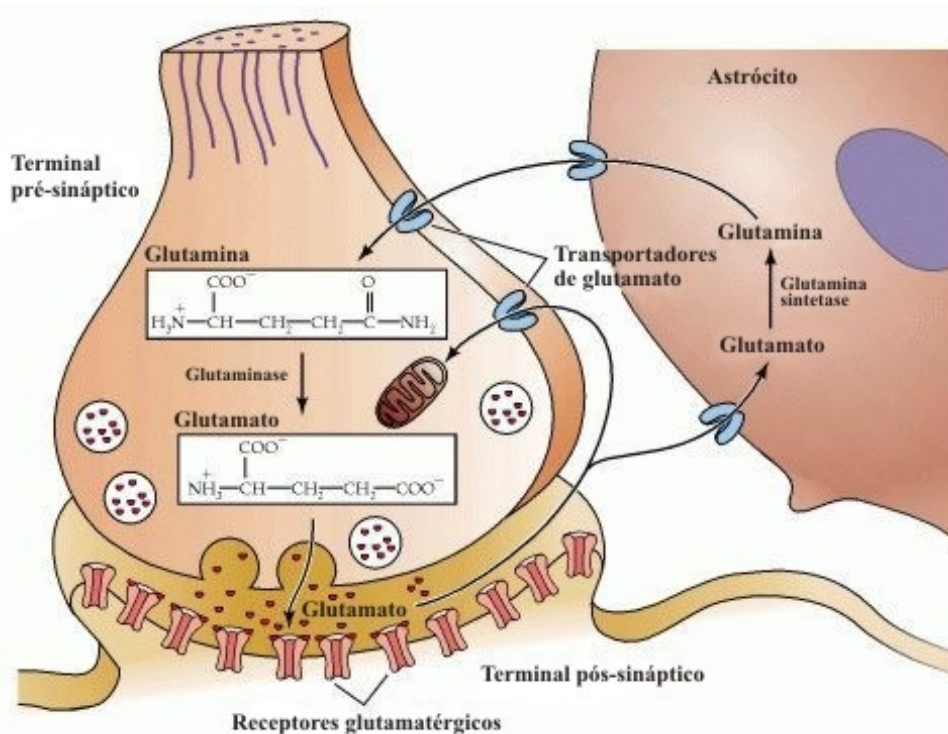


FIGURA 4. Síntese de glutamato, atuação a partir da fenda sináptica e interação entre neurônios e glia. Figura adaptada de PURVES *et al.*, 2001.

Stratford e colaboradores (1998) demonstraram que o bloqueio dos agonistas dos receptores ionotrópicos de glutamato, mormente o *a*-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e o cainato, quando na parte externa do NAc aumentam a ingestão alimentar em ratos. Além disso, a injeção de AMPA nessa estrutura é capaz de suprimir o consumo alimentar mesmo em animais submetidos a períodos de privação alimentar anterior. Microinjeções de glutamato, cainato, AMPA ou N-metil-D-aspartato (NMDA) na LHA também provocam uma intensa resposta de aumento do comportamento alimentar em ratos mesmo que saciados (STANLEY *et al.*, 1993; DUVA *et al.*, 2002). No que tange a regulação do comportamento alimentar, glutamato e NPY poderiam atuar gerando o mesmo resultado, ma vez que o estímulo à ingestão alimentar provocado pela injeção de NPY diretamente no hipotálamo (na LHA e no PFH) é dependente da ativação de receptores NMDA (LEE; STANLEY, 2005). É possível que o glutamato na LHA esteja envolvido no controle fisiológico do comportamento alimentar pois estudos de microdiálise *in vivo* demonstram um aumento na liberação de glutamato na LHA tuberal no início da alimentação (RADA *et al.*, 1997; 2003). Em contraste, a síntese de glutamato na parte externa do NAc mostra-se diminuída quando associada à ingestão de alimentos (RADA *et al.*, 1997), demonstrando que o tipo de resposta observada na LHA não é comum para todo o encéfalo (THONGKHAO-ON *et al.*, 2008).

O glutamato e o GABA provêm a principal transmissão sináptica nos diversos núcleos da amígdala (DAVIS *et al.*, 1994; MAREN, 1996; SMITH; DUDEK, 1996; SINGEWALD, 2000; OBERTO *et al.*, 2001). Neurônios glutamatérgicos estão densamente representados na AMePD, bem como transportadores de glutamato do tipo EAAC1 (SIMMONS; YAHR, 2003). Os receptores glutamatérgicos presentes na AMePD são principalmente do tipo AMPA e NMDA (WATANABE *et al.*, 1993), estes receptores são ativados na atividade copulatória de ratos, principalmente na ejaculação (SIMMONS; YAHR,

2003). Contudo, ainda são escassos os estudos que demonstram qual a participação da atividade glutamatérgica da AMe sobre o controle do comportamento alimentar até o momento. Na AMePD pode-se encontrar vários neurotransmissores e neuromoduladores como glutamato, GABA, histamina (HA), CCK, encefalinas, somatostatina, substância P e angiotensina II, por exemplo (KAKINOKI, 1998; FLODD, 1998; HERBERT *et al.*, 1990; JONES *et al.*, 1999; MATSUMURA *et al.*, 1999; AVERILL *et al.*, 2000; YILMAZER *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2005). Embora o glutamato não seja o único transmissor químico, recentemente descreveu-se que ele está presente nas aferências relacionadas com vias diretas ou indiretas do bulbo olfativo acessório e que gera respostas eletrofisiológicas excitatórias evidentes nos neurônios da AMePD (BIAN *et al.*, 2008). A consequência funcional do aumento de potenciais de ação dos neurônios da AMePD em relação a seus locais de inervação no hipotálamo é, contudo, tanto excitatória como inibitória (BIAN *et al.*, 2008; CARRER *et al.*, 1978; POLSTON *et al.*, 2004). Isso parece ser dependente da via utilizada, ou seja, resposta inibitórias ocorrem em maior proporção na inervação do núcleo principal do BST (CANTERAS *et al.*, 1995), tanto excitatórias quanto inibitórias na área pré-óptica medial hipotalâmica e mais excitatórias do que inibitórias no VMH (PETROVICH, 2001). Como ainda não está claro o que o glutamato pode fazer quando microinjetado na AMePD sobre o comportamento alimentar e a escolha de macronutrientes na dieta de ratos, a presente dissertação teve por objetivo gerar os primeiros conhecimentos neste tema.

2.3 COMPORTAMENTO ALIMENTAR

A gênese do comportamento alimentar é decorrente de uma complexa organização neuroglial, que envolve várias áreas do sistema nervoso, com aferências sensoriais e eferências para fazer surgir tal comportamento ou para modulá-lo em todo seu espectro,

incluindo o desenvolvimento da saciedade alimentar (BERTHOUD, 2004). O tipo de alimento procurado e, quando há sucesso, ingerido, pode ser diferente entre as espécies, estando a ingestão alimentar modulada pela disponibilidade de alimentos no ambiente e pela interação entre substâncias hormonais liberadas por tecidos periféricos e transmissores químicos presentes em diferentes áreas do SNC (THIBAUT; BOOTH, 1999). Com a intenção de avançar esses conhecimentos, vários estudos têm sido conduzidos em ratos e camundongos utilizando-se de lesões eletrolíticas ou por neurotoxinas (KING *et al.*, 1998; BUGARITH *et al.*, 2005), microinjeções de transmissores químicos ou de agentes farmacológicos (SHIMBARA *et al.*, 2004; TEMPEL *et al.*, 1988) ou estudos de expressão gênica de neuropeptídeos após o comportamento alimentar de animais mantidos em condições de laboratório (PRIMEAUX *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 1999).

Por exemplo, apesar de muitos mecanismos de regulação central da ingestão alimentar permanecerem desconhecidos, o envolvimento de algumas regiões é notável, como é o caso dos núcleos hipotalâmicos ARC, PVN, VMH, DMH e a LHA (LÓPEZ *et al.*, 2007) ou, adicionalmente, a AMe (ROLLINS; KING, 2000). Entre os núcleos hipotalâmicos, o ARC apresenta grande importância, principalmente por apresentar receptores para a leptina e para a insulina e expressar os neuropeptídeos orexigênicos AgRP e NPY, assim como os neuropeptídeos anorexigênicos α -MSH e CART (BROBERGER *et al.*, 1998; ELIAS *et al.*, 1998). Axônios contendo esses neuropeptídeos projetam-se tanto para neurônios do PVN que expressam o TRH, o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a ocitocina (OX), como para a LHA, onde se expressa o MCH (SCHWARTZ, 2000). Consistente com essa idéia, evidências sugerem que a leptina produza sua ação, em parte, regulando a liberação de NPY pelo ARC, enquanto a administração crônica de NPY por via intracerebroventricular (icv) simula o fenótipo da deficiência de leptina e produz hiperfagia, obesidade e inibição na produção de hormônio do crescimento (STANLEY *et al.*, 1986).

Adicionalmente, os mecanismos centrais envolvidos na seleção ou preferência por macronutrientes específicos não estão claros, mas se sabe que vários neuropeptídeos e inibidores metabólicos podem influenciar o comportamento de escolha do alimento a ser ingerido, quando administrados diretamente no encéfalo ou periféricamente. Isso ocorre com o NPY, a 2-deoxi-D-glicose (2-DG) e o β -mercaptoacetato que podem promover um aumento preferencial na ingestão de uma dieta com alto teor de carboidratos quando administrados intraperitonealmente (KANAREK, *et al.*, 1983; LEIBOWITZ *et al.*, 1992; SINGER *et al.*, 1998). Já fármacos agonistas dos receptores μ para opióides estão relacionados com elevação no consumo preferencial de uma dieta com alto teor de proteína quando injetados periféricamente em ratos com lesão no PVN (SHOR-POSNER *et al.*, 1986). Porém, este mesmo estudo descreve que ratos submetidos a períodos de privação alimentar e subsequente livre acesso a dieta por um período determinado de 6h, consomem preferentemente ração com alto teor de lipídeo, sem alterar significativamente o valor calórico total ingerido. Esses dados corroboram os resultados apresentados por Ookuma e colaboradores (1997) que descrevem um aumento no consumo de dieta com alto teor de lipídeo quando comparado com outra de baixo teor de lipídeo, mas rica em carboidrato, em ratos injetados por via icv com agonistas dos receptores μ para opióides. Já a enteroestatina, peptídeo que induz a saciedade em ratos, inibe o consumo de dieta rica em lipídeo, mas não uma dieta com grande quantidade de carboidratos, mesmo em ratos submetidos à privação alimentar durante o ciclo escuro (OKADA *et al.*, 1992; OOKUMA *et al.*, 1997).

Por sua vez, o lobo temporal tem sido relacionado com o controle da ingestão de alimentos desde 1888, quando Brown e Schafer demonstraram que o procedimento de lobotomia temporal em macacos resultava em ingestão alimentar praticamente insaciável. Estudos posteriores, como os de Klüver e Bucy (1939), confirmaram a ocorrência de comportamentos de hiperfagia e obesidade em macacos e seres humanos com danos no lobo

temporal bilateral ou após lobotomia temporal (revisados em PRIBRAM *et al.*, 1953; TERZIAN; ORE, 1955; MARLOWE *et al.*, 1975). Mais especificamente, tais resultados comportamentais foram igualmente observados em macacos com ressecção bilateral do complexo amigdaliano e do córtex temporal adjacente (SCHWARTZBAUM, 1961). A amígdala, estudada de um modo geral, também parece ser responsiva à ação de β -mercaptopoacetato (RITTER; HUTTON, 1995), NPY (KOKARE *et al.*, 2005), 2-DG (TORDOFF *et al.*, 1982), galanina (CORWIN *et al.*, 1993) e opióides (GLASS *et al.*, 2000), embasando ainda mais sua participação no controle do comportamento alimentar. Um dos exemplos é o achado de que a enteroestatina quando injetada na ACe, além de induzir a ativação do gene *c-fos* em neurônios que expressam α -MSH no ARC e de diminuir a expressão de AgRP na LHA e ACe, reduz seletivamente a ingestão de dieta a base de lipídeo, por ações que parecem envolver componentes serotoninérgicos no PVN (LIN; YORK, 1997).

Próxima ao córtex gustativo primário e à LHA, alguns núcleos da amígdala recebem aferências gustativas diretamente do NTS e do PBN (BERTHOUD, 2002; 2004; FIGURA 5). Associadamente com o BNST, a AMePD parece ser o sítio com resultados mais notáveis na modulação do comportamento alimentar, onde lesões eletrolíticas estão relacionadas com hiperfagia e obesidade em ratas (ROLLINS; KING, 2000). Lesões eletrolíticas nas áreas ABL, ACe ou ACOM não resultam em aumentos substanciais de ingestão alimentar ou ganho de peso como os alcançados quando estão lesadas amplamente a “região póstero-dorsal da amígdala”, estudada como um todo e sem especificação de um único núcleo (ROLLINS; KING, 2000). Por exemplo, ratas podem ter aumentos de 50-80g de peso corporal ao longo dos primeiros 20 dias pós-lesão dessa ampla “região póstero-dorsal” amigdaliana (KING *et al.*, 1996b). Este ganho de peso é nitidamente mais expressivo em fêmeas do que em machos (KING *et al.*, 1999). Além de desencadear hiperfagia e moderada obesidade em ratas (KING *et al.*, 1993a; KING *et al.*, 1993b; KING *et al.*, 1994; KING *et al.*, 1996a; KING *et*

al., 1996b; KING *et al.*, 1996c), lesões que englobam também a AMePD resultam, muitas vezes, em degenerações do VMH (KING *et al.*, 1997). Não obstante, as lesões que englobam o AMePD diferem notadamente das ocorridas no VMH em certos aspectos específicos, como a forte preferência por dietas com alto teor de carboidratos (KING *et al.*, 1998), o que sugere que diferentes mecanismos neurais em série ou em paralelo entre a parte posterior da AMe, o BNST e o VMH estão sendo envolvidos para a modulação do comportamento alimentar.

Embora não haja muitos estudos descrevendo em quais áreas do SNC possa-se determinar a escolha de macronutrientes da dieta a serem ingeridos, há os que demonstraram que ratos com lesões na região do VMH preferem dietas com alto teor de lipídeos (ANDIK *et al.*, 1957; CORBIT, *et al.*, 1964; CARLISLE; STELLAR, 1969; KRAMER; GOLD, 1980; KANAREK, *et al.*, 1981) enquanto animais com lesões amplas na região onde está a AMePD demonstram preferência por dietas ricas em carboidratos (KING *et al.*, 1997; KING *et al.*, 1998). Dois grandes problemas metodológicos desses estudos são que não se controlaram as variações hormonais nas ratas adultas, as quais foram estudadas indiscriminadamente ao longo das diferentes fases do ciclo estral; e, que lesões eletrolíticas destroem tanto axônios locais quanto axônios de passagem no local afetado (nesses casos englobando amplamente a AMePD, a ST, o BNST e os territórios adjacentes a si).

De forma complementar neste raciocínio, sugere-se que a insulina possa ter um papel na escolha do macronutriente a ser ingerido na dieta. Chavez e colaboradores (1996) mostraram que a microinjeção de insulina no terceiro ventrículo de ratos, que tinham oferta de três tipos de dieta e cada uma com um macronutriente específico (carboidrato, proteína e lipídeo), resultou em redução seletiva somente na ingestão de lipídeos. Embora ratos com lesões na AMePD pareçam apresentar hiperinsulinemia durante o período inicial de ingestão alimentar após período de restrição alimentar, quando comparados a grupo controle, a análise estatística dos dados não ratifica este tipo de conclusão (KING *et al.*, 1996a).

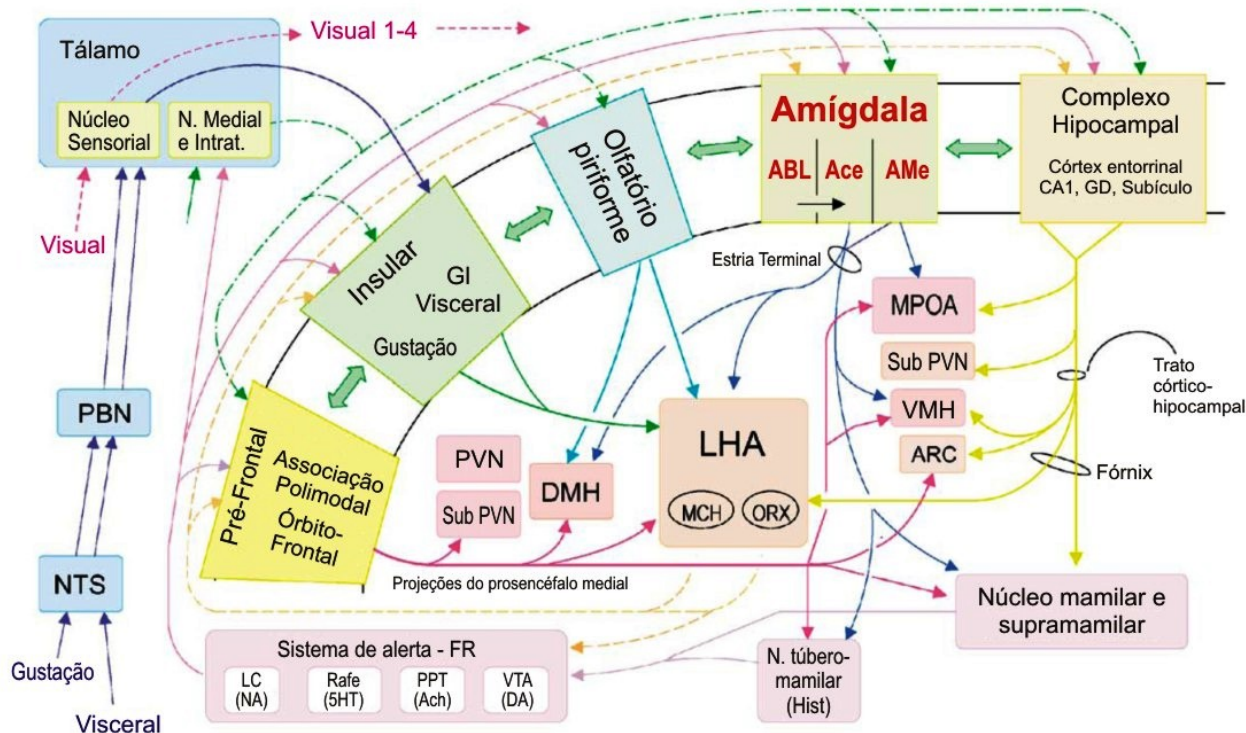


FIGURA 5. Conexões neurais entre áreas encefálicas relevantes para a gênese e regulação do comportamento alimentar em ratos. ABL, ACE e AME, núcleos basolateral, central, e medial da amígdala; Ach, acetilcolina; ARC, núcleo arqueado; DA, dopamina; GD, giro denteado do hipocampo; DMH, hipotálamo dorsomedial; Hist, histamina; 5-HT, serotonina; LC, locus ceruleus; LHA, área hipotalâmica lateral; MCH, hormônio concentrador de melanina; NTS, núcleo do trato solitário; MPOA, área préoptica medial; NA, noradrenalina; PVN, núcleo paraventricular; PBN, núcleo parabraquial; PPT, pedunculopontine tegmental area; RF, formação reticular; SubPVN, núcleo sub-paraventricular do hipotálamo; N., núcleo; ORX, orexina; VMH, núcleo ventromedial; VTA, área tegmental ventral. Figura adaptada de BERTHOUD, 2002.

As dietas mais utilizadas em experimentos de ingestão alimentar são basicamente de dois modelos: as de formulações isoladas contendo carboidrato, proteína e lipídeo acrescidos de vitaminas e minerais ou a formulação contendo concomitantemente os três macronutrientes, vitaminas e minerais, variando sua classificação como hiperglicídica, hiperprotéica ou hiperlipídica, de acordo com o macronutriente empregado em maior quantidade (KANAREK, 1985). Por sua vez, os estudos empregando o método de formulações isoladas fundamentam-se na preferência alimentar que ratos normalmente apresentam ao escolher uma dieta adequada para crescimento e manutenção de seu peso

corporal mesmo quando expostos à possibilidade de seleção de quinze fontes alimentares diferentes, ainda que essas variem amplamente em qualidade nutricional (KRATZ; LEVITSKY, 1979; RICHTER, 1943; KON, 1931; GERARDO *et al.*, 1991). Em estudos com ratos, a utilização do modelo de oferta de formulações isoladas contendo cada um dos três macronutrientes (glicídios, proteínas e lipídeos) e acrescidos de vitaminas e minerais, colocados em potes separados, constitui o modelo de “seleção de macronutrientes”, assim chamado pelo fato de o próprio animal escolher a composição da sua dieta e determinar o que e quanto vai comer ao longo do tempo (MILLER *et al.*, 1994). O modelo de seleção de macronutrientes tem sido empregado em diferentes estudos neurofisiológicos, como nos testes de consumo após privação alimentar (WELCH *et al.*, 1994; TEMPEL *et al.*, 1989). O período de jejum é capaz de gerar, quando o animal passa a ter acesso à comida, seleção e consumo de uma dieta que reflete suas necessidades nutricionais e procura gerar um aporte calórico que supra suas necessidades diárias *a priori* (RICHTER, 1943; RICHTER; SCHMIDT, 1941; 1945).

Não obstante, muitas dificuldades são encontradas na literatura para se estabelecer um padrão de consumo alimentar básico entre ratos estudados em diferentes laboratórios e que estejam recebendo o método de formulações isoladas de nutrientes, e isso sendo devido principalmente às diferenças nas quantidades e tipos de macronutrientes utilizados e a falta de descrição detalhada da metodologia para a preparação das dietas. Outros fatores intervenientes no padrão de consumo, como o sexo (KING, 2006) e a idade dos animais (SCOTT; QUINT, 1946; TRIBE, 1955), têm contribuído da mesma forma para dificultar a avaliação dos resultados obtidos, para estabelecer padronizações sobre o consumo alimentar e comparações quanto à seleção de nutrientes feita pelos animais estudados em diferentes condições experimentais. Uma não uniformidade metodológica pode obscurecer resultados relevantes e mesmo impedir comparações ou que se chegue a conclusões para avançar o

conhecimento em área relevante que é esta a da neurofisiologia do comportamento alimentar. O mesmo comentário geral vale para lesões amplas que afetam várias áreas encefálicas ao mesmo tempo e, inespecificamente, podem estar destruindo neurônios locais e vias de aferência/ eferência dessas e para outras regiões, como é o caso de lesões amplas relatadas por King e colaboradores.

A seguir serão apresentados, na forma de dois artigos: a descrição do modelo desenvolvido como contribuição para o estudo do comportamento alimentar de ratos mantidos em ambiente experimental laboratorial; e os dados obtidos após microinjeção de glutamato na AMePD sobre o comportamento alimentar, glicemia e insulinemia pós-prandiais de ratos estudados neste modelo animal empregado. Os presentes resultados são ainda inéditos e buscam gerar e avançar conhecimentos sobre o papel da AMePD nos parâmetros estudados, comparando-os com os dados publicados com lesões amplas conjuntas da AMePD e áreas vizinhas (KING *et al.*, 1993a; KING *et al.*, 1993b; KING *et al.*, 1996a; KING *et al.*, 1996b; KING *et al.*, 1996c; KING *et al.*, 1998; KING *et al.*, 1999; KING *et al.*, 2003a; KING *et al.*, 2003b).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Busca-se avançar os conhecimentos a respeito da participação de uma área específica do SNC, a AMePD, e a contribuição do neurotransmissor excitatório glutamato na modulação do comportamento alimentar de ratos machos.

3.2 Específicos

- Estabelecer um modelo para estudo do comportamento alimentar, da glicemia e da insulinemia (neste caso, pós-prandiais) de ratos mantidos em condição de laboratório e frente a formulações dietéticas diferentes (dieta completa e dieta de seleção de macronutrientes isolados) quantificando as escolhas dos animais estudados.

- Estudar o efeito da microinjeção de glutamato diretamente na AMePD e analisar o comportamento alimentar, a glicemia e a insulinemia de ratos machos adultos mantidos em condição de laboratório, com o modelo experimental elaborado, e frente a dieta de seleção de macronutrientes isolados.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT CR, KENNEDY AR, WREN AM, ROSSI M, MURPHY KG, SEAL LJ, TODD JF, GHATEI MA, SMALL CJ, BLOOM SR. Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. *Endocrinol*, 144 (9):3943-9, 2003.

AGGLETON JP, BLINDT MS. Effects of the amygdaloid and amygdaloid-hipocampal lesions on object recognition and spatial working memory in rats. *Behav Neurosci*, 103: 962-974, 1989.

ALHEID GF, HEIMER L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neurosci*, 27: 1-39, 1988.

ALHEID GF, De OLMOS JS, BELTRAMINO CA. Amygdala and extended amygdala. In: PAXINOS, G. *The Rat Nervous System*. San Diego: Academic Press, p. 495-598, 1995.

ALLEN JP, ALLEN CF. Role of the amygdaloid complex in the estress-induced release of ACTH in the rat. *Neuroendocrinol*, 15: 220-230, 1974.

ANDIK I, BANK J, DONHOFFER S. The effect of hypothalamic lesions on intake and selection of food by rats. *Arch Exp Pathol Pharmacol*, 231:55-62, 1957.

AVERILL DB, DIZ, DI. Angiotensin peptides and baroreflex control of the sympathetic outflow: Pathways and mechanism in the medulla oblongata. *Brain Res Bull*, 51:119-128, 2000.

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

BERRIDGE KC. Modulation of taste affect by hunger, caloric satiety, and sensory-specific satiety in the rat. *Appetite*, 16:103-20, 1991.

BERTHOUD HR. Multiple neuronal systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev*, 26:393-428, 2002.

BERTHOUD HR. Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol Behav*, 81:781-793, 2004.

BERTHOUD HR, SUTTON GM, TOWNSEND RL, PATTERSON LM, ZHENG H. Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiol Behav*, 89(4):517-24, 2006.

BIAN X, YANAGAWA Y, CHEN WR, LUO M. Cortical-lick functional organization of the pheromone-processing circuits in the medial amygdala. *J Neurophysiol*, 99: 77-86, 2008.

BOLHUIS JR. The corticomедial amygdala and learning in an agonistic situation in the rat. *Physiol Behav*, 32: 575-579, 1984.

BRESSLER SC, BAUM MJ. Sex comparison of neuronal *Fos* immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neurosci*, 71:1063-1072, 1996.

BROBERGER C, JOHANSEN J, JOHANSSON C, SCHALLING M, HÖKFELT T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (25): 15043-8, 1998.

BROWN S, SCHAFER EA. An investigation into the functions of the occipital and temporal lobes of the monkey's brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 179:303-27, 1888.

BUGARITH K, DINH TT, LI AJ, SPETH RC, RITTER S. Basomedial hypothalamic injections of neuropeptide Y conjugated to saporin selectively disrupt hypothalamic controls of food intake. *Endocrinol*, 146(3): 1179-91, 2005.

CANTERAS NS, SIMERLY RB, SWANSON LW. Organization of projection from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *J Neurosci*, 360: 213-245, 1995.

CANTERAS NS, CHIAVENGATTO S, RIBEIRO DO VALLE LE, SWANSON LW. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull*, 44: 297-305, 1997.

CARLISLE HJ, STELLAR E. Caloric regulation and food preference in normal, hyperphagic, and aphagic rats. *J Com Physiol Psychol*, 69:107-14, 1969.

CARRER HF, WHITMOYER DI, SAWYER CH. Effects of hippocampal and amygdaloid stimulation on the firing of preoptic neurons in the proestrus female rats. *Brain Res*, 142: 363-367, 1978.

CAVALCANTE JC, SITA LV, MASCARO MB, BITTENCOURT, JC, ELIAS CF. Distribution of urocortin 3 neurons innervating the ventral premammillary nucleus in the rat brain. *Brain Res*, 1089: 116-125, 2006.

CHAVEZ M, RIEDY CA, VAN DIJK G, WOODS SC. Central insulin and macronutrient intake in the rat. *Am J Physiol*, 271 (40): R727-31, 1996.

CORBIT JD, STELLAR E. Palatability, food intake, and obesity in normal and hyperphagic rats. *J Comp Physiol Psychol*, 58: 63-7, 1964.

CORWIN RL, ROBINSON JK, CRAWLEY JN. Galanin antagonists block galanin-induced feeding in the hypothalamus and amygdala of the rat. *Eur J Neurosci*, 5:1528-33, 1993.

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*, 24 (1):155-63, 1999.

COWLEY MA, SMART JL, RUBINSTEIN M, CERDÁN MG, DIANO S, HORVATH TL, CONE RD, LOW MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836):480-4, 2001.

DALL'OGGIO A, GEHLEN G, ACHAVAL M, RASIA-FILHO AA. Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: further data based on the Golgi method. *Neurosci Lett*, 430(2):151-6, 2008.

DAYAS CV, BULLER KM, DAY TA. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: Evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur J Neurosci*, 11: 2312-2322, 1999.

DAVIS, M. The role of the amygdala in conditioned fear. In: AGGLETON JP. *The Amygdala*. New York: Wiley –Liss, 2000.

De OLMOS JS, ALHEID GF, BELTRAMINO CA. Amygdala. In: PAXINOS, G. (Ed.). *The rat nervous system*. v. 1. Sydney: Academic Press, 223-334, 1985.

De OLMOS JS, HEIMER RL. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Ann NY Acad Sci*, 877:1-32, 1999.

De OLMOS JS, BELTRAMINO A, ALHEID GF. Amygdala and extended amygdala of the rat: A cytoarchitectonical, fibroarchitectonical survey. *The rat Nervous System*, 3(19): 509-603, 2004.

DIANO S, NAFTOLIN F, HORVATH TL. Gonadal steroids target AMPA glutamate receptor-containing neurons in the rat hypothalamus, septum and amygdala: a morphological and biochemical study. *Endocrinol*, 138(2):778-89, 1997.

DIELENBERG RA, HUNT GR, MCGREGOR LS. When a Rat Smells a Cat: The distribution of FOS immunoreactivity in the rat brain following exposure to a predatory odor. *Neurosci*, 104: 1085-1097, 2001.

DOMINGUEZ JM, HULL EM. Stimulation of the medial amygdala enhances medial preoptic dopamine release: implications for male rat sexual behavior. *Brain Res*, 917: 225-229, 2001.

DONG HW, PETROVICH G, SWANSON LW. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Rev*, 38: 192-246, 2001.

DUVA MA, TOMKINS EM, MORANDA LM, KAPLAN R, SUKHASEUM A, JIMENEZ A, STANLEY BG. Reverse microdialysis of N-methyl-D-aspartic acid into the lateral hypothalamus of rats: effects on feeding and other behaviors. *Brain Res*, 921(1-2):122-32, 2001.

ELIAS CF, ASCHKENASI C, LEE C, KELLY J, AHIMA RS, BJORBAEK C, FLIER JS, SAPER CB, ELMQUIST JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*, (4):775-86, 1999.

ELIAS CF, SAPER CB, MARATOS-FLIER E, TRITOS NA, LEE C, KELLY J, TRATO JB, HOFFMAN GE, OLLMANN MM, BARSH GS, SAKURA T, YANAGISAWA M, ELMQUIST JK. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*, 402(4):442-59, 1998.

EVERITT B. Limbic lobe and olfactory pathways. In: BERRY, M. M.; BANNISTER, L. H.; STANDRING, S. M. *Gray's Anatomy*. London: Churchill Livingstone, p.115-1141, 1995.

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

FLODD JF. Effect of histamine H₂ and H₃ receptor modulation in the septum on post-training memory processing. *Psychopharmacol*, 140: 279-284, 1998.

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 Societies Press, p. 437-52, 1977.

GALLAGHER M, CHIBA AA. The amygdala and emotion. *Curr Opin Neurobiol*, 6(2):221-7, 1996.

GERARDO-GETTENS T, MILLER GD, HORWITZ BA, MCDONALD RB, BROWNELL KD, GREENWOOD MR, RODIN J, STERN JS. Exercise decreases fat selection in female rats during weight cycling. *Am J Physiol*, 260: R518-24, 1991.

GLASS MJ, BILLINGTON CJ, LEVINE AS. Naltroxene administered to central nucleus of amygdala or PVN: neural dissociation of diet and energy. *Am J Physiol*, 279: R86-92, 2000.

GROENEWEGEN HJ, WRIGHT CI, BEIJER AV, VOORN P. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann NY Acad Sci*, 877:49-63, 1999.

GROOVE EA. Efferent connections of the substantia innominata in the rat. *J Comp Neurol*, 277:347-382, 1988.

GUILLAMÓN A, SEGOVIA S. Sex Differences in the vomeronasal system. *Brain Res Bull*, 44: 377-382, 1997.

GUIRADO S, REAL MA, DÁVILA JC. Immunohistochemically defined areas in the medial amygdala in the developing and adult mouse. *Brain Res Bull*, 75: 214-217, 2008.

HERBERT H, SAPER CB. Cholecystokinin-galanin, and corticotropin-releasing factor-like immunoreactive projections from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 293:581-598, 1990.

HINES M, ALLEN L S, GORSKI RA. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of stria terminalis of the rat. *Brain Res*, 579: 321-326, 1992.

JIANG X, CHEN A, LI H. Histaminergic modulation of excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala. *Neurosci*, 131:691-703, 2005.

JONES BE, MOORE RY. Ascending projections of the locus ceruleus in the rat II. Autoradiographic study. *Brain Res Bull*, 127:23-53, 1977.

JONES NM, BEART PM, MONN JA, WIDDOP RE. Type I and II metabotropic glutamate receptors mediate depressor and bradycardic actions in the nucleus of the solitary tract of anaesthetized. *Eur J Pharmacol*, 380:129-135, 1999.

KANAREK RB, FELDMAN PG, HANES C. Pattern of dietary self-selection in VMN-lesioned rats. *Physiol Behav*, 27: 337-43, 1981.

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*, 18: 47-50, 1983.

KANAREK RB. Determinants of dietary self-selection in experimental animals. *Am J Clin Nutr*, 42(5 Suppl):940-50, 1985.

KAKINOKI H, ISHIZAWA K, FUKUNAGA M, FUJII Y, KAMEI C. The effects of histamine H3-receptor antagonists on amygdaloid kindled seizures in rats. *Brain Res Bull*, 46(5):461-5, 1998.

KENNEDY GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B*, 140:579-592, 1953.

KING BM, KASS JM, CADIEUX NL, SAM H, NEVILLE KL, ARCENEUX ER. Hyperphagia and obesity in female rats with temporal lobe lesions. *Physiol Behav*, 54: 759-65, 1993a.

KING BM, KASS JM, NEVILLE KL, SAM H, TATFORD III AC, ZANSLER CA. Abnormal weight gain in rats with amygdaloid lesions. *Physiol Behav*, 54: 467-70, 1993b.

KING BM, SAM H, ARCENEUX ER, KASS, JM. Effect on food intake and body weight of lesions in and adjacent to the posterodorsal amygdala in rats. *Physiol Behav*, 55:963-6, 1994.

KING BM, COOK JT, DALLMAN MF. Hyperinsulinemia in rats with obesity-inducing amygdaloid lesions. *Am J Physiol*, 271(40):R1156-9, 1996a.

KING BM, ARCENEUX ER, COOK JT, BENJAMIN AL, ALHEID GF. Temporal lobe lesion-induced obesity in rats: an anatomical investigation of the posterior amygdala and hippocampal formation. *Physiol Behav*, 59: 843-8, 1996b.

KING BM, COOK JT, ROSSITER KN, THEOBOLD LM, SAM HM. Posterodorsal amygdaloid lesions in rats: long-term effects on body weight. *Physiol Behav*, 60:1569-71, 1996c.

KING BM, ROSSITER KN, COOK JT, SAM HM. Amygdaloid lesion-induced obesity in rats in absence of finickiness. *Physiol Behav*, 62:935-8, 1997.

KING BM, ROSSITER KN, STINES SG, ZAHARAN GM, COOK JT, HUMPHRIES MD, YORK DA. Amygdaloid-lesion hyperphagia: impaired response to caloric challenges and altered macronutrient selection. *Am J Physiol*, 275: R485-93, 1998.

KING BM, ROLLINS BL, STINES SG, CASSIS SA, McGUIRE HB, LAGARDE ML. Sex differences in body weight gains following amygdaloid lesions in rats. *Am J Physiol*, 277:R975-80, 1999.

KING BM, ROLLINS BL, GRUNDMANN SJ, OLIVIER LG. Excessive weight gains in female rats with transections of the stria terminalis. *Physiol Behav*, 78(4-5):563-8, 2003a.

KING BM, COOK JT, ROSSITER KN, ROLLINS BL. Obesity-inducing amygdala lesions: examination of anterograde degeneration and retrograde transport. *Am J Physiol*, 284(4):R965-82, 2003b.

KING BM. Amygdaloid lesion-induced obesity: relation to sexual behavior, olfaction, and the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol*, 291(5): R1201-14, 2006a.

KING BM. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*, 87(2):221-44, 2006b.

KLING AS, BROTHERS LA. The amygdala and social behavior. In: AGGLETON JP. *The amygdala*. New York: Wiley-Liss, p.353-377, 1992.

KLÜVER H, BUCY PC. Preliminary analysis of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol Psych*, 42:979-1000, 1939.

KNAPSKA E, RADWANSKA K, WERKA T, KACZMAREK L. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol Rev*, 87: 1113–1173, 2007.

KON SK. The self-selection of food constituents by the rat. *Biochem J*, 25(2): 473-81, 1931.

KONDO Y, ARAI Y. Functional association between the medial amygdala and the medial preoptic area in regulation of mating behavior in the male rat. *Physiol Behav*, 57(1):69-73, 1995.

KONDO Y. Lesions of the medial amygdala produce severe impairment of copulatory behavior in sexually inexperienced male rats. *Physiol Behav*, 51: 939-943, 1992.

KOKARE DM, DANDEKAR MP, CHOPDE CT, SUBHEDAR N. Interaction between neuropeptide Y and alpha-melanocyte stimulating hormone in amygdala regulates anxiety in rats. *Brain Res*, 1043: 107-14, 2005.

KRAMER TH, GOLD RM. Facilitation of hypothalamic obesity by greasy diets: palatability vs. lipid content. *Physiol Behav*, 24:151–6, 1980.

KRATZ CM, LEVITSKY DA. Dietary obesity: differential effects with self-selection and composite diet feeding techniques. *Physiol Behav*, 22(2): 245-9, 1979.

LEIBOWITZ SF, XUEREBA M, KIM T. Blockade of natural and neuropeptide Y-induced carbohydrate feeding by a receptor antagonist PYX-2. *Neuroreport*, 3:1023–6, 1992.

LeDOUX JE. Emotion and amygdala. In: AGGLETTON JP. *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss, p.255-306, 1992.

LEE SW, STANLEY BG. NMDA receptors mediate feeding elicited by neuropeptide Y in the lateral and perifornical hypothalamus. *Brain Res*, 1063(1):1-8, 2005.

LEHMAN MN, WINANS SS. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior. Autoradiographic and behavioral analyses. *Brain Res*, 240: 27-41, 1982.

LIN L, YORK DA. Enterostatin actions in the amygdala and PVN to suppress feeding in the rat. *Peptides*, 18:1341-7, 1997.

LÓPEZ M, TOVAR S, VÁSQUEZ MJ, WILLIAMS LM, DIÉGUEZ C. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc*, 66: 131-155, 2007.

LU VN, HATTORI Y, MORIWAKI A, HAYASHI Y, HORI Y. Inhibition of neurons in the rat medial amygdaloid nucleus in vitro by somatostatin. *J Physiol Pharmacol*, 73: 670-674, 1995.

LUITEN PG, TER HORST G, STEFFENS A. The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Progr Neurobiol*, 28:1-54, 1987.

MARCUZZO S, DALL'OGGIO A, RIBEIRO MF, ACHAVAL M, RASIA-FILHO AA. Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neurosci Lett*, 424(1):16-21, 2007.

MAREN S. Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. *Mol Neurobiol*, 13:1-22, 1996.

MARLOWE WB, MANCALL EL, THOMAS JJ. Complete Kluver- Bucy syndrome in man. *Cortex*, 11:53-9, 1975.

MATSUMURA K, TSUCHIHASHI T, KAGIYAMA S, ABE I, FUJISHIMA M. Subtypes of metabotropic glutamate receptors in the nucleus of the solitary tract of rats. *Brain Res Bull*, 842:461-468, 1999.

McDONALD AJ, JACKSON TR. Amygdaloid connections with posterior insular and temporal cortical areas in the rat. *J Comp Neurol*, 262(1):59-77, 1987.

McDONALD AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol*, 55: 257-332, 1998.

McGAUGH JL. Involvement of the amygdala in neuromodulatory influences on memory storage. In: AGGLETTON JP. *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss, p. 431-451, 1992.

MEISEL R, SACHS D. The Physiology of male Sexual Behavior. In: *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J. D. Neill [Ed]. New York: Raven Press, 1994.

MELDRUM, BS. Glutamate as a Neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, 130: 1007S-1015S, 2000.

MEREDITH M, WESTBERRY JM. Distictive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. *J Neurosci*, 24: 5719-5725, 2004.

MILLER GD, HRUPKA BJ, GIETZEN DW, ROGERS QR, STERN JS. Rats on a macronutrient self-selection diet eat most meals from a single food cup. *Appetite*, 23(1): 67-78, 1994.

MORGAN HD, WATCHUS JA, MILGRAM NW, FLEMING AS. The long lasting effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and the medial amygdala on maternal behavioral in female rats. *Brain Res*, 99: 63-73, 1999.

NEWMAN SW. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann NY Acad Sci*, 877: 242-257, 1999.

NEWMAN SW. Pheromonal signals access the medial extended amygdala: One node in a proposed social behavior network. *Horm Brain Behav*, 2(17): 17-32, 2002.

NUMAN MJ, NUMAN M, ENGLISH JB. Excitotoxic aminoacid injections into the medial amygdala facilitate maternal behavior in virgin female rats. *Horm Brain Behav*, 27: 56-81, 1993.

OBERTO A, PANZICA GC, ALTRUDA F, EVA C. GABAergic an NPY-Y1 network in the medial amygdala: A neuroanatomical basis for their functional interaction. *Neuropharmacol*, 41:639-642, 2001.

OHTAKE T, YAMANDA H. Efferent conections of the nucleus reunions and the rhomboid nucleus in the rat: An anterograde PHA-L tracing study. *Neurosci Res*, 6:556-568, 1989.

OKADA S, YORK DA, BRAY GA, ERLANSON- ALBERTSSON C. Differential inhibition of fat intake in two strains of rat by the peptide enterostatin. *Am J Physiol*, 262 (31): R1111-6, 1992.

OOKUMA KC, BARTON C, YORK DA, BRAY GA. Effect of enterostatin and kappa-opioids on macronutrient selection and consumption. *Peptides*, 18:785-91, 1997.

OOMURA Y, ONO T, OYOYAMA H. Inhibitory mechanism of the amygdala on the lateral hypothalamic area in rats. *Nature*, 228:1108-10, 1970.

ÖSTERLUND M, KUIPER GG, GUSTAFSSON JA, HURD YL. Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Mol Brain Res*, 54:175-180, 1998.

OTTERSEN OP, BEN-ARI Y. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat: Projections from the thalamus. *J Comp Neurol*, 187: 401-424, 1979.

OTTERSEN OP. Afferent conections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. II. Afferent from the hypothalamus and the basal telencephalon. *J Comp Neurol*, 194:267-289, 1980.

OTTERSEN OP. Afferent conections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. III. Afferent from the lower brainstem. *J Comp Neurol*, 202:335-356, 1981.

OZAWA S, KAMIYA H, TSUZUKI K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, 54:581-618, 1998.

PAXINOS G, WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press, 1998.

PETROVICH GD, CANTERAS NS, SWANSON LW. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Rev*, 38: 247-289, 2001.

PETROVICH GD, SCICLI AP, THOMPSON RF, SWANSON LW. Associative fear conditioning of enkephalin mRNA levels in central amygdalar neurons. *Behav Neurosci*, 114 (4):681-6, 2000.

PITKÄNEN A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: AGGLETON JP. *The Amygdala: A Functional Analysis*. Oxford: Oxford University Press, p.31-115, 2000.

PRICE DL, CORK LC, STRUBLE RG, KITT CA, WALKER LC, POWERS RE, WHITEHOUSE PJ, GRIFFIN JW. Dysfunction and death of neurons in human degenerative neurological diseases and in animal models. *Ciba Found Symp*, 126:30-48, 1987.

PRIBRAM KH, BAGSHAW M. Further analysis of the temporal lobe syndrome utilizing frontotemporal ablations. *J Comp Neurol*, 99:347-75, 1953.

PRIMEAUX SD, YORK DA, BRAY GA. Neuropeptide Y administration into the amygdala alters high fat food intake. *Peptides*, 27(7): 1644-51, 2006.

POLSTON EK, SIMERLY RB. Neurons in the principal nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis provide a sexually dimorphic GABAergic input to the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *Neurosci*, 123: 793-803, 2004.

PURVES D, AUGUSTINE GJ, FITZPATRICK D, HALL WC, LaMANTIA AS, McNAMARA JO, WHITE LE. *Neuroscience*, 2ed. Sinauer Associates Inc. 2001.

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

QUAGLIOTTO, E. Efeito da microinjeção de histamina e metil-histamina no núcleo pósterodorsal da amígdala medial sobre o controle da pressão arterial em ratos. *Dissertação de Mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

QUIRK GJ, REPA C, LeDOUX JE. Fear conditioning enhances short latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron*, 15:1029-1039, 1995.

RADA P, MORENO SA, TUCCI S, GONZALEZ LE, HARRISON T, CHAU DT, HOEBEL BG, HERNANDEZ L. Glutamate release in the nucleus accumbens is involved in behavioral depression during the PORSOLT swim test. *Neurosci*, 119(2):557-65, 2003.

RADA P, TUCCI S, MURZI E, HERNANDEZ L. Extracellular glutamate increases in the lateral hypothalamus and decreases in the nucleus accumbens during feeding. *Brain Res*, 768(1-2):338-40, 1997.

RASIA-FILHO AA, PERES TM, CUBILLA-GUTIERREZ FH, LUCION AB. Effect of estradiol implanted in the corticomedial amygdala on the sexual behavior of castrated male rats. *Br J Med Biol Res*, 24: 1041-1049, 1991.

RASIA-FILHO AA, LONDERO RG, ACHAVAL M. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. *Brain Res Bull*, 48: 173-183, 1999.

RASIA-FILHO AA, LONDERO R, ACHAVAL M. Functional activities of the amygdala: an overview. *J Psych Neurosci*, 25:14-23, 2000.

RASIA-FILHO AA, FIN CA, ALVES M, POSSA M, ROEHRIG C, FEOLI A, SILVA L, PERRY ML. Glucose and lactate utilization by the amygdala of male and female rats. *Neurochem Res*, 27:1575-1580, 2002.

RASIA-FILHO AA, FABIAN C, RIGOTTI KM, ACHAVAL, M. Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neurosci*, 126:839-847, 2004.

RASIA-FILHO AA, HILBIG A. Papel da amígdala e do hipocampo no transtorno do estresse pós-traumático. In: CAMINHA, R. *Transtornos do Estresse Pós-traumático*, São Paulo: Casa do Psicólogo, p.37-53, 2005.

RASIA-FILHO AA. Is there anything "autonomous" in the nervous system? *Adv Physiol Educ*, 30(1):9-12, 2006.

RASIA-FILHO AA, GIOVENARDI M, ALMEIDA RMM. Drugs and aggression. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 3:40-49, 2008.

RICHTER CP, SCHMIDT ECH Jr. Increased fat intake and decreased carbohydrate intake of pancreatectomized rats. *Endocrinol*, 28: 179-92, 1941.

RICHTER CP. Total self-regulatory functions in animals and human beings. *Harvey Lecture Series*, 38: 63-103, 1943.

RICHTER CP, SCHMIDT ECH Jr, MALONE PD. Further observations on the self-regulatory dietary selections of rats made diabetic by pancreatectomy. *Bull Johns Hopkins Hosp* 76: 192-219, 1945.

RITTER S, HUTTON B. Mercaptoacetate-induced feeding is impaired by central nucleus of the amygdala lesion. *Physiol Behav*, 58,(6):1215-20, 1995.

ROLLINS BL, KING BM. Amygdala-lesion obesity: what is the role of the various amygdaloid nuclei? *Am J Physiol*, 279: R1348-56, 2000.

ROOZENDAAL B, McGAUGH JL. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in a inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem*, 65: 1-8, 1996.

ROSSI M, CHOI SJ, O'SHEA D, MIYOSHI T, GHATEI MA, BLOOM SR. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinol*, 138(1):351-5, 1997.

ROSSI M, BEAK SA, CHOI SJ, SMALL CJ, MORGAN DG, GHATEI MA, SMITH DM, BLOOM SR. Investigation of the feeding effects of melanin concentrating hormone on food intake--action independent of galanin and the melanocortin receptors. *Brain Res*, 6;846(2):164-70, 1999.

SCHWARTZ MW, WOODS SC, PORTE D Jr, SEELEY RJ, BASKIN DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778):661-71, 2000.

SCHWARTZBAUM JS. Some characteristics of "amygdaloid hyperphagia" in monkeys. *Am J Physiol*, 74: 252-9, 1961.

SCOTT EM, QUINT E. Self-selection of diet. IV. Appetite for protein. *J Nutr*, 32: 397-406, 1946.

SHAIKH MB, STEINBERG A, SIEGEL A. Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive range behavior in the cat. *Brain Res*, 265: 283-294, 1993.

SHEEHAN TP, CIRRITO J, NUMAN M.J, NUMAN M. Using c-fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Beh Neurosci*, 114: 337-352, 2000.

SHIMBARA T, MONDAL MS, KAWAGOE T, TOSHINAI K, KODA S, YAMAGUCHI H, *et al*. Central administration of ghrelin preferentially enhances fat ingestion. *Neurosci Lett*, 369(1): 75-9, 2004.

SHINDOU T, WATANABE S, YAMAMOTO K, NAKANISHI H. NMDA receptor-dependent formation of long-term potentiation in the rat medial amygdala neuron in an in vitro slice preparation. *Brain Res Bull*, 31: 667-672, 1993.

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*, 24: 931-9, 1986.

SIEGEL A, BRUTUS M. Neural substrates of aggression and rage in the cat. In: EPSTEIN, A. N. & MORRISON, A. R. (Eds.). *Progr Psychobiol Physiol Psych*, 14th Ed. San Diego: Academic Press, 1990.

SIMERLY R. Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: Paxinos G. *The Rat Nervous System*, New York: Elsevier, p.335-368, 2004.

SIMMONS DA, YAHR P. GABA and glutamate in mating-activated cells in the preoptic area and medial amygdala of male gerbils. *J Comp Neurol*, 459(3):290-300, 2003.

SINGER LK, YORK DA, BRAY GA. Macronutrient selection following 2-deoxy-D-glucose and mercaptoacetate administration in rats. *Physiol Behav*, 65(1):115-21, 1998.

- SINGEWALD N, KOUVELAS D, MOSTAFA A, SINNER C, PHILIPPU A. Release of glutamate and GABA in the amygdala of conscious rats by acute stress and baroreceptor activation: differences between SHR and WKY rats. *Brain Res Bull*, 864:138-141, 2000.
- SLODDART-APTER SL, MacDONNELL MF. Septal and amygdalar efferents to the hypothalamus which facilitate hypothalamically elicited intraspecific aggression and associated hissing in the cat. An autoradiographic study. *Brain Res*, 193: 19-32, 1980.
- SMITH BK, BERTHOUD HR, YORK DA, BRAY GA. Differential effects of baseline macronutrient preference on macronutrient selection after galanin, NPY, and an overnight fast. *Peptides*, 18(2): 207-11, 1997.
- SMITH BN, DUDEK FE. Aminoacid-mediated regulation of spontaneous synaptic activity patterns in the rat basolateral amygdala. *J Neurophysiol*, 76:1958-1967, 1996.
- STANLEY BG, KYRKOULI SE, LAMPERT S, LEIBOWITZ SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*, 7(6):1189-92, 1986.
- STANLEY BG, WILLETT VL, DONIAS HW, HA LH, SPEARS LC. The lateral hypothalamus: a primary site mediating excitatory amino acid-elicited eating. *Brain Res*, 10 (1-2): 41-9, 1993.
- STELLAR E. The physiology of motivation. *Psychol Rev*, 61(1):5-22, 1954.
- STETTER KR, MCCANN LI, LEAFGREN MA, SEGAR MT. Diet preference in rats (*Rattus norvegicus*) as a function of odor exposure, odor concentration, and conspecific presence. *J Comp Psychol*, 109 (4): 384-9, 1995.
- STRATFORD TR, SWANSON CJ, KELLEY A. Specific changes in food intake elicited by blockade or activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens shell. *Behav Brain Res*, 93(1-2):43-50, 1998.
- STRATFORD TR, KELLEY AE. Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci*, 19:11040–11048, 1999.
- STRUBBE JH, WOODS SC. The timing of meals. *Psychol Rev*, 111(1):128-41, 2004.
- SUTIN J, McBRIDE RL, THALMANN RH, VAN ATTA L. Organization of some brainstem and limbic connections of the hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav*, 3:49-59, 1975.
- SWANSON LW, COWAN WM. The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol*, 186: 621-656, 1979.
- SWANSON LW, PETROVICH GD. What is the amygdala? *Trends Neurosci*, 21: 323-331, 1998.
- TANAKA K. Function of glutamate transporters in the brain. *Neurosci Res*, 37:15-19, 2000.
- TAPIERO H, MATHÉ G, COUVREUR P, TEW KD. Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacoth*, 56:446-457, 2002.

TEMPEL DL, LEIBOWITZ KJ, LEIBOWITZ SF. Effects of PVN galanin on macronutrient selection. *Peptides*, 9(2): 309-14, 1988.

TEMPEL DL, SHOR-POSNER G, DWYER D, LEIBOWITZ SF. Nocturnal patterns of macronutrient intake in freely feeding and food-deprived rats. *Am J Physiol*, 256:R541-8, 1989.

TERZIAN H, ORE GD. Syndrome of Klüver and Bucy reproduced in man by bilateral removal of the temporal lobes. *Neurol*, 5:373-80, 1955.

THIBAUT L, BOOTH DA. Macronutrient-specific dietary selection in rodents and its neural bases. *Neurosci Biobehav Rev*, 23: 457-528, 1999.

THONGKHAO-ON K, WIRTSHAFTER D, SHIPPY SA. Feeding specific glutamate surge in the rat lateral hypothalamus revealed by low-flow push-pull perfusion. *Pharmacol Biochem Behav*, 89(4):591-7, 2008.

TORDOFF MG, GEISELMAN PJ, GRIJALVA CV, KEIFER SW, NOVIN D. Amygdaloid lesions impair ingestive responses to 2-deoxy-D-glucose but not insulin. *Am J Physiol*, 242: R129-35, 1982.

TRACY AL, LEONARD EJ, DAVIDSON TL. The hippocampus and motivation revisited: appetite and activity. *Behav Brain Res*, 127:13-23, 2001.

TRIBE DE. Choice of diet by rats. The choice of purified food constituents during growth, pregnancy and lactation. *Br J Nutr*, 9: 103-9, 1995.

VOCHTELLO JD, KOOLHAAS JM. Medial amygdala lesions in male rats reduce aggressive behavior: interference with experience. *Physiol Behav*, 41: 99-102, 1987.

VINADER-CAEROLS C, COLLADO P, SEGOVIA S, GUILLAMÓN A. Sex differences in the posteromedial cortical nucleus of the amygdala in the rat. *Neuroreport*, 9 (11):2653-6, 1998.

WATANABE T, TAGUCHI Y, SHIOSAKA S, TANAKA J, KUBOTA H, TERANO Y, TOHYAMA M, WADA H. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res*, 295: 13-25, 1984.

WATANABE Y, IKEGAYA Y, SAITO H, ABE K. Roles of GABA, NMDA and muscarinic receptors in induction of long-term potentiation in the medial and lateral amygdala in vitro. *Neurosci Res*, 21: 317-322, 1995.

WELCH CC, GRACE MK, BILINGTON CJ, LEVINE AS. Preference and diet type affect macronutrient selection after morphine, NPY, norepinephrine, and deprivation. *Am J Physiol*, 266:R426-33, 1994.

WESTBERRY JM. Categorization of pheromonal chemosignals by medial amygdala. *Tese (Doctor in Neuroscience)*. Department of Biological Science of the Florida State University College of Arts and Sciences, 2003.

WINANS SS, SCALIA F. Amygdaloid nucleus: new afferent input from the vomeronasal organ. *Sci*, 170(955):330-2, 1970.

WANG J, DOURMASHKIN JT, YUN R, LEIBOWITZ SF. Rapid changes in hypothalamic neuropeptide Y produced by carbohydrate-rich meals that enhance corticosterone and glucose levels. *Brain Res*, 848(1-2): 124-36, 1999.

WOODS SC, SEELEY RJ, PORTE D Jr, SCHWARTZ MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Sci*, 280(5368):1378-83, 1998.

WOOD RI, NEWMAN SW. Hormonal influence on neurons of the mating behavior pathway in male hamsters. In: MICEVYCH PE, HAMMER JR, R.P. *Neurobiological effects of sex steroid hormones*. New York: Cambridge, p.3-39, 1995.

WONG M, CHEN Y, MOSS RL. Excitatory and inhibitory synaptic processing in the accessory olfactory system of the female rat. *Neurosci*, 56: 355-365, 1993.

YILMAZER-HANKE DM, ROSKODEN T, ZILLES K, SCHWEGLER H. Anxiety-related behavior and densities of glutamate, GABA_A, acetylcholine and serotonin receptors in the amygdala of seven inbred mouse strains. *Behav Brain Res*, 145:145-159, 2003.

5 ARTIGO EM PORTUGUÊS

Descrição de modelo experimental para estudo do comportamento alimentar de ratos submetidos a dieta nutricional completa ou de macronutrientes isolados

Carolina Böettge Rosa^{1*}, Jéferson Ferraz Goularte², Nathália Agazzi Trindade², Alberto A. Rasia-Filho^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, R. Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre - RS

² Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, R. Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre - RS

Palavras-chave: ingestão alimentar, dieta de seleção, macronutrientes, carboidrato, proteína, lipídeo, glicemia, insulinemia.

Key words: food intake, macronutrient self-selection diet, carbohydrate, protein, fat, glycemia, insulin plasma levels.

Título resumido: Modelo experimental para estudo do comportamento alimentar de ratos

Short title: An experimental model for feeding behavior studies in rats

* Endereço para correspondência: UFCSPA / Depto. Ciências Fisiológicas. R. Sarmiento Leite, 245 / Sala 308, Porto Alegre 90050-170, RS, Brasil. E-mail: cboettge@ufcspa.edu.br, rasiafilho@pq.cnpq.br.

RESUMO

OBJETIVO: Descrever um modelo experimental que permite avaliar e quantificar o padrão de consumo alimentar de ratos submetidos à dieta completa ou de macronutrientes isolados.

MÉTODOS: Ratos Wistar machos adultos (90 dias, N=10) foram colocados em gaiolas metabólicas com rações preparadas em laboratório de tipo completa (AIN-93M) ou formulações isoladas de macronutrientes (carboidrato, proteína ou lipídeo como fonte calórica preferencial). A primeira dieta foi oferecida *ad libitum* e a segunda opção foi oferecida livremente ou após restrição alimentar (para induzir consumo durante o período claro do dia dos animais). O consumo alimentar total ou parcial das dietas e o ganho de peso corporal foram monitorados durante 16 dias consecutivos, glicemia e insulinemia foram avaliadas ao final do experimento (8 h de jejum seguidas de 2 h de consumo).

RESULTADOS: Os animais aumentaram de peso gradativamente ao longo de todo período experimental (média \pm SEM: $47,4 \pm 4,9$ g) e, nos dias em que receberam AIN-93M adaptada, consumiram cerca de $17,8 \pm 1,1$ g/dia do alimento disponível. Estes dados sugerem a adaptação dos animais ao ambiente de experimentação e à preparação dietética, neste caso, como o esperado. Quando submetidos à dieta de seleção, o consumo total foi de $18,8 \pm 2,0$ g/dia das dietas. Após privação alimentar por 8 h, o consumo total das dietas em diferentes dias experimentais desses animais foi de 23 ± 1 g/dia. Neste experimento, os ratos estudados apresentaram consumo preponderante da dieta rica em carboidratos. Após 2 h do reinício do consumo alimentar, os valores de glicemia foram de $391,5 \pm 31,9$ mg/dL e de insulinemia $28,3 \pm 5,3$ μ UI/mL, típicos do período pós-prandial.

CONCLUSÃO: O presente modelo experimental presta-se para estudo do padrão de consumo geral ou específico de nutrientes e o ganho de peso de ratos mantidos em condições experimentais bem controladas, podendo ser aplicado a vários tipos de experimentos como os de estudo da base neural de organização do comportamento alimentar e seus mecanismos de modulação periféricos.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To describe an experimental model to evaluate the pattern of food intake of rats submitted to a full nutrient diet or a self-selection three macronutrient selective diet.

METHOD: Male Wistar rats (3 months-old, N= 10) were studied when in metabolic cages and with two diets prepared in laboratory, a complete type one (AIN-93M adapted) or high-carbohydrate, high-protein or high-lipid selective preparations, as preferential caloric source. The first diet was offered *ad libitum*. The macronutrient selective diet was freely available or reinstated after 8 h of food deprivation to induce feeding during the light period of the daily cycle. The preferred diet consumption and gain of weight was monitored during 16 consecutive days. Postprandial glycemia and insulinmia were evaluated at the end of the experimental procedure (after 2 h of food intake that followed a period of 8 h of fasting).

RESULTS: The animals showed a clear and progressive weight gain along the experimental period (mean \pm SEM: $47,4 \pm 4,9$ g). During the period when they had free access to the AIN-93M adapted diet, they consumed near 18 ± 1 g/day of food, which represents an adequate adaptation of the animals to the experimental conditions. When switched to the macronutrient selective diet, the consumption was around 19 ± 2 , g/day and rather of the high-carbohydrate composition. Following an 8 h period of food deprivation, rats consumed 23 ± 1 g/day, again of the high-carbohydrate source, in different experimental days. Postprandial values for glycemia were $391,5 \pm 31,9$ mg/dL and for insulinmia were $28,3 \pm 5,3$ μ UI/mL, which are compatible with normal post-prandial values in rats.

CONCLUSION: The present experimental model is useful for the study of the pattern of both general and specific consumption of nutrients and body weight gain in rats maintained

under controlled laboratory conditions. The present methodological design is useful and can be applied together with several other experimental approaches to advance the knowledge of the neural control of feeding behavior as well as the peripheral modulatory mechanisms in rats.

1 INTRODUÇÃO

A gênese do comportamento alimentar, envolvendo fome ou apetite específico, é decorrente de uma complexa circuitaria neuroglial e que pode ser diferente entre as espécies¹⁻³. A modulação da ingestão alimentar ocorre pela disponibilidade de alimento no ambiente e pela ação de aferências neurais e substâncias hormonais liberadas por tecidos periféricos para atuar como mecanismo de reatuação como, por exemplo, para a saciedade¹⁻³. Apesar de muitos mecanismos de regulação central da ingestão alimentar permanecerem desconhecidos², o envolvimento de algumas regiões é notável, como é o caso dos núcleos hipotalâmicos anteroventral, arqueado (ARC), paraventricular (PVN), ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH) e a área hipotalâmica lateral (LHA)³ ou do núcleo medial da amígdala (AMe)⁴.

Dentre os núcleos hipotalâmicos, o ARC, por exemplo, apresenta receptores para a leptina e para a insulina e expressa os neuropeptídeos orexigênicos proteína relacionada ao agouti (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY), assim como os neuropeptídeos anorexigênicos alfa-melanotropina (alfa-MSH) e o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART)^{5,6}. Axônios contendo esses neuropeptídeos projetam-se tanto para neurônios do PVN que expressam o hormônio liberador de tireotrofina (TRH), o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a ocitocina, como para a LHA que expressa o hormônio concentrador de melanina (MCH)⁷. O AMe interconecta-se com vias aferentes ou eferentes com essas regiões⁸, perfazendo um circuito neural cujos componentes continuam sendo descobertos.

Com a intenção de avançar os conhecimentos sobre a participação de áreas específicas do SNC relacionadas com o consumo alimentar, estudos têm sido conduzidos em ratos utilizando-se lesões eletrolíticas ou por neurotoxinas^{9,10}, microinjeções de transmissores

químicos ou de agentes farmacológicos^{11,12} ou estudos de expressão gênica após o comportamento alimentar do animal^{13,14}. Para tanto, também tem-se utilizado dietas específicas para avaliações qualitativas e quantitativas do que foi ingerido pelos animais nas diferentes condições experimentais. As dietas mais utilizadas em testes de ingestão alimentar são basicamente de dois modelos: a de formulação contendo os três macronutrientes (carboidrato, proteína e lipídeo), vitaminas e minerais e as de formulações com macronutrientes isolados, acrescidos de vitaminas e minerais, variando sua classificação como hiperglicídica, hiperproteica ou hiperlipídica de acordo com o macronutriente empregado em maior quantidade como principal fonte calórica¹⁵.

A utilização do modelo de oferta de formulações isoladas contendo cada um dos três macronutrientes, colocados em potes separados, constitui o modelo de “seleção de macronutrientes”, assim chamado pelo fato de o próprio animal escolher a composição da sua dieta e determinar o que e quanto vai comer¹⁶. Os estudos empregando o método de formulações isoladas fundamentam-se em uma condição natural que ratos da linhagem Wistar podem apresentar, ou seja, que eles são capazes de escolher uma dieta adequada para seu crescimento e manutenção de peso corporal, mesmo quando expostos à seleção de quinze fontes alimentares diferentes, ainda que estas variem amplamente em qualidade nutricional^{17,18}. O modelo de seleção de macronutrientes tem sido empregado também em testes de consumo após privação alimentar, por se acreditar que o padrão de seleção e ingestão de uma dieta induzido pelo jejum possa refletir as necessidades nutricionais do animal¹⁹.

Não obstante, muitas dificuldades são encontradas na literatura para se estabelecer um padrão de consumo alimentar básico entre ratos estudados em diferentes laboratórios e que estejam recebendo o método de formulações isoladas de nutrientes, e isso devido principalmente às diferenças nas quantidades e tipos de macronutrientes utilizados e a falta de

descrição detalhada ou padronização da metodologia para a preparação das dietas. Outros fatores que interferem no padrão de consumo alimentar, como o sexo²⁰ e a idade dos animais^{21, 22}, têm contribuído da mesma forma para dificultar a avaliação dos resultados obtidos, para estabelecer valores normais sobre o consumo alimentar e comparações quanto à seleção de nutrientes feita pelos animais em diferentes estudos. Uma não uniformidade metodológica pode obscurecer resultados relevantes e mesmo impedir que se chegue a conclusões para avançar o conhecimento em área relevante como a do estudo do comportamento alimentar, sua gênese e modulação.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo descrever em detalhes um método experimental passível de ser empregado em estudo com ratos em laboratório onde se busque avaliar e quantificar resultados do padrão de consumo alimentar no método de seleção de macronutrientes, comparando-o com o da ingestão de dieta completa de tipo AIN-93M adaptada, e tomando como parâmetros complementares o ganho de peso corporal ao longo do período de experimento e valores de glicemia e insulinemia pós-prandiais em momentos específicos do protocolo empregado. Descrições qualitativas e quantitativas serão apresentadas e os resultados comentados comparativamente com outros da literatura para avaliar a presente metodologia.

2 MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados 10 ratos Wistar machos adultos jovens (3 meses de vida no início dos experimentos) pesando entre 230 e 280g, mantidos em condições padrão de biotério na

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), temperatura ambiente em torno de 22° C e ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acesas às 6 h). Os experimentos foram conduzidos obedecendo as leis brasileiras e internacionais para a utilização de animais em pesquisas científicas e aprovado por Comitê de Ética e Pesquisa local.

2.2 GAIOLA METABÓLICA

No início dos experimentos, tão logo os animais foram obtidos do biotério, colocava-se cada rato isoladamente em uma gaiola metabólica em período de adaptação ao novo ambiente e para as testagens a seguir (Figura 1). Foram utilizadas gaiolas metabólicas para ratos nas medidas de 21,5 x 24 x 21 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), produzidas em arame perfilado, chapa e cantoneira de aço inox, com pés de 15 cm de altura (Beira-Mar Indústria e Comércio Ltda., Brasil). Água foi oferecida por meio de um bebedouro com ponteira suspensa na parede da gaiola. No interior desta, comedouros com formato arredondado de 6,5 cm de diâmetro e com 5,5 cm de altura continham a dieta ofertada ao animal. Foram colocados 3 desses recipientes no interior da gaiola, com localização mutável de um dia para outro (Figura 2). De acordo com a etapa experimental ou com a finalidade de cada experimento, ou os animais tinham acesso à dieta completa ou a preparações com macronutrientes isolados, conforme descrito a seguir.

2.3 DIETAS

Nos experimentos foram empregadas duas dietas formuladas em laboratório, sendo uma definida como “AIN-93M adaptada”, a qual foi baseada nas recomendações do Instituto

Americano de Nutrição de 1993 (AIN-93)²³ e outra com fontes nutricionais nas formas isoladas, mas que, embora com os mesmos nutrientes da dieta AIN-93M adaptada, permitia ao animal escolher o nutriente a ser ingerido. Foram adquiridos, para as preparações das formulações ingredientes como: amido de milho (Adran S.A., Brasil), açúcar (Refinaria União, Brasil.), caseína (MBN Produtos Químicos Ltda., Brasil) gordura vegetal hidrogenada (Bunge Pró LT400®, Bunge Alimentos, Brasil), óleo de soja (Primor®, Bunge Alimentos, Brasil), L-cistina (Vetec Química Fina S.A., Brasil), carboximetilcelulose (CMC, Casa da Química, Brasil), celulose (Blanver, Brasil), corantes nas cores amarela, vermelha e laranja (Arcolor, Brasil) e ácido cítrico (Mago ICAP, Brasil). As quantidades e proporções de cada nutriente empregadas no presente modelo estão descritas na Tabela 1.

Todos os procedimentos para elaboração das dietas foram repetidos várias vezes para que a preparação estivesse “fresca” e não mudasse suas características organolépticas com o passar do tempo, o que poderia afetar os resultados a serem obtidos. A seguir serão descritas os detalhes para tanto com a dieta AIN-93M adaptada e as dietas com macronutrientes isolados.

2.3.1 Dieta AIN-93M Adaptada

A dieta AIN-93M adaptada (Tabela 1) recebeu este nome por algumas modificações feitas referentes àquela original formulada pelo AIN-93²³. Na formulação proposta, foram adicionados componentes como o sal sódico da carboximetilcelulose (CMC), corante amarelo e ácido cítrico, além da substituição de metade do óleo de soja por gordura vegetal hidrogenada e a não utilização de amido de milho dextrinizado. A terbutilidroquinona e o bitartarato de colina não foram adicionados, pois já havia antioxidantes presentes nos lipídeos utilizados na dieta “AIN-93M adaptada”.

Ou seja, dentre os componentes empregados, utilizou-se o CMC, o derivado mais importante da celulose empregado principalmente em aplicações culinárias para aumentar a viscosidade dos alimentos. Devido às suas propriedades reológicas altamente desejáveis e à falta de toxicidade²⁴, tal substância foi agregada às dietas por servir como ligante e espessante, visando uma dieta com consistência sólida e ao mesmo tempo passível de ser ingerida pelos animais. A quantia utilizada foi variável, baseada no aspecto físico com que a dieta se apresentava. Buscou-se, no entanto, não utilizar mais que 20 g de CMC, uma vez que a partir desse valor pode ocorrer diminuição na absorção intestinal de fósforo e magnésio na ordem de 5 a 15%, respectivamente²⁵, bem como a de lipídeos²⁶. As quantias de carboidratos utilizadas foram divididas em amido de milho, CMC, celulose e sacarose. Apesar da formulação do AIN-93M utilizar amido dextrinizado, optou-se por sua não utilização, visto que seu uso era originalmente e somente feito para dar melhor formato ao “pellet” de alimento²³, o que foi alcançado na presente formulação proposta por meio da gelatinização do amido.

O uso de corante na dieta AIN-93M adaptada teve por finalidade manter um aspecto visual mais homogêneo, visto que nas dietas isoladas também foram utilizados corantes para que se pudesse apurar os resíduos desperdiçados e fazer a correta medição do consumo de cada dieta isoladamente feita ao longo do tempo. A quantia de 1 g/kg de dieta de corante amarelo em pó, sem sabor e inodoro, foi suficiente para dar a coloração aqui desejada.

Foi igualmente utilizada gordura vegetal hidrogenada porque, na dieta fonte de lipídeos empregada no modelo de seleção, não seria possível ter uma formulação sólida ao serem utilizados somente óleos, como sugere o AIN-93. Neste caso, optou-se por utilizar as duas fontes lipídicas (óleo e gordura vegetal hidrogenada) em ambas as dietas. Não foram adicionados os antioxidantes terbutilidroquinona e bitartarato de colina pois, diferentemente do óleo de soja empregado na AIN-93M original, o óleo de soja e a gordura vegetal

hidrogenada utilizados no presente estudo já possuíam antioxidantes, conforme descrição dos fornecedores.

2.3.1.1 Preparação da Dieta AIN-93M Adaptada

As etapas a seguir são descritas porque delas depende a qualidade e os aspectos organolépticos gerais da dieta completa oferecida aos animais aqui estudados e para utilização do presente modelo experimental.

A dieta AIN-93M adaptada foi preparada da seguinte forma: (1) pesou-se o amido de milho (609,6 g) e a sacarose (100 g); (2) acrescentou-se 400 ml de água destilada; (3) misturou-se o amido de milho, a sacarose e a água destilada até que formassem um líquido sem grumos e, (4) gelatinizou-se a mistura em banho-maria. A gelatinização foi alcançada após aproximadamente 30 minutos, com uma temperatura em torno de 60-65°C tomando-se o cuidado de esta não ultrapassar os 75°C onde ocorre a hidrólise do amido²⁷; (5) pesaram-se os demais nutrientes (conforme apresentado na Tabela 1), os quais foram acrescentados ao produto gelatinizado após resfriamento; (6) misturaram-se todos os componentes até formar uma massa homogênea; (7) enrolou-se a mistura para ser posteriormente cortada em formato de “pellets”; e, por fim, (8) levou-se o produto final à estufa (40°C) por 24 h.

2.3.2 Dietas com Macronutrientes Isolados

Da mesma forma, o estudo do consumo de macronutrientes isolados foi feito após terem sido obtidas três elaborações para ofertar carboidratos, proteínas ou lipídeos nas dietas seletivas (Tabela 1). As três formulações foram baseadas na dieta AIN-93M adaptada, como descrito a seguir.

2.3.2.1 Preparação das Dietas com Macronutrientes Isolados

2.3.2.1.1 Dieta preferentemente com Carboidrato

A preparação da dieta isolada em carboidrato foi feita da seguinte maneira: (1) pesou-se o amido de milho (781,4g) e a sacarose (100g); (2) acrescentou-se 400 ml de água destilada; (3) misturou-se o amido de milho, a sacarose e a água destilada até que formassem um líquido sem grumos; e (4) gelatinizou-se a mistura em banho-maria. A gelatinização foi alcançada após aproximadamente 30 minutos, com uma temperatura em torno de 60-65°C tomando-se o cuidado de novamente não ultrapassar os 75°C; (5) pesaram-se os demais nutrientes (vide Tabela 1) e misturaram-se esses ao produto gelatinizado após resfriamento, conforme procedimento descrito acima; (6) mesclaram-se os componentes até formar uma massa homogênea; (7) moldou-se o produto final para ser cortado em formato de “pellets”; e, (8) levou-se à estufa (40°C) por 24 h e armazenou-se o produto final até o momento da utilização.

2.3.2.1.2 Dieta preferentemente com Proteína

A preparação da dieta isolada contendo proteína foi feita da seguinte maneira: (1) pesou-se a caseína (879,6g) e a carboximetilcelulose (20g); (2) acrescentou-se 550 ml de água destilada até formar uma pasta; (3) foram pesados os demais nutrientes (vide Tabela 1), os quais foram adicionados à pasta de caseína; (4) misturou-se até formar uma massa homogênea; (5) enrolou-se a massa para ser cortada em formato de “pellets”; e, (6) levou-se à estufa (40°C) por 24 h e armazenou-se o produto final até o momento da utilização.

2.3.2.1.3 Dieta preferentemente com Lipídeo

A preparação da dieta isolada em lipídeo foi feita da seguinte maneira: (1) pesou-se a gordura vegetal hidrogenada (793,9g); (2) derreteu-se a gordura em banho-maria; (3)

pesaram-se os demais nutrientes (vide Tabela 1), os quais foram acrescentados ao óleo resultante do derretimento; (4) misturou-se até formar uma massa homogênea; (5) deixou-se na geladeira (5-10 min) até que se obtivesse uma consistência pastosa; (6) moldou-se o formato do produto final para que pudesse ser cortado em formato de “pellets”; e, (7) armazenou-se o produto final sob refrigeração à temperatura de 4°C até o momento de sua utilização.

Em todas as dietas, formavam sua composição final sais minerais e vitaminas para manter correta alimentação dos animais.

2.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A seqüência metodológica experimental está representada na Figura 1 e descrita a seguir. Os animais tiveram livre acesso à água durante todo o procedimento experimental e a avaliação de consumo alimentar foi realizada subtraindo-se o peso das sobras das dietas recolhidas diariamente das gaiolas metabólicas do peso da ração ofertada.

Após terem sido pesados e colocados nas gaiolas metabólicas, os animais tiveram do dia experimental 1 até o dia 4 livre acesso à dieta AIN-93M adaptada distribuída igualmente em três comedouros dentro da gaiola. Este período correspondeu a tempo suficiente de adaptação dos animais ao novo ambiente experimental, como avaliado visualmente pelo aspecto geral de saúde dos ratos e seu ganho de peso progressivo. Diariamente foram feitas inspeções para avaliar as condições físicas dos animais e foram feitas reposições das dietas. No final deste período (dia 4), as dietas e os animais foram pesados, identificando-se o consumo alimentar total e a variação do peso corporal, respectivamente. Neste momento, as gaiolas e os comedouros foram limpos e os animais passaram a ter acesso às formulações com

macronutrientes isoladas *ad libitum*, distribuídas uma a uma, em cada um dos três comedouros no interior da gaiola, caracterizando-se assim o paradigma de seleção de macronutrientes da dieta (Tabela 1). Este procedimento teve a duração do dia experimental 5 até o dia 16. Igualmente, os animais foram inspecionados diariamente para averiguar seu bem-estar físico. Neste período as reposições das formulações isoladas e a medição do consumo foram feitos dia-a-dia para que se tivesse avaliação do quanto o animal se alimentou. Adicionalmente, para evitar aprendizado relacionado com a localização espacial de cada recipiente contendo uma das três dietas disponíveis, a posição das dietas na gaiola do animal que estava sendo testado foi alternada diariamente de forma aleatória.

Às 8 h dos dias 9 e 10, bem como nos dias 14 e 15, as formulações isoladas foram retiradas das gaiolas metabólicas, separadas de acordo com a respectiva composição e pesadas, permanecendo os animais em privação alimentar durante 8 horas, voltando a receber a dieta às 16 h. Este procedimento foi empregado para que se testasse a possibilidade de induzir maior consumo alimentar nos ratos ao final do período de jejum. Após o período de jejum, os animais foram pesados e tiveram novamente acesso irrestrito às formulações dietéticas até às 8 h do dia seguinte. Já no dia 16, o procedimento de privação alimentar foi repetido, porém o consumo dos animais foi avaliado por um período de 2 h e, após esta análise, foram feitas as medidas de glicemia e insulinemia. Para tanto, os animais foram retirados de suas gaiolas metabólicas, pesados e, subseqüentemente, anestesiados com cetamina (Dopalen®, Vetbrands, SP, Brasil; 80 mg/kg) e xilasina (Anasedan®, Vetbrands, SP, Brasil; 10 mg/kg) para coleta de sangue por punção cardíaca. Foram coletados 3 mL de sangue (centrifugado em 2000 RPM durante 10 minutos) em tubos heparinizados (heparina sódica 5000UI/ml Cristália, SP, Brasil) e, após a separação do plasma, dividido em amostras armazenadas em freezer à temperatura de -20°C até o dia de mensuração. A glicemia foi determinada pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase, utilizando-se um

“Multi-test Analyzer” (LabMax, Labtest, MG, Brasil) com “kit” específico para tanto (número de catálogo: 84) e a insulinemia foi avaliada por estudo radioimunológico (INSULIN[®], Adaltis, Itália) com sensibilidade de 1 μ UI/mL e coeficiente de variação “intra-análises” menor do que 7%.

Em um grupo à parte (n = 9) submetido às mesmas condições experimentais até esta etapa, fez-se as medidas bioquímicas de insulinemia e glicemia no dia experimental 10, em duas condições: após 8 h de jejum sem receber alimentação (n = 5) ou após 8 h de jejum mais 2 h de livre acesso às dietas de seleção de macronutrientes (n = 4).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados de forma qualitativa e, quando quantitativa, com média \pm erro padrão da média (EPM). Comentários ao longo do texto serão feitos para auxiliar na compreensão de cada etapa experimental.

Nos dias iniciais (1 a 4), todos os animais consumiram dieta AIN-93M adaptada que estava distribuída nos 3 comedouros dentro da gaiola e fizeram-no de forma muito similar entre si, sem disparidades comportamentais. Ou seja, em média para o período avaliado, os animais consumiram cerca de $17,8 \pm 1,1$ g/dia e o ganho de peso corporal foi de $9,4 \pm 3,3$ g no período de 4 dias testados. Estes resultados demonstraram que todos os animais consumiram a dieta AIN-93M adaptada quando colocados isoladamente em gaiolas metabólicas. A formulação e o aspecto físico adquirido com a CMC e a gelatinização do amido entre 60-65°C com posterior secagem à 40°C por 24 h em estufa pareceu de fato fornecer à dieta AIN-93M características organolépticas aceitáveis aos animais. Como todos os ratos estudados traduziram em ganho de peso seu consumo alimentar, essa é uma primeira indicação de que

os ratos se adaptaram bem ao novo ambiente experimental. De fato, o período de tempo de 3-4 dias parece ser adequado à adaptação de ratos a condições estressantes ou a diferentes manipulações experimentais²⁸, mesmo em testes comportamentais complexos²⁹, desde que mantidas as condições de luminosidade e criação em biotério básicas e sem alterações drásticas.

Do dia 5 ao dia 8, os animais receberam formulações com macronutrientes isolados *ad libitum*, distribuídas uma a uma em cada um dos três comedouros no interior da gaiola e consumiram aproximadamente $18,8 \pm 2,0$ g/dia, distribuídos em valores médios de cerca de 45-75% de carboidrato, 22-49% de proteína e 2-9% de lipídeo. Neste período de 4 dias, o ganho de peso dos animais foi de $18,5 \pm 1,9$ g. Por este resultado, a introdução de nova dieta não prejudicou o consumo dos animais, demonstrando uma franca aceitação e ingestão das formulações de macronutrientes isolados com seus respectivos aspectos físicos. Outro ponto importante é que, adaptados ao paradigma de seleção de nutrientes, animais que consomem pelo menos 10% do valor calórico total da dieta sob a forma de proteína apresentam ganho de peso²⁸. No presente experimento, ratos Wistar machos adultos compõe sua dieta preferentemente com carboidratos. Ou seja, na avaliação da ingestão nos 4 dias iniciais de consumo *ad libitum*, os animais demonstraram uma ingestão calórica com uma distribuição percentual maior para carboidrato, seguido de proteína e lipídeo. O padrão de preferência maior para carboidrato demonstrado por estes animais neste momento concorda e ratifica o mesmo achado observado em outro trabalho³⁰. Os resultados dos dias experimentais 11, 12 e 13 são coincidentes com esses acima mencionados e não foram afetados por um período de dois dias de jejum (9 e 10, como relatado abaixo) intercalados entre os períodos de acesso livre, durante as 24 h do dia, às dietas com macronutrientes isolados.

Quando submetidos a períodos de privação alimentar por 8 h (dias 9, 10, 14 e 15) com subsequente acesso livre às dietas, os animais apresentaram consumo médio de

aproximadamente $23,1 \pm 1,4$ g/dia (sendo 51-83% de carboidrato, 13-43% de proteína e 0,5-12% de lipídeo) nos dias 9 e 10 e cerca de $21,9 \pm 0,8$ g/dia (sendo 49-88% de carboidrato, 11-42% de proteína e 1-11% de lipídeo) nos dias 14 e 15. A privação alimentar utilizadas nestes dois momentos experimentais e após o período de adaptação à gaiola e à seleção de nutrientes, a qual foi feita com a finalidade de aumentar o consumo dos animais no final do período de jejum (visando a realização de experimentos durante o ciclo claro, onde o menor consumo é notado; sem, no entanto, alterar a preferência de consumo) gerou resposta muito similar em todos os animais estudados. Embora o consumo de alimentos possa ser maior durante o período escuro do dia para os ratos, o horário de estudo (às 16 h, período claro do ciclo claro/escuro) ofereceu a possibilidade de avaliar o consumo alimentar, sem incorrer em dois problemas metodológicos: o efeito do “chão”, ou seja, dos menores valores serem obtidos e abaixo do que não seria possível encontrar resultados; e, o efeito do “teto”, que significa que o consumo poderia já ser tão elevado que qualquer manipulação experimental não poderia ser capaz de gerar resultados superiores ao que normalmente já estariam ocorrendo no momento. Além disso, os ratos, quando submetidos à dieta de seleção de macronutrientes, parecem manter seu padrão preferencial de consumo ao longo das 24 h, consumindo na fase clara não a mesma quantidade, mas sim a mesma proporção de macronutrientes ingeridos no ciclo escuro³¹.

No dia 16, os animais receberam as formulações com macronutrientes isoladas *ad libitum* por 2 h após terem permanecido em jejum por um período de 8 horas. O consumo total médio neste período foi de aproximadamente $3,6 \pm 0,7$ g de comida, distribuídos em valores médios de cerca de 54-100% de carboidrato, 0-14% de proteína e 0-45% de lipídeo. No período pós-prandial (após as 2 h de consumo alimentar) apresentaram valores de glicemia de $391,5 \pm 31,9$ mg/dL e de insulina plasmática de $28,3 \pm 5,3$ μ UI/mL. No grupo testado em paralelo no dia 10 para que se tivesse valores controle, os animais avaliados ao final do

período de privação alimentar apresentaram valores médios de glicemia de $388,2 \pm 109,2$ mg/dL e de insulina plasmática de $24,6 \pm 3,7$ μ UI/mL, enquanto os que tiveram livre acesso as dietas por 2 h após jejum de 8 h, apresentaram glicemia de $332,5 \pm 66,2$ mg/dL e de insulinemia de $23,5 \pm 4,8$ μ UI/mL. Esses dados sugerem que a glicemia é mais variável nos animais submetidos ao jejum, o que provavelmente representa as tentativas homeostáticas de manutenção dos valores normais em circulação. A insulinemia neste caso acompanha o valor da glicemia. Já os resultados após ingestão alimentar podem ter um viés ao não considerar o momento no qual o animal ingeriu alimentos e quando foi feita a dosagem plasmática de glicose e insulina, ou seja, animais que comeram nos primeiros minutos após receberem a dieta e que não fizeram isso subsequente durante o tempo teste podem ter valores menores em circulação do que aqueles que se mantiveram ingerindo as diferentes dietas. Não obstante, tanto os valores de jejum quanto os pós-prandiais (em ambos os dias 10 e 16) estão dentro dos valores normais de glicemia e insulinemia relatados por Wetzler e colaboradores³². Esses autores demonstraram hiperinsulinemia em ratos Wistar machos que receberam dieta de seleção de macronutrientes com 37% de sacarose na dieta rica em carboidrato (do desmame à décima terceira semana de idade) e em grupo controle recebendo ração padrão para animais de laboratório acrescida de 10% de sacarose. Isso poderia demonstrar também que o tipo de macronutriente escolhido como fonte principal em modelos de dietas de seleção de macronutrientes tem papel determinante não só na escolha da dieta a ser ingerida preferentemente, mas também na manutenção da glicemia e do nível plasmático de insulina dentro de parâmetros fisiológicos normais.

Com os pesos corporais avaliados no último dia experimental e comparando-os com os demais obtidos anteriormente, observa-se que os ratos aumentaram de peso ao longo de todo período experimental, em média $47,4 \pm 4,9$ g (Figura 4), demonstrando que se manteve adequada a adaptação às dietas e sua variação de oferta e ao ambiente experimental.

Embora não seja completamente inédito em todas as suas etapas, o presente modelo detalha um protocolo experimental que, em conjunto, apresenta cuidados que se devem tomar e um esquema experimental que permite o estudo do comportamento alimentar de animais submetidos à dieta completa ou seletiva de macronutrientes, podendo ser adaptado para o tipo de experimento que se deseja realizar.

4 CONCLUSÃO

O modelo proposto permite boa aceitação à dieta AIN-93M adaptada, o estudo do padrão de consumo alimentar de ratos expostos ao paradigma de seleção de macronutrientes demonstra aceitação das formulações isoladas em carboidrato, proteína e lipídeo, e ganho de peso gradativo como regra para os animais aqui estudados. Com isso, a presente descrição metodológica procura sugerir uma abordagem adicional e complementar às existentes para utilização em vários tipos de experimentos como, por exemplo, os que busquem elucidar a base neural da gênese e controle do comportamento alimentar em ratos e de seus mecanismos de modulação mediadas por áreas do sistema nervoso central e por estímulos periféricos.

5 REFERÊNCIAS

1. Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. The hormonal control of food intake. *Cell*. 2007; 129(2): 251-62.
2. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006; 443 (7109): 289-95.
3. López M, Tovar S, Vázquez MJ, Williams LM, Diéguez C. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc*. 2007; 66(1): 131-55.
4. Rollins BL, King BM. Amygdala-lesion obesity: what is the role of the various amygdaloid nuclei? *Am J Physiol*. 2000; 279(4): R1348-56.
5. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hökfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(25): 15043-8.
6. 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(6): 1375-85.
7. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000; 404 (6778): 661-71.
8. Berthoud HR. Multiple neuronal systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002; 26:393-428.

9. King BM, Rossiter KN, Stines SG, Zaharan GM, Cook JT, Humphries MD, York DA. Amygdaloid-lesion hyperphagia: impaired response to caloric challenges and altered macronutrient selection. *Am J Physiol*. 1998; 275: R485-93.
10. Bugarith K, Dinh TT, Li AJ, Speth RC, Ritter S. Basomedial hypothalamic injections of neuropeptide Y conjugated to saporin selectively disrupt hypothalamic controls of food intake. *Endocrinology*. 2005; 146(3): 1179-91.
11. Shimbara T, Mondal MS, Kawagoe T, Toshinai K, Koda S, Yamaguchi H, *et al.* M. Central administration of ghrelin preferentially enhances fat ingestion. *Neurosci Lett*. 2004; 369(1): 75-9.
12. Tempel DL, Leibowitz KJ, Leibowitz SF. Effects of PVN galanin on macronutrient selection. *Peptides*. 1988; 9(2): 309-14.
13. Primeaux SD, York DA, Bray GA. Neuropeptide Y administration into the amygdala alters high fat food intake. *Peptides*. 2006; 27(7): 1644-51.
14. Wang J, Dourmashkin JT, Yun R, Leibowitz SF. Rapid changes in hypothalamic neuropeptide Y produced by carbohydrate-rich meals that enhance corticosterone and glucose levels. *Brain Res*. 1999; 848(1-2): 124-36.
15. Kanarek RB. Determinants of dietary self-selection in experimental animals. *Am J Clin Nutr*. 1985; 42(5 Suppl): 940-50.
16. . Miller GD, Hrupka BJ, Gietzen DW, Rogers QR, Stern JS. Rats on a macronutrient self-selection diet eat most meals from a single food cup. *Appetite*. 1994; 23(1): 67-78.
17. Kratz CM, Levitsky DA. Dietary obesity: differential effects with self-selection and composite diet feeding techniques. *Physiol Behav*. 1979; 22(2): 245-9.

18. Gerardo-Gettens T, Miller GD, Horwitz BA, McDonald RB, Brownell KD, Greenwood MR, *et al.* Exercise decreases fat selection in female rats during weight cycling. *Am J Physiol.* 1991; 260: R518-24.
19. Richter CP, Schmidt ECH Jr, Malone PD. Further observations on the self-regulatory dietary selections of rats made diabetic by pancreatectomy. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1945; 76: 192-219.
20. Lat J. Self-selection of dietary components. In: Code CF. ed. *Handbook of physiology*, sect 6: Alimentary canal. v 1. Washington: American Physiological Society. 1967: 367-86.
21. Scott EM, Quint E. Self-selection of diet. IV. Appetite for protein. *J Nutr.* 1946; 32: 397-406.
22. Tribe DE. Choice of diet by rats. 4. The choice of purified food constituents during growth, pregnancy and lactation. *Br J Nutr.* 1955; 9: 103-9.
23. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123(11): 1939-51.
24. Ordoñez JA. *Tecnologia de Alimentos v 1: Componentes dos Alimentos e Processos.* Porto Alegre: Artmed, 2005.
25. Vissia GHP; Beynen AC. Influence of dietary carboxymethylcellulose on the apparent absorption of calcium, magnesium and phosphorus in rats. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 1999; 82 (4): 137-141.

26. Vissia Ghp, Beynen Ac. Inhibitory effect of dietary carboxymethylcellulose on fat digestibility in rats fed diets containing either starch or glucose. *Anim Feed Sci Technol.* 2000; 85 (1-2): 139-144.
27. Souza RCR, Andrade CT. Investigation of cornstarch gelatinization and extrusion processes. *Polímeros.* 2000; 10(1): 24-30.
28. de Castilhos J, Marcuzzo S, Forti CD, Frey RM, Stein D, Achaval M, *et al.* Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. *Brain Res Bull.* 2006; 69(2):131-9.
29. Smith BK, York DA, Bray GA. Effects of dietary preference and galanin administration in the paraventricular or amygdaloid nucleus on diet self-selection. *Brain Res Bull.* 1996; 39(3): 149-54.
30. Lax P, Larue-Achagiotis C, Martel P, Madrid JA, Verger P. Repeated short-fasting modifies the macronutrient self-selection pattern in rats. *Physiol Behav.* 1998; 65(1): 69-76.
31. Shor-Posner G, Ian C, Brennan G, Cohn T, Moy H, Ning A, *et al.* Self-selection albino rats exhibit differential preferences for pure macronutrient diets: characterization of three subpopulations. *Physiol Behav,* 1991; 50: 1187-1195.
32. Wetzler S, Tomé CJD, Achagiotis L. A carbohydrate diet rich in sucrose increased insulin and WAT in macronutrient self-selection rats. *Physiol Behav,* 2003; 79: 695-700.
33. Thibault L, Booth DA. Macronutrient-specific dietary selection in rodents and its neural bases. *Neurosci Biobehav Rev,* 1999; 23: 457-528.

TABELA 1. Componentes nutricionais de cada dieta empregada para estudo do comportamento alimentar de ratos.

	AIN-93M ADAPTADA	DIETA A BASE DE CARBOIDRATO	DIETA A BASE DE PROTEÍNA	DIETA A BASE DE LIPÍDEO
NUTRIENTES*				
AMIDO	609,6	781,4		
AÇÚCAR	100	100		
CASEÍNA	140		879,6	
L-CISTINA	1,8		1,8	
GORDURA VEGETAL HIDROGENADA	20			793,9
ÓLEO DE SOJA	20			40
VITAMINAS**	12,5	12,5	12,5	25
MINERAIS**	35	35	35	70
CELULOSE	50	50	50	50
CMC	10	20	20	20
CORANTE	1,0	1,0	1,0	1,0
ÁCIDO CÍTRICO	0,1	0,1	0,1	0,1

*Nutrientes para 1Kg de dieta.

**Mistura de Vitaminas e Minerais contém 97,47% e 21% de celulose respectivamente, conforme AIN-93.

FIGURA 1. Esquema experimental representando o procedimento experimental para estudo do comportamento alimentar de ratos. Os números representam os dias contínuos em que cada animal esteve submetido à dieta AIN-93M adaptada (dias 1-4), dieta de seleção de macronutrientes (dias 5-8 e 11-13) e dieta de seleção de macronutrientes com ingestão alimentar induzida por jejum de 8h (nos dias 9-10, 14-15 e 16).

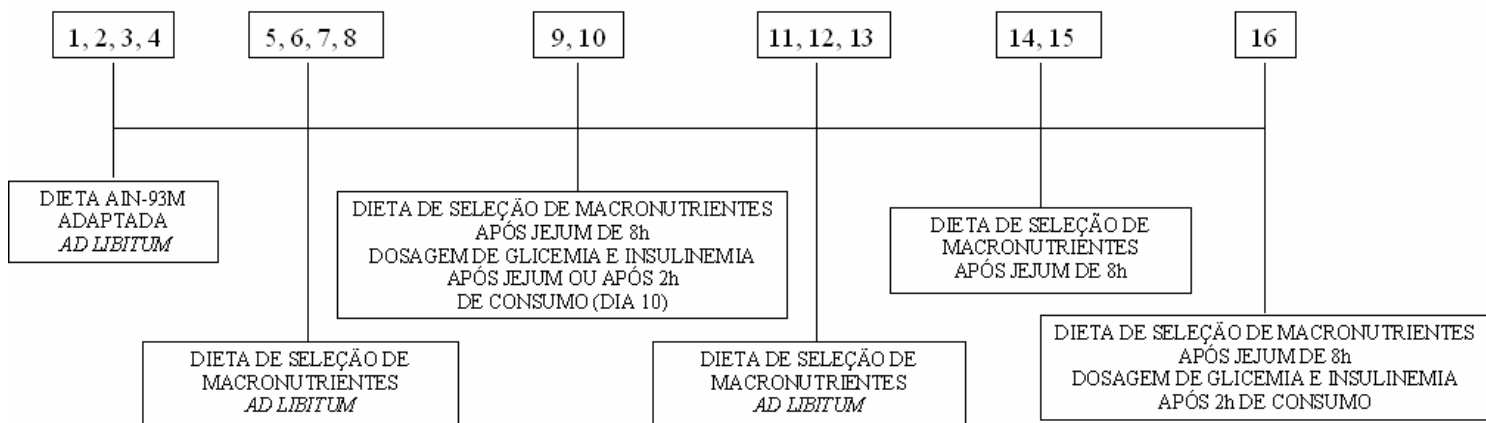
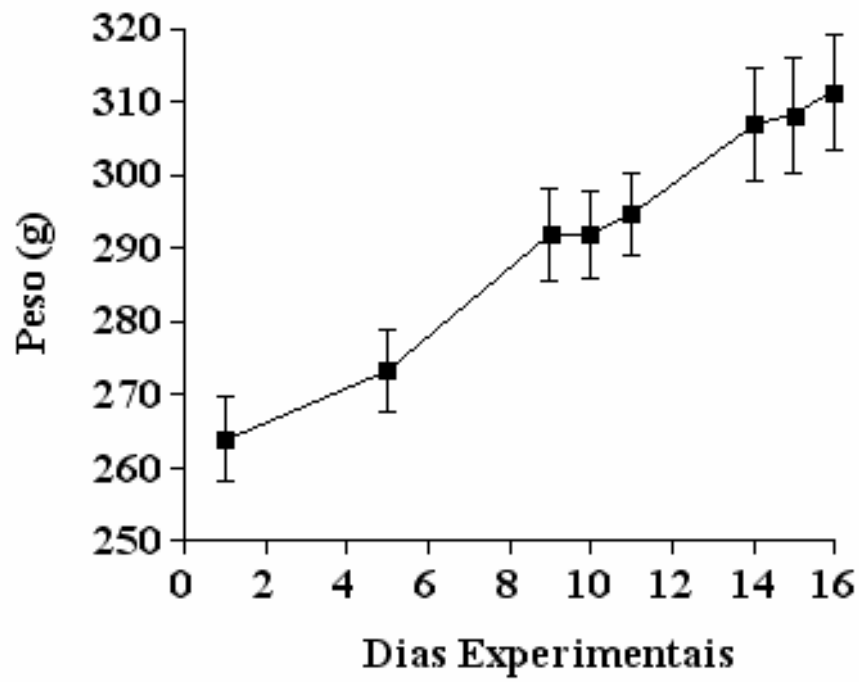


FIGURA 2. Fotografia ilustrando o modelo de gaiola metabólica empregado no presente estudo para estudo do comportamento alimentar de ratos. Neste caso, três recipientes colocados na parte interna da gaiola tinham em seu interior cada uma das três dietas com macronutrientes isolados (carboidrato, lipídeo e proteína).



FIGURA 3. Evolução do peso corporal dos ratos (g) ao longo de todo procedimento experimental (16 dias). Os valores estão expressos em média \pm EPM (N = 10).



6 ARTIGO EM INGLÊS

Glutamate microinjection into the posterodorsal medial amygdala motivates the consumption of a macronutrient self-selection diet in male rats

Carolina Böettge Rosa¹, Jeferson Goularte², Nathália Trindade², Alexandre P. de Oliveira², Liane Rotta², and Alberto A. Rasia-Filho^{1,2*}

¹Postgraduation in Pathology (Clinic and Experimental Neuroscience Research Program), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, R. Sarmiento Leite 245, Porto Alegre 90170-050 RS, Brazil

²Departament of Physiological Sciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, R. Sarmiento Leite 245, Porto Alegre 90170-050 RS, Brazil

*Correspondence to: A.A. Rasia-Filho, UFCSPA, R. Sarmiento Leite 245, Porto Alegre 90170-050 RS, Brazil. (E-mail address: rasiafilho@pq.cnpq.br).

Abstract

Previous studies have involved the rat “posterodorsal” amygdala with the control of food intake and occurrence of obesity. The posterodorsal medial amygdala (MePD) has connections with hypothalamic nuclei that modulate feeding behavior and energy balance. The objectives of the present study were to describe the effect of glutamate microinjected in the MePD of adult male rats on the consumption of a 3-choice macronutrient self-selection selective diet (high-carbohydrate, high-protein or high-lipid) and on postprandial glycemia and insulinemia (after 2 h of food intake that followed a period of 8 hours of fasting). Within group and between groups control comparisons were done. The experimental design involved 16 consecutive days to allow animal adaptation to the new experimental condition (microinjection occurred only in the last day) and body weight was controlled along all the experimental period. Rats normally preferred the high-carbohydrate diet when freely feeding or after food deprivation and showed a constant body weight gain. A single microinjection of glutamate (45 nM/0.3 μ L, n = 8) in the right MePD led to a higher percentage of animals consuming the high-carbohydrate diet compared to the physiological solution microinjected control group (0.3 μ L, n = 7; $p < 0.01$). A within group comparison also showed that glutamate induced a higher consumption of the high-carbohydrate diet compared to pre-surgery control values ($p < 0.05$). Present results revealed another role for the male rat MePD and add new data to the functional concept that this subnucleus can be involved with the neural pathways that rather direct goal-oriented feeding behavior than hunger or polyphagia.

Running title: MePD and feeding behavior

Key words: extended amygdala, feeding behavior, neural control of appetite, carbohydrate diet, body weight.

THE MEDIAL NUCLEUS OF THE AMYGDALA (MeA) is a heterogeneous component of the extended amygdala in the rat forebrain (3,17), also considered to be or a ventral continuation of the striatum (63) or an area where the morphology and the intrinsic physiological properties of its neurons resemble pyramidal cells as found in the mice piriform cortex (6). Based on cytoarchitectural, hodological and functional criteria, the MeA was divided in four subregions: the anterodorsal (MeAD), the anteroventral (MeAV), the posterodorsal (MePD), and the posteroventral ones (MePV; 8,17,46). Several experimental evidences demonstrated that these subnuclei, or even restricted parts within them, are involved with the interpretation of olfactory/vomeronasal and somatosensorial afferent information (6,39,41,49) as well as with a relevant role in the modulation of social/agonistic behaviors, such as the sexual, maternal and aggressive ones (12,16,41,52,58) or in emotional responses and mnemonic/cognitive processes for conditioned behaviors (2,20,56).

A series of experiments conducted by King and colleagues indicated the importance of the “posterodorsal region” of the amygdala for feeding behavior - “posterodorsal region” refers to an area, not a specific nucleus, and involved different amygdaloid components, such as the MePD, the stria terminalis (ST) and the bed nucleus of the ST (BNST; 24,32-34; see detailed descriptions of the involved areas in 32,54). Based on these reports, bilateral electrolytic lesions of this posterodorsal aspect of the amygdala led Long-Evans adult female rats to display hyperphagia and an abnormal increase in body weight (i.e., weight gains of 20-30 g in the first 3-5 days or 50-80 g in the first 15-20 post-lesion days; 31,54) and a marked preference for carbohydrates (32,34). Hyperinsulinemia was also described in these experimental rats compared to sham operated ones; although, while the statistical analysis revealed a main effect of the lesion, there were no difference in the interaction between lesion and feeding conditions (food restricted or food *ad libitum*) on plasma insulin levels of cycling females (31). Unilateral lesion to the “posterodorsal amygdaloid region” led to the same

findings of hyperphagia and excessive weight gain after short term, at the same time that anterograde degeneration appeared in the ipsilateral ventromedial nucleus in the hypothalamus (VMH; 24,54), an integrated area for the central control of food intake and energy balance (4). Damage limited to the MePD and the intra-amygdaloid BNST or more restricted ST lesions also promoted an increased in weight gain (54,55). Altogether, these data suggest that, probably using the ST as its efferent pathway, one or more than one of the distinct components of the amygdaloid “posterodorsal region” can functionally integrate hypothalamic circuits to respond to feeding stimuli and for eliciting and/or regulating feeding behavior and body weight in females (24).

The specific role of the MePD on feeding behavior, on macronutrient self-selection diet consumption, on glycemia and insulinmia represent an interesting field for further investigation. Interestingly, from the pontine parabrachial nucleus, taste and visceral sensory information can reach the MeA (4,35). Afferent excitatory pathways use glutamate as neurotransmitter and reach the MePD (6) to code for primary or multimodal sensory information that would be relevant for the emission/modulation of feeding behavior (4,38). Similar to gustatory information, olfactory inputs can generate representations of food environment, its emotional valence and memory for the condition experienced (5). A projection pathway leaves the MePD via the ST to reach the VMH, the anteroventral periventricular nucleus (AVPV), and the ventral premammillary nucleus (PMV) in the hypothalamus (8,19,41,46,59). Part of the hypothalamic connections of the MePD is relayed by components of the BNST (19). These hypothalamic nuclei and the preoptic area, which sends inputs to the MePD, were described as having a considerable role on food intake and energy balance in rats (5,27). In addition, the MePD innervation to the subiculum could be involved in prioritizing the temporal organization of motivated behaviors (46), whereas other projections to the entorhinal area and to the postpiriform transition area would represent an

alternative route for sensorial influences to affect hippocampal plastic mechanisms underlying mnemonic events (1,5,28,46). Finally, the MePD cells express some chemical transmitters previously involved with feeding behavior, such as cholecystokinin (59), urocortin 3 (10), and melanin-concentrating hormone fibers (AARF, personal observation, from results belonging to Drs. J. Bittencourt and L.V. Sita, University of São Paulo, Brazil), for example.

Therefore, the aims of the present study were to describe the effects of unilateral glutamate microinjection in the MePD of male rats on the consumption of a 3-choice macronutrient self-selection isolated diet (high-carbohydrate, high-protein and high-lipid) and on postprandial glycemia and insulinemia. Within group and between groups control comparisons were done. Body weight was controlled along all the experimental procedure period. Because it is likely that this subnucleus integrates pathways relevant for the modulation of hunger/appetite or food satiety, our initial working hypotheses included two alternative possibilities: (a) excitation of MePD neurons caused by glutamate would increase food consumption by involving facilitatory pathways directed to hypothalamic nuclei that control feeding behavior; (b) excitation of MePD neurons caused by glutamate would enhance output inhibitory pathways and decrease food consumption, which would be linked with those findings that electrolytic lesions involving the MePD and adjacencies lead to increased feeding displays (24,54).

METHODS

Animals

The animals were male Wistar rats (3 months-old), 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 12h light/dark cycle (lights on at 6 a.m.). Males were rather used to avoid variations in the results that might be due to different levels of sex steroids in circulation of females across the estrous cycle (additional comments in 27). All efforts were made to minimize the number of animals studied and their suffering. In addition, 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).

Procedures

Food intake of a full nutrient diet. Food intake of a self-selection macronutrient diet in freely feeding and in food-deprived rats. A diagram of the complete experimental design is shown in Figure 1, which was based on a series of pilot studies (data not shown). The first day correspond to the placement of each rat in an individual metabolic cage (21 x 24 x 21 cm of length, size and height, respectively). The initial period of 4 days was allowed for acclimatization of the animal to the new environment, during which it was offered a free access to a pellet full nutrient diet (based on the AIN-93M, according to 53; Table 1). Water was available along all the experimental days. Food intake (evaluated as the difference between the final and the initial weights of the available food) and body weight were measured daily, providing mean data of the former and increasing values of the latter along all the experimental period. Spillage was collected on paper towels and subtracted from food consumption to correct the values obtained. In the next 4 days (experimental days 5-8), rats were switched to a freely feeding 3-choice self-selection macronutrient isolated diet (high-carbohydrate, high-protein, or high-lipid compositions in pellets, as shown in Table 1). Each macronutrient was supplemented equally with the needed vitamins and minerals. This diet

was offered in 3 separate dishes and from these experimental days onwards. The location of each dish inside the cage was changed daily to avoid biases resulting from conditioned place preferences for a specific diet. On days 9 and 10, animals were deprived of food for 8 hours (from 8 a.m. to 4 p.m.) and then allowed to eat the macronutrient isolated diet until the next day, when the same procedure was repeated. This period of fasting was established in a pilot study to stimulate food consumption of rats in a period of the day (lights on) when their feeding behavior is not at most. On the tenth day, the self-selection food intake during the first 2 hours after food deprivation (divided as subsequent measures at 30, 60, and 120 minutes) was evaluated and served as the “within group” control recording to test the effects of the microinjections in the MePD.

Stereotaxic procedure. On day 11 (beginning around 8 a.m.), males were anesthetized with ketamine and xylazine (90 and 10 mg/kg, i.m., respectively) and stereotaxically implanted with a unilateral cannula (0.6 mm OD) aiming 2 mm above the right MePD. The right MePD was chosen based on previous data that showed that unilateral manipulations were effective to alter food intake (24) and other behavioral occurrences (2,16). The upper incisor bar was positioned horizontally with the interaural line and the adapted stereotaxic coordinates employed were: 3.2 mm posterior to the bregma, 3.5 mm lateral to the midsagittal suture, and 5.7 mm below the dura-mater (45). On postoperative recovery days 12 and 13, animals had free access to the isolated macronutrient diet and displayed apparent normal activities. On day 14 and 15, rats were again submitted to food deprivation for 8 hours (from 8 a.m. to 4 p.m.), removed from its cage and gently manipulated to simulate the microinjection procedure (described below), returned to the metabolic cage, and then allowed to eat the macronutrient isolated diet until the next day.

Microinjection procedure and diet intake recordings following it. On the last experimental day - i.e, the 16th one -, rats were deprived of food for 8 hours and immediately following it a microinjection needle (0.3 mm OD) was introduced into and 2 mm below the guide cannula. Rats were randomly assigned to receive one of the following substances into the MePD: sterile physiological solution (PS; 0.3 μ L, $n = 7$) or glutamate (Sigma Chemicals Co., USA; 45 nM diluted in 0.3 μ L of PS, $n = 8$). This specific volume of PS and the doses of glutamate was based on published results (16,30) and is close to the physiological values obtained by brain microdialysis in the amygdaloid nuclei (21,25,36,66). The precise value for the physiological extracellular glutamate concentration specifically in the rat MePD is not currently known. The displacement of liquid and an air bubble inside the catheter connecting a 1- μ L Hamilton microsyringe (USA) to the intracerebral cannula was used to monitor the microinjection. The microinjection lasted for 1 minute and the needle remained inside the cannula for an additional minute to avoid reflux. Microinjections into the MePD were done while gently restraining the rat, a procedure that was closely monitored to ensure that any animal in the studied groups was experiencing undue stress or discomfort. Afterwards, the rat was introduced into its metabolic cage and had access to the macronutrient diet. Evaluations of consumption of each diet were made at 30, 60 and 120 minutes following microinjection. Total values of food consumption represent the sum of these records.

Glycemia and insulinmia measurements. Soon after the end of experiment, animals were rapidly anesthetized as aforementioned and blood samples were obtained by cardiac puncture (3.0 mL) with a heparinized needle. Blood was put on heparinized vials and promptly centrifugated (2000 rpm during 10 min). Plasma samples were frozen at -20°C until processing for the measurement of postprandial glycemia and insulinmia. Glucose was

measured with the glucose oxidase method using the “Multi-Test Analyzer” kit (LabMax, Brazil) and insulin by a radioimmunoassay test (Insulin^R kit, Adaltis, Italy) with sensitivity of 1 μ IU/mL and intra-assay coefficients of variation ranging from below 7%.

Histological procedure. Rats were then transcardially perfused with saline and 10% formalin solution. Brains were removed, sectioned 60 μ m-thick in a vibratome (Leica, Germany) and stained with hematoxylin-eosin. Comparisons with the images provided by an atlas of the rat brain (45) served to determine the location of the cannula and the needle in the brain. The MePD was recognized by its ventral location to the ST and lateral position to the optic tract (opt) in the rat forebrain. Only those rats that had the microinjections directed to the MePD were considered for further analysis of their data (Figure 2). Results obtained from misplaced microinjections, from brains with signals of intraparenchymatous hemorrhage or that showed evident mechanical lesions of the MePD or the ST were discharged from the final data of the experimental groups. The diffusion rate of microinjected substances into the MePD were not directly evaluated in present study. Nevertheless, animals in which the cannula was placed in the vicinity of the MePD composed an additional “non-target” group to control for the spread of the substances and their effects in adjacent amygdaloid nuclei, caudate/putamen or opt. No relevant contribution for the comprehension of the present results was obtained in these animals with heterogeneous microinjection sites (data not shown).

Statistical Analysis

Data will be reported either descriptively and commented qualitatively or, when appropriate, quantitatively (as mean \pm standard error mean) with statistical results. An one-

way analysis of variance (ANOVA) test followed by the Dunnett multiple comparisons test was used to analyze the results on body weight along the first day (taken as the reference value) and on subsequent experimental days 5, 8, 10, and 16 in the two tested groups (microinjected with PS or with glutamate in the MePD). These days were considered relevant for the rat adaptation to the employed animal model. Data obtained was carefully analyzed to ensure the experimental design and for having animals acclimatized with the conditions of the final microinjection test period, also providing different control results for further comparisons. Due to the number of animals not eating protein or lipid in both studied groups, these data could not be statistically compared between groups following microinjections on day 16. Otherwise, values of carbohydrate ingestion at experimental day 10 (pre-operative period, to serve as a “within group” control) and at day 16 (following MePD microinjection of PS or glutamate, for a “between groups” comparison) were submitted to a multivariate ANOVA followed by the least significant difference (LSD) *post hoc* test. The proportion of rats showing eating the macronutrient diet following MePD microinjections was compared using the χ^2 test followed by the Fischer’s exact test. Postprandial glycemia and insulinemia data obtained on day 16 from animals microinjected with PS or glutamate in the MePD were submitted to an unpaired two-tailed Student “t” test. In all cases, the statistically significant level was set $p \leq 0.05$.

RESULTS

Body weight

Animals in both groups had a body weight variation along the experimental days that showed a general statistically significant difference [$F(4,34) = 7.30$, $p < 0.01$; and, $F(4,39) = 28.20$, $p < 0.01$; PS and glutamate microinjected groups, respectively]. Dunnett *post hoc* test

showed that, compared to the initial body weights of the rats, there was an expected increase in weight along the experimental period and similarly in both groups ($p < 0.05$ compared to the baseline value obtained at day 1, beginning of the experiment; Figure 3).

Diet intake along the adapting period and following MePD microinjections

Data are shown in Table 2. Animals in both groups showed a similar intake of AIN-93M diet during the first experimental days, as evidenced by mean values at day 4. When rats had free access to the self-selection macronutrient diet, all of them showed a clear preference for the high-carbohydrate diet, when compared to the other available energy sources (mean values at day 8). Following 8 h of food deprivation and 2 h of access to the 3-choice self-selection macronutrient diet, rats in both groups continue to eat more the high-carbohydrate in contrast to the other diets (mean values at day 10).

On day 16, following being deprived of food for 8 h, animals were microinjected in the MePD and, along 2 hours following it, both groups showed a very low consumption of the high-protein and the high-lipid diets. On the other hand, the high-carbohydrate diet was preferred and its consumption (total consumption in grams along 2 h of test) could be compared between groups, taking pre-surgery baseline data (taken from day 10) as control values and those obtained following microinjections in the test day. Comparison between groups showed no effect of the group microinjection condition [PS vs glutamate; $F(1,13) = 0.62$, $p = 0.44$] or period of data collection [days 10 and 16, pre-surgery and post-microinjection, respectively; $F(1,13) = 0.18$, $p = 0.68$], but a significant difference for the interaction of group vs day of data collection [$F(1,13) = 10.58$, $p < 0.01$]. The LSD *post hoc* test showed that the intake of the high-carbohydrate diet (total consumption in grams along 2 h of test) was significantly higher following microinjection of glutamate in the MePD than in

the pre-surgery control period (day 10) in this same group ($p = 0.05$), but not when compared with the PS control ($p = 0.9$).

Interestingly, on the test day 16, 4 out of 7 rats in the PS microinjected group ate the high-carbohydrate diet and consumed approximately 47% of the total meal during the first 30 minutes, 26% of the diet was consumed until 60 minutes after microinjection, and only 2 out of 7 animals ate the remaining 27% of the diet until completing the 2 hours of the testing period. On the other hand, all the 8 rats of the glutamate microinjected group ate the high-carbohydrate diet and consumed approximately 58% of the total meal during the first 30 minutes, nothing during the interval of 30 to 60 minutes after microinjection, and 6 out of 8 animals ate the remaining 42% of the diet until completing the 2 hours of the testing period. In the control record made on day 10, for example, only 2 out of 8 rats consumed the high-carbohydrate diet from 60 to 120 minutes after food resumption. Comparatively, the proportion of animals that showed a feeding behavior and high-carbohydrate diet intake during all the test period following glutamate microinjection in the MePD (8 out of 8 rats, 100%) was significantly different than that found in the PS control group (4 out of 7 rats, 57%; $p < 0.01$). At day 10, control data obtained during 2 h of the post-fasting period did not show differences in the proportions of rats that ate this diet (6 out of 7 rats, 86%; and, 7 out of 8 ones, 87%, in the future microinjected PS and glutamate groups, respectively; $p = 1.0$).

Glycemia and insulinmia

No statistical difference between groups (120 min following PS or glutamate microinjection in the MePD) was found in the analysis of postprandial plasma levels of glucose ($p = 0.14$) or insulin ($p = 0.64$; Figure 4).

DISCUSSION

Rats adapted normally to the new experimental environment, as evaluated by their progressive body weight gain and apparent general behavior. Notably, they rather chose the high-carbohydrate diet and almost nothing of the high-protein and high-fat diets after being submitted to 8 hours of fasting. Although it was not directly evaluated here what would have occurred if glutamate were injected in the MePD during the dark period of the day, this present experimental design of studying the rat feeding behavior after food deprivation and during the light period of the day was intentional and developed in order to avoid “ceiling” or “floor” statistical effects on the food consumption data. That is, we tried to avoid that a possible facilitatory or inhibitory response following a MePD microinjection would be hidden by a still high feeding behavior or by the fact that animals are not awakened and not “motivated” to eat during the testing period (based on 29,37,64). The preferred pattern of food ingestion during this period might correspond to that one found during the dark one of the day, as reviewed in (65). Moreover, rats can clearly be categorized in different subpopulations according to their preferred consumption in a 3-choice macronutrient diet, such as used here, and one of these categories is related to the rather carbohydrate-rich intake (65). Drug effects on feeding behavior most depend on which macronutrient is preferred at the tested stage of the nycthemeral cycle (11,65), as occurred for the preference for the high-carbohydrate diet along the experiment. Present plasma levels of glucose and insulin are above basal ranges previously described for rats after 6 h of food deprivation (67), as would be expected for a postprandial period as studied here.

From our working hypothesis, it appears that excitation of MePD neurons by glutamate would involve facilitatory pathways to control the feeding behavior. And the impossibility to state that excitation of MePD neurons by glutamate enhanced an output

inhibitory pathway to markedly decrease food consumption, which would be linked with those previous findings of hyperphagia following lesions involving the “posterodorsal amygdala”, would suggest that electrolytic lesions might be damaging cell bodies but also axons of passage in the MePD and its adjacencies. Whilst results from other authors indicate that the other MeA subnuclei appear to be not so involved with feeding behavior in rats (62, see a review in 54), the ST collect afferent and efferent axons involving different components of the “posterodorsal” aspect of the amygdala and hypothalamic pathways (13, see also 7). Moreover, excessive weight gains in females are best related to damage of the intra-amygdaloid division of the BNST than of the MePD (34), which would help to explain this apparent inconsistency of data and to address a likely function for the MePD on feeding behavior.

The interpretation of the statistically significant difference in the percentage of animals in the glutamate microinjected group, compared to the PS ones, showing a feeding behavior and eating the high-carbohydrate diet has to be detailed. Although it would sound unlikely and we do not have no experimental evidence to support that PS can induce an inhibitory effect on the rat self-selection of high-carbohydrate diet, the percentage of animals in the PS microinjected group decreased compared to control values at day 10. This would have led to the statistical difference when compared to the 100% results of the glutamate microinjected group, even more that the increase from control percentual number to post-microinjection one relates to only 1 more rat out of 8 studied. Nevertheless, it would be plausible to consider that the variation in the number of rats eating after control vehicle microinjection would have occurred at random because no signs of lesions were found in the MePD in the histological analysis of the brains of these animals. Moreover, if lesions have occurred, it would be expected an increase in feeding behavior, as an hypothesis derived from electrolytic damage to this region in female rats (54). In addition, the rats in the PS

microinjected group that ate the diet displayed the same total consumption of glutamate microinjected ones. Then, we are led to think that, facing the possibility of a normal variability in food intake of rats, glutamate stimulated the consumption of a self-selection diet (or, at least, did not let that any of the studied rats have not eaten) and, compared to “within group” control data, enhanced the total amount of high-carbohydrate ingested. It also appears that glutamate can extend the duration of the meal, as observed along the 2 hours of measurements and compared to the number of animals that received PS in the MePD and that continue to eat from 60 to 120 minutes in the testing day. Previously, it was reported that glutamate microinjected in the lateral hypothalamus induced a dose-dependent eating response in satiated male rats of up to 5 g of food within 1 h (62). On the other hand, glutamate did not affect the postprandial glycemia and insulinemia when compared to control data. We share the same concern as King *et al.* (33) and Grundmann *et al.* (24) that the ‘hit rate’ for MePD studies (and in their case, for the “posterodorsal” amygdala) is low because of the small size of the critical site and that rigorous including criteria determine that any rat with sign of histological damage to the intended area has to be excluded from the microinjected groups. Further studies can be conducted to test if glutamate microinjected in the MePD at the same time that the rat receive a self-selection macronutrient diet can facilitate the processing of incoming sensorial information and interconnected with cortical association areas evaluate emotional loading stimuli or induce mnemonic events related with feeding experience, expanding the present results. Currently, there are scarce data to support an involvement of the MeA subnuclei with learning of appetitively motivated tasks, such as those for drinking of taste solutions or eating palatable food (reviewed in 35).

As reviewed by Rollins and King (54), ST sections also lesioning adjacent areas did not result in excessive weight gain in males, compared to female data. It can not be ruled out that glutamate in the MePD might have different actions on feeding behavior of male and

female rats. Indeed, the MePD receives and send projections to brain areas that are sexually dimorphic in rats (18,19,39,41,49,59). Several evidences indicate that the MePD integrates a gonadal steroid-responsive circuit that can join chemosensorial information with hormonal signals in both males and females to modulate the display of different behaviors (39,41,51,52,59). Androgen receptors, both estrogen receptors α and β , and progesterone receptors are highly concentrated in the MePD (18,23,60). Differences between male and female rats were already reported for the volume of the MePD (42), neuronal and glia cells counts (40), neuronal cell body volume (26), dendritic spatial array (15), dendritic spine density (51), synaptic connectivity (43), neuronal intrinsic electrophysiological properties (14), and content of neuropeptides (44,59). Therefore, differences across the estrous cycle can not be dismissed when studying the MePD because of the evidences of morphological plasticity and neurochemical switches that occur in this brain area of rats (26,44,48,51,59). Also noteworthy is that neurons in the MePD respond to olfactory stimulation and project to the PMV, where information from the perifornical area and from leptin regarding nutrition is integrated with information of the reproductive status (10), as occurs for other hypothalamic areas hodologically and functionally connected with the MePD (e.g., the AVPV and the medial preoptic area) that might be linking energy balance, gonadal hormones actions and reproduced status (27).

Present findings agree with the idea that the MePD would be part of the amygdaloid contribution to direct goal-oriented feeding behavior more than hunger or polyphagia (55,57). Nevertheless, it must be kept in mind that the MePD influence on hypothalamic nuclei and on feeding behavior is not quite simple. Both excitatory and inhibitory responses can be evoked, as shown with electrophysiological recordings, although not in all neurons sampled in these target areas (6,9,47). The feeding behavior of homeostatically challenged, food-deprived rats having a self-selection macronutrient diet is the resultant of serial and parallel neural

connections needed for processing multiple sensorial information, metabolic/hormonal internal demands, and organization of behavioral displays (4,5,41,50,57). Present results add to other previously published for other amygdaloid nuclei and MeA adjacent transition zones (22,32,54,68).

REFERENCES

1. **Abe K.** Modulation of hippocampal long-term potentiation by the amygdala: a synaptic mechanism linking emotion and memory. *Jpn J Pharmacol* 86: 18-22, 2001.
2. **Adamec RE, and Morgan HD.** The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat. *Physiol Behav* 55: 1-12, 1994.
3. **Alheid GF.** Extended amygdala and basal forebrain. *Ann NY Acad Sci* 985: 185-205, 2003.
4. **Berthoud HR.** Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Behav Rev* 26: 393-428, 2002.
5. **Berthoud HR.** Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol Behav* 81: 781-793, 2004.
6. **Bian X, Yanagawa Y, Chang WR, and Luo M.** Cortical-like functional organization of the pheromone-processing circuits in the medial amygdala. *J Neurophysiol* 99: 77-86, 2008.
7. **Black RM, and Weingarten HP.** A comparison of taste reactivity changes induced by ventromedial hypothalamic lesions and stria terminalis transections. *Physiol Behav* 44: 699-708, 1988.
8. **Canteras NS, Simerly RB, and Swanson LW.** Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360: 213-245, 1995.
9. **Carrer HF, Whitmover DI, and Sawyer CH.** Effects of hippocampal and amygdaloid stimulation on the firing of preoptic neurons in the proestrous female rat. *Brain Res* 142: 363-367, 1978.
10. **Cavalcante JC, Sita LV, Mascaro MB, Bittencourt JC, and Elias CF.** Distribution of urocortin 3 neurons innervating the ventral premammillary nucleus in the rat brain. *Brain Res* 1089: 116-125, 2006.
11. **Chavez M, Riedy CA, Van Dijk , and Woods SC.** Central insulin and macronutrient intake in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 271: R727-R731, 1996.
12. **Choi GB, Dong HW, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Swanson LW, and Anderson DJ.** Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron* 46: 647-660, 2005.
13. **Cooke BM, and Simerly RB.** Ontogeny of bidirectional connections between the medial nucleus of the amygdala and the principal bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *J Comp Neurol* 489: 42-58, 2005.
14. **Cooke BM, and Woolley, CS.** Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *J Neurosci* 25: 10759-10767, 2005.

15. **Dall'Oglio A, Gehlen G, Achaval M, and Rasia-Filho AA.** Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: Further data based on the Golgi method. *Neurosci Lett* 430: 151-156, 2008.
16. **de Castilhos J, Marcuzzo S, Forti CD, Frey RM, Stein D, Achaval M, and Rasia-Filho AA.** Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: Dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. *Brain Res Bull* 69: 131-139, 2006.
17. **de Olmos JS, Beltramino CA, and Alheid G.** Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. In: *The Rat Nervous System* (Paxinos G, ed), pp. 509-603. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004.
18. **De Vries GJ, and Simerly RB.** Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In: *Hormones, Brain and Behavior* (Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT, eds), pp. 137-191. San Diego: Academic Press, 2002.
19. **Dong HW, Petrovich G, and Swanson LW.** Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Rev* 38: 192-246, 2001.
20. **Duncan GE, Knapp DJ, and Breese GR.** Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res* 713: 79-91, 1996.
21. **Fillenz M.** Physiological release of excitatory amino acids. *Behav Brain Res* 71: 51-67, 1995.
22. **Glass MJ, Billington CJ, and Levine AS.** Naltrexone administered to central nucleus of amygdala or PVN: neural dissociation of diet and energy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R86-R92, 2000.
23. **Gréco B, Blasberg ME, Kosinski EC, and Blaustein JD.** Response of ER α -IR and ER β -IR cells in the forebrain of female rats to mating stimuli. *Horm Behav* 43: 444-453, 2003.
24. **Grundmann SJ, Pankey EA, Cook MM, Wood AL, Rollins BL, and King BM.** Combination unilateral amygdaloid and ventromedial hypothalamic lesions: evidence for a feeding pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R702-R707, 2005.
25. **Hagiwara Y, Nishigori Y, Fukumori R, and Kubo, T.** The medial amygdaloid area is involved in activation of angiotensin II-sensitive neurons in the anterior hypothalamic area. *Brain Res Bull* 1033: 128-134, 2005.
26. **Hermel EE, Ilha J, Xavier LL, Rasia-Filho AA, and Achaval M.** Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neurosci Lett* 405: 153-158, 2006.
27. **Hill JW, Elmquist JK, Elias CF.** Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E827-E832, 2008.

28. **Ikegaya Y, Abe K, Saito H, and Nishiyama N.** Medial amygdala enhances synaptic transmission and synaptic plasticity in the dentate gyrus of rats in vivo. *J Neurophysiol* 74: 2201-2203, 1995.
29. **Johnson DJ, Li ETS, Coscina DV, and Anderson H.** Different diurnal rhythms of protein and non-protein energy intake by rats. *Physiol Behav* 21: 777-780, 1978.
30. **Kaura S, Bradford HF, Young AM, Croucher MJ, and Hughes PD.** Effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex: in vivo and in vitro studies. *J Neurochem* 65: 1240-1249, 1995.
31. **King BM, Cook JT, and Dallman MF.** Hyperinsulinemia in rats with obesity-inducing amygdaloid lesions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 271: R1156-R1159, 1996.
32. **King BM, Cook JT, Rossiter KN, and Rollins BL.** Obesity-inducing amygdala lesions: examination of anterograde degeneration and retrograde transport. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R965-R982, 2003.
33. **King BM, Rollins BL, Stines SG, Cassis SA, McGuire HB, and Lagarde ML.** Sex differences in body weight gains following amygdaloid lesions in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 277: R975-R980, 1999.
34. **King BM, Rossiter KN, Stines SG, Zaharan GM, Cook JT, Humphries MD, and York DA.** Amygdaloid-lesion hyperphagia: impaired response to caloric challenges and altered macronutrient selection. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 275: R485-R493, 1998.
35. **Knapska E, Radwanska K, Werka T, and Kaczmarek L.** Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol Rev* 87: 1113-1173, 2007.
36. **Kubo T, Okatani H, Nishigori Y, Hagiwara Y, Fukumori R, and Goshima Y.** Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. *Neurosci Lett* 354: 84-86, 2004.
37. **Lax P, Larue-Achagiotis C, Martel P, Madrid JA, and Verger P.** Repeated short-fasting modifies the macronutrient self-selection pattern in rats. *Physiol Behav* 65: 69-76, 1998.
38. **McDonald AJ.** Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55: 257-332, 1998.
39. **Meredith M, and Westberry JM.** Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. *J Neurosci* 24: 5719-5725, 2004.
40. **Morris JA, Jordan CL, and Breedlove SM.** Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. *J Comp Neurol* 506: 851-859, 2008.
41. **Newman SW.** Pheromonal signals access the medial extended amygdala: one node in a proposed social behavior network. In: *Hormones, Brain and Behavior* (Pfaff DW,

- Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT, eds), pp. 17-31. San Diego: Academic Press, 2002.
42. **Nishizuka M, and Arai Y.** Regional difference in sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *Exp Brain Res* 49: 462-465, 1983.
 43. **Nishizuka M, and Arai Y.** Male-female differences in the intra-amygdaloid input to the medial amygdala. *Exp Brain Res* 52: 328-332, 1983.
 44. **Oro AE, Simerly RB, and Swanson LW.** Estrous cycle variations in levels of cholecystokinin immunoreactivity within cells of three interconnected sexually dimorphic forebrain nuclei. *Neuroendocrinology* 47: 225-235, 1988.
 45. **Paxinos G, and Watson C.** *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press, 2005.
 46. **Petrovich GD, Canteras NS, and Swanson LW.** Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Rev* 38: 247-289, 2001.
 47. **Polston EK, Gu G, and Simerly RB.** Neurons in the principal nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis provide a sexually dimorphic GABAergic input to the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience* 123: 793-803, 2004.
 48. **Polston EK, Heitz M, Barnes W, Cardamone K, and Erskine MS.** NMDA-mediated activation of the medial amygdala initiates a downstream neuroendocrine memory responsible for pseudopregnancy in the female rat. *J Neurosci* 21: 4104-4110, 2001.
 49. **Pfaus JG, and Heeb MM.** Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Res Bull* 44: 397-407, 1997.
 50. **Rasia-Filho AA.** Is there anything "autonomous" in the nervous system? *Adv Physiol Educ* 30: 9-12, 2006.
 51. **Rasia-Filho AA, Fabian C, Rigoti K, and Achaval M.** Influence of sex, estrous cycle and motherhood in dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience* 126: 839-847, 2004.
 52. **Rasia-Filho AA, Giovenardi M, and de Almeida RM.** Drugs and aggression. *Recent Patents CNS Drug Discov* 3: 40-49, 2008.
 53. **Reeves PG, Nielsen FH, and Fahey Jr. GC.** AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123:1939-51, 1993.
 54. **Rollins BL, and King BM.** Amygdala-lesion obesity: what is the role of the various amygdaloid nuclei? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1348-R1356, 2000.

55. **Rollins BL, Stines SG, and King BM.** Role of the stria terminalis in food intake and body weight in rats. *Physiol Behav* 89: 139-145, 2006.
56. **Rooszendaal B, and McGaugh JL.** Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* 65: 1-8, 1996.
57. **Schoenfeld TA, and Hamilton LW.** Disruption of appetite but not hunger or satiety following small lesions in the amygdala of rats. *J Comp Physiol Psychol* 95: 565-587, 1981.
58. **Sheehan TP, Paul M, Amaral E, Numan MJ, and Numan M.** Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience* 106: 341-356, 2001.
59. **Simerly RB.** Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways. *Trends Neurosci* 13: 104-110, 1990.
60. **Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, and Swanson LW.** Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An *in situ* hybridization study. *J Comp Neurol* 294: 76-95, 1990.
61. **Smith BK, Berthoud HS, York DA, and Bray GA.** Differential effects of baseline macronutrient preferences on macronutrient selection after galanin, NPY, and an overnight fast. *Peptides* 18: 207-211, 1997.
62. **Stanley BG, Willett III VL, Donias HW, Ha LH, and Spears LC.** The lateral hypothalamus: a primary site mediating excitatory amino acid-elicited eating. *Brain Res* 630: 41-49, 1993.
63. **Swanson LW.** The amygdala and its place in the cerebral hemisphere. *Ann NY Acad Sci* 985: 174-184, 2003.
64. **Tempel DL, Shor-Posner G, Dwyer D, and Leibowitz SF.** Nocturnal patterns of macronutrient intake in freely feeding and food-deprived rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 256: R541-R548, 1989.
65. **Thibault L, and Booth DA.** Macronutrient-specific dietary selection in rodents and its neural bases. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 457-528, 1999.
66. **Timerman W, and Westerink BHC.** Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse* 27: 242-261, 1997.
67. **Wetzler S, Jean C, Tomé D, and Larue-Achagiotis C.** A carbohydrate diet rich in sucrose increased insulin and WAT in macronutrient self-selecting rats. *Physiol Behav* 79: 695-700, 2003.
68. **White NM, and Fisher AE.** Relationship between amygdala and hypothalamus in the control of eating behavior. *Physiol Behav* 4: 199-205, 1969.

Legends

Table 1. Compositions employed in the full nutrient diet (AIN-93M adapted) and in the macronutrient selective diets with high-carbohydrate, high-protein or high-lipid.

Table 2. Mean (\pm SEM) for two experimental groups (control microinjected with physiological solution or glutamate in the MePD at day 16, $n = 7$ and 8 , respectively) of the diet intake (in grams) in days 4, 8 (values represent food consumption along 24 h of the AIN-93M or the 3-choice macronutrient selective diet, respectively), 10, and 16 (due to the experimental design, values for these days represent food consumption after 2 h of free access to 3-choice macronutrient selective diet following a fasting period of 8 h). Postprandial glycemia and plasma insulin levels were measured at day 16, 2 h following microinjections in the MePD. * $p = 0.05$ when compared to the within-group control value obtained at day 10.

Figure 1. Diagram of the experimental design and the procedures employed to study food consumption along the days. Initially animals were maintained with free access to a full nutrient diet (AIN-93M adapted), switched to a free available 3-choice self-selection macronutrient selective diet (high-carbohydrate, high-protein and high-lipid compositions), were maintained with the macronutrient selective diet following a 8-h period of fasting, were submitted to stereotaxic surgery for implantation of unilateral cannulas towards the posterodorsal medial amygdala, recovered from the surgical procedure, were again maintained with the 3-choice macronutrient selective diet following a 2-h period of fasting, and received microinjections of physiological solution (control) or glutamate, when testing records were made.

Figure 2. Left: Hematoxylin-eosin staining of a coronal brain section to show the location of the cannula towards the right posterodorsal medial amygdala (MePD) and the path of the needle (dashed lines) used for the microinjection of physiological solution (control, $0.3 \mu\text{L}$, $n = 7$) or glutamate ($45 \text{ nM}/0.3 \mu\text{L}$, $n = 8$). Scale bar = $800 \mu\text{m}$. **Right:** Schematic diagram of a coronal brain slice of a matched coronally sliced brain section (in this case, 3.30 mm posterior to the bregma) to show the location of the MePD, the optic tract (opt) and the stria terminalis (st), adapted from (45). Dark points represent the most probable microinjections sites in the right MePD, adapting than to one sole figure. Due to overlappings, there are fewer points than the number of animals studied.

Figure 3. Mean (\pm SEM) values of body weights (in grams) along consecutive experimental days. Adult male rats or received an unilateral microinjection of physiological solution (control, $0.3 \mu\text{L}$, $n = 7$) or glutamate ($45 \text{ nM}/0.3 \mu\text{L}$, $n = 8$) in the posterodorsal medial amygdala only at day 16. Showing an adequate adaptation to the experimental condition of food availability, animals had a statistically significant increase in weight gain, * $p < 0.05$ compared to the initial, baseline values in each group.

Figure 4. Mean (\pm SEM) values of glycemia and plasma insulin levels in male rats following 2 h of food intake of a 3-choice self-selection macronutrient selective diet (animals preferred to eat the high-carbohydrate diet). Postprandial values were obtained after a period of 8 h of fasting. Studied groups received unilateral microinjections of physiological solution (control, $0.3 \mu\text{L}$, $n = 7$) or glutamate ($45 \text{ nM}/0.3 \mu\text{L}$, $n = 8$). No statistical difference was found between groups.

Table 1 Diet Compositions

NUTRIENTS*	Diets			
	AIN-93M ADAPTED	HIGH-CARBOHYDATE	HIGH-PROTEIN	HIGH-FAT
CORNSTARCH	60,96	78,14		
POWDERED SUGAR	10,0	10,0		
CASEIN	14,0		87,96	
L-CYSTINE	0,18		0,18	
SOYBEAN OIL	2,0			4,0
HYDROGENATED VEGETABLE FAT	2,0			79,39
VITAMIN MIX**	1,25	1,25	1,25	2,5
MINERAL MIX**	3,5	3,5	3,5	7,0
CELLULOSE	5,0	5,0	5,0	5,0
CARBOXYMETHYLCELLULOSE	1,0	2,0	2,0	2,0
FOOD DYE	0,1	0,1	0,1	0,1
CITRIC ACID	0,01	0,01	0,01	0,01

*Nutrients expressed as percent by weight diet.

** The vitamin and mineral mixes contain 97,47% and 21% cellulose respectively, according to AIN -93M.

Table 2 Experimental Procedure

Group	Period (Days)	Diet Intake			Glycemia (mg/dL)	Insulinemia (μ U/mL)
		AIN-93M Adapted	High-carbohydrate	High-protein		
Control	4 (24h of intake)	18,9 \pm 1,9				
	8 (24h of intake)		27,8 \pm 5,3	9,3 \pm 1,3	0,8 \pm 0,2	
	10 (2h of intake)		3,4 \pm 1,2	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	
	16 (2h of intake)		2,2 \pm 0,9	0,4 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	25,7 \pm 3,2
Glutamate	4 (24h of intake)	21,6 \pm 1,5				
	8 (24h of intake)		26,9 \pm 3,5	13,4 \pm 0,9	1,2 \pm 0,2	
	10 (2h of intake)		1,2 \pm 0,4	0,1 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0	
	16 (2h of intake)		2,8 \pm 0,5	0,2 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0	27,7 \pm 2,9

Figure 1

EXPERIMENTAL PROCEDURE

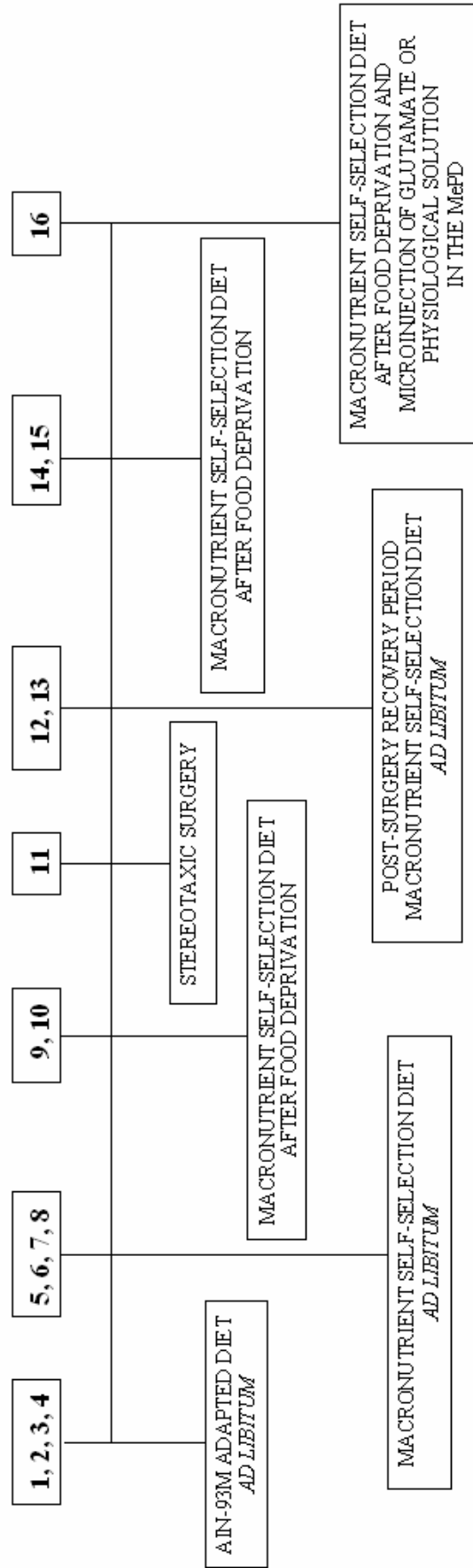


Figure 2

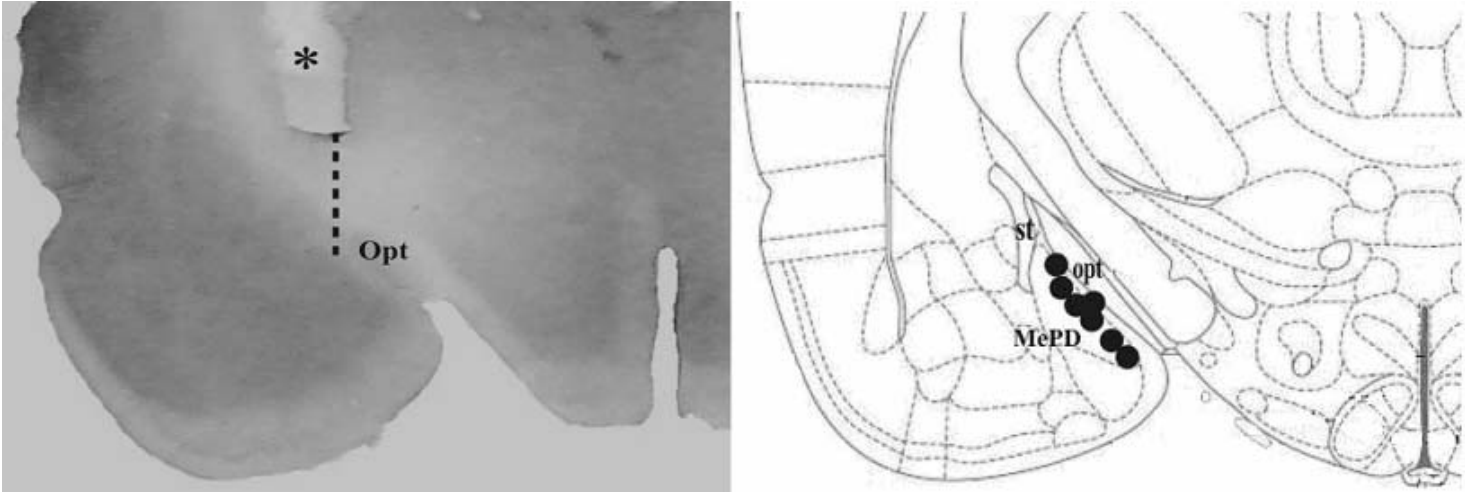


Figure 3

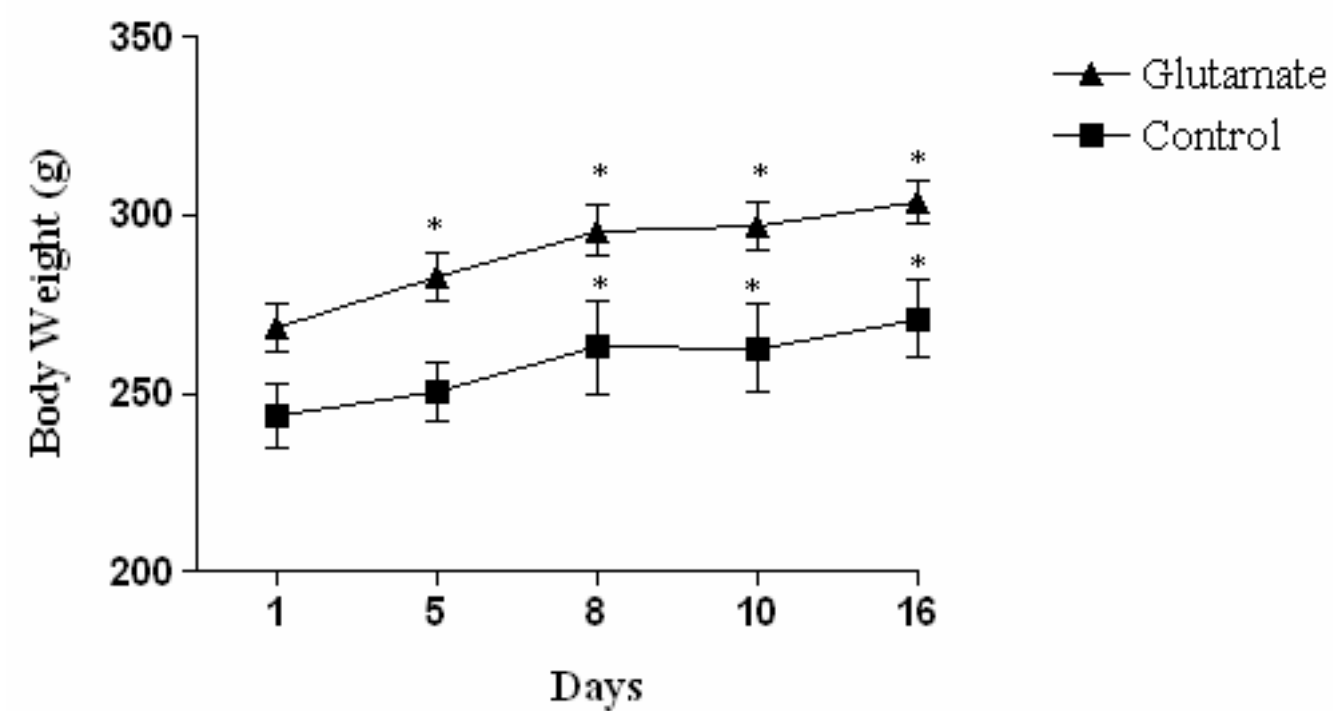
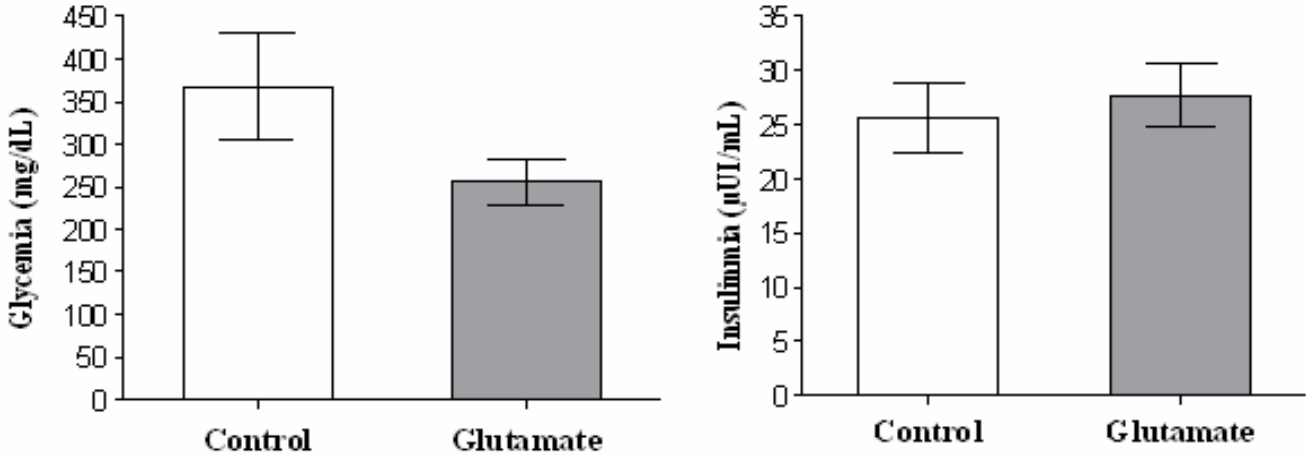


Figure 4



7 CONCLUSÃO

O modelo experimental descrito mostrou-se eficiente para o estudo de comportamento alimentar de ratos Wistar adultos machos, que apresentaram boa aceitação à dieta completa e às formulações isoladas em proteína e lipídeo além de um consumo franco de carboidrato em todos os momentos, com ganho de peso durante todo o período experimental e níveis pós-prandiais de glicemia e insulinemia normais.

A AMePD parece ser componente de circuito neural que modula o comportamento alimentar de ratos porque, pelo método proposto, uma única dose de glutamato (45nM) microinjetada na AMePD gerou um aumento no percentual de animais consumindo dieta rica em carboidrato quando comparados com valores controle pós-microinjeção dentro do mesmo grupo e quando comparado com o grupo controle microinjetado com solução fisiológica.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)