

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**EFEITOS DO ANTAGONISTA DOS RECEPTORES
GASTRIN-RELEASING PEPTIDE (GRP) SOBRE PESO,
ALIMENTAÇÃO, PARÂMETROS METABÓLICOS,
BIOQUÍMICOS E COMPOSIÇÃO CORPORAL DE
RATOS WISTAR**

TESE DE DOUTORADO

LUCIANE BEITLER DA CRUZ

Porto Alegre, Brasil

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**EFEITOS DO ANTAGONISTA DOS RECEPTORES
GASTRIN-RELEASING PEPTIDE (GRP) SOBRE PESO,
ALIMENTAÇÃO, PARÂMETROS METABÓLICOS,
BIOQUÍMICOS E COMPOSIÇÃO CORPORAL DE
RATOS WISTAR**

LUCIANE BEITLER DA CRUZ

Orientador: Prof. Dr. Lauro José Gregianin

Co-orientador: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann

A apresentação da tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, Brasil

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Beitler da Cruz, Luciane

Efeitos do antagonista dos receptores Gastrin-Releasing Peptide (GRP) sobre peso, alimentação, parâmetros metabólicos, bioquímicos e composição corporal de ratos Wistar / Luciane Beitler da Cruz. - 2014.

127 f.

Orientador: Lauro José Gregianin.

Coorientador: Gilberto Schwartzmann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Gastrin-Releasing Peptide (GRP). 2. peso. 3. ingestão alimentar. 4. parâmetros metabólicos e bioquímicos. 5. ratos Wistar. I. José Gregianin, Lauro, orient. II. Schwartzmann, Gilberto, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

17 / 06 / 2014

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Departamento de Bioquímica / Medicina
Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) / Universidade Federal de Santa
Catarina (UFSC)

Profa. Dra. Ana Lúcia Abujamra
Programa de Pós-Graduação Ciências Médicas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Profa. Dra. Ursula Matte
Departamento de Pediatria e Puericultura/PPGSCA
Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

À **Deus**, por mais essa oportunidade.

A minha **mãe**, que nunca me deixou desistir.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Lauro José Gregianin**, meu orientador, que aceitou este desafio junto comigo e ensinou-me todos os passos para esta conquista sempre com um sorriso no rosto e uma palavra de otimismo. Obrigada pela confiança!

Ao **Dr. Gilberto Schwartzmann**, meu co-orientador, grande entusiasta da ciência da medicina, incansável na busca de novos tratamentos para o câncer, meu grande incentivador e amigo, pessoa a quem eu admiro e respeito muito.

Ao **Dr. Algemir Lunardi Brunetto**, médico que idealizou e construiu o Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul, profissional que nos faz acreditar que tudo é possível! Obrigada pelo reconhecimento do meu trabalho junto à equipe multidisciplinar da Oncologia Pediátrica.

À equipe de pesquisa do Serviço de Oncologia Pediátrica, em especial ao **Dr. Rafael Roesler**, brilhante pesquisador, que desde o início acreditou neste projeto. Obrigada por toda a ajuda e paciência com esta inexperiente pesquisadora! Às queridas **Ana Abujamra** e **Caroline Brunetto de Farias**, muito obrigada pelo carinho e atenção sempre!

Ao Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial às minhas chefes **Miriam Isabel Simon**, **Tatiana Maraschin** e **Ana Maria Keller Jochims**, que sempre me apoiaram e oportunizaram este espaço de crescimento dentro das nossas rotinas.

À minha família, em especial a minha **mãe Ieda Cruz**, que mesmo sem entender muito bem o que eu estava fazendo, nunca me deixou desistir e que está sempre pronta para me acolher em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos, **Laísa**, **João Pedro**, **Theodoro** e **a pequena Maia**, que este trabalho sirva como exemplo para a vida estudantil e profissional de vocês. As oportunidades estão diante de nossos olhos, cabe a nós aproveitá-las.

À minha amiga **Isabel Rossato**, que participou direta e objetivamente no manuseio dos animais junto comigo, durante todos os dias, sempre com muito carinho e disponibilidade. Sem a sua decisiva ajuda, eu não teria conseguido sozinha.

À minha amiga e colega de trabalho, **Cristina Toscani Leal Dornelles**, que nunca deixou de dividir um material, indicar uma estratégia, passar um contato, enfim, que sempre me incentivou desde o início até o final, principalmente nos momentos mais difíceis.

Às minhas amigas **Simone Bernardes** e **Paula Rosana Eustáquio** que estão sempre dispostas a me ouvir e a dividir os momentos da minha vida, especialmente durante a execução deste trabalho. Obrigada pelo carinho.

À minha grande amiga **Franciele Alves**, por dividir comigo as angústias e aflições nos momentos mais críticos deste trabalho e, ao mesmo tempo, de me proporcionar os momentos de maior descontração dos últimos anos.

Às queridas nutricionistas e amigas, **Fernanda Odrzywolek Rodrigues** e **Deborah Carraro** por iniciarem este projeto comigo. Obrigada pela ajuda e disponibilidade sempre.

Às biólogas **Patricia Koehler-Santos** da UAMP e **Fernanda dos Santos Oliveira**, do Serviço de Endocrinologia do HCPA que fizeram as análises das citocinas com a maior boa vontade e preocupação com os resultados.

Aos professores do departamento de Zootecnia da UFRGS, **Alexandre de Mello Kessler** e **Andrea Leal Machado**, aos seus **alunos do Pós-Graduação** e a técnica de laboratório **Mônica Antunes Gonzales**, que desde o início se mostraram disponíveis em testar e adaptar suas técnicas para determinar a composição corporal em animais de pequeno porte.

A toda equipe da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, em especial a veterinária **Fabiola Schons Meyer** e a enfermeira **Marta Cioato**, pela dedicação com que cuidam dos animais e pelo carinho e atenção que dão aos pesquisadores.

À estatística **Vânia Naomi Hirakata**, pela disponibilidade e análise estatística dos dados.

Ao **Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE)** do HCPA, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização da pesquisa.

Ao **Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul**, apoiador incondicional de todos os nossos projetos, sempre em busca do melhor para os nossos pacientes e seus familiares.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 REGULAÇÃO DO APETITE E SACIEDADE	22
2.2 BOMBESINA E SEUS RECEPTORES.....	29
2.3 FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS DA FAMÍLIA BOMBESINA	31
2.4 ANTAGONISTA SINTÉTICO DE RECEPTORES DE <i>GASTRIN-RELEASING PEPTIDE</i> (<i>GRPR</i>) – RC-3095	32
2.5 ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM PACIENTES COM CÂNCER.....	34
3 JUSTIFICATIVA	38
4 OBJETIVOS	40
4.1 OBJETIVO GERAL.....	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
5 MÉTODOS	42
5.1 ESTUDO EXPERIMENTAL	42
5.1.1 Cálculo do tamanho da amostra.....	42
5.1.2 Animais e local da pesquisa.....	42
5.1.3 Indução da perda ponderal e divisão dos grupos.....	43

5.1.4 Administração do RC-3095	44
5.1.5 Coleta de amostras de sangue inicial	44
5.1.6 Eutanásia e coleta de amostras de sangue final.....	45
5.1.7 Análise das citocinas pró-inflamatórias	45
5.1.8 Análise da composição corporal.....	46
5.1.9 Variáveis estudadas	47
5.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	47
5.3 ANÁLISE DOS DADOS.....	48
6 RESULTADOS	50
6.1 PESO CORPORAL	50
6.2 INGESTÃO ALIMENTAR	53
6.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS	54
6.4 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	56
6.5 COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	56
7 DISCUSSÃO	61
7.1 INGESTÃO ALIMENTAR E PESO CORPORAL.....	61
7.2 PARÂMETROS METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS	67
7.3 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	68
7.4 COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	69
8 CONCLUSÕES	72
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

10 PAPER Effects of the gastrin-releasing peptide (GRP) receptor antagonist on weight, food intake, biochemical metabolic parameters, and body composition of Wistar rats.....	89
Abstract	90
1 Introduction	91
2 Methods	92
3 Results	95
4 Discussion	104
Acknowledgments	109
References	110
11 ANEXOS	116
Anexo 1 - Protocolo do teste de ELISA - IL-1 e <i>TNF-α</i>	116
Anexo 2 - Protocolo do teste de ELISA - IL-6.....	117
Anexo 3 - Determinação de matéria seca a 105° C.....	119
Anexo 4 - Determinação do nitrogênio total ou proteína bruta.....	120
Anexo 5 - Determinação da gordura bruta ou extrato etéreo	125
Anexo 6 - Determinação das cinzas.....	127

LISTA DE FIGURA

Figura 1	Sinais de saciedade e adiposidade na homeostase energética.....	23
-----------------	---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Média de peso diária dos animais de acordo com os grupos	51
Gráfico 2	Média diária de ingestão alimentar de acordo com os grupos.....	54
Gráfico 3	Proporção de proteína, gordura e cinzas da carcaça dos animais de acordo com os grupos.....	58
Gráfico 4	Proporção de proteína e gordura do fígado dos animais de acordo com os grupos	58
Gráfico 5	Proporção de gordura da pele dos animais de acordo com os grupos.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso corporal e percentual de perda ponderal durante o período de restrição alimentar.....	50
Tabela 2	Média do peso dos animais no D1 e D14	52
Tabela 3	Porcentagem de ganho de peso de acordo com os grupos	53
Tabela 4	Parâmetros metabólicos e bioquímicos no D1 e no D14	55
Tabela 5	Níveis séricos de IL-6 no D1 e no D14	56
Tabela 6	Composição corporal dos ratos de acordo com os grupos.....	57

LISTA DE SIGLAS

<i>α-CSF</i>	<i>Colony-stimulating factor</i>
ANOVA	Análise de variância
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
BB	Bombesina
<i>BDNF</i>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<i>BN</i>	<i>Bombesin</i>
<i>BRS-3</i>	<i>Bombesin-receptor-subtype-3</i>
CCK	Colecistoquinina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CH	Carboidratos
<i>DEXA</i>	<i>Dual energy X-ray absorptiometry</i>
DP	Desvio Padrão
EDTA	Etilenodiaminotetracético
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ENN	Extrativos não nitrogenados
<i>FLI</i>	<i>Fos-like immunoreactivity</i>
G0	Grupo controle
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
<i>GLP-1</i>	<i>Glucagon-like peptide</i>
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
<i>GRP</i>	<i>Gastrin-releasing peptide</i>
<i>GRPR</i>	<i>Gastrin-releasing peptide receptor</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
NMB	Neuromedina B

NMBR	<i>Neuromedin receptor</i>
NMC	Neuromedina C
NPY	Neuropeptídio Y
NTS	Núcleo do trato solitário
PVN	Paraventricular
PYY	Peptídeo Y
rpm	Rotações por minuto
SAC	Síndrome de anorexia-caquexia
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
SD	<i>Sprague dawley</i>
SNC	Sistema nervoso central
TGI	Trato gastrointestinal
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-alfa</i>
UAMP	Laboratório de Análise Molecular e Proteínas
UEA	Unidade de Experimentação Animal
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USA	Estados Unidos
WT	<i>Wild-type</i>

RESUMO

Introdução e objetivo: *Gastrin-releasing peptide (GRP)* está envolvido em diversas funções cerebrais e gastrointestinais, incluindo secreção pancreática, liberação de hormônios peptídeos gastrointestinais e redução da ingestão alimentar. O objetivo deste estudo é testar os efeitos da injeção intraperitoneal do antagonista do receptor *GRP* sobre o peso, ingestão alimentar, parâmetros metabólicos e bioquímicos e composição corporal.

Métodos: Foram utilizados 35 ratos Wistar adultos jovens, submetidos a uma perda ponderal mínima de 7%, divididos em quatro grupos: Grupo Controle (G0) que recebeu injeção de solução salina; Grupo 1 (G1) que recebeu 0,1 mg/kg de RC-3095; Grupo 2 (G2) que recebeu 0,3 mg/kg de RC-3095 e Grupo 3 (G3) que recebeu 1,0 mg/kg de RC-3095 durante 14 dias.

Resultados: A variação da média diária de ingestão alimentar foi estatisticamente diferente entre os grupos (F: 3,139; df: 3; $P = 0,039$) e o G2, que recebeu a dose intermediária de 0,3 mg/kg de RC-3095, mostrou uma ingestão alimentar maior do que o G0 ($P = 0,041$). Houve um aumento similar do peso, de aproximadamente 22% (F: 0,572; df: 3; $P = 0,638$), assim como uma média de peso similar dos animais (F: 1,145; df: 9,685; $P = 0,338$) entre os grupos durante o período do estudo. Porém, a média de peso do G2 foi mais alta do que a média de peso dos animais do G0 ($P = 0,042$). Ao final do estudo, nenhuma diferença foi observada entre os grupos no total de massa magra ou de massa gorda da carcaça, fígado e pele dos animais. Comparando os níveis séricos de albumina, amilase, glicose, colesterol total, HDL-colesterol e interleucina-6 do Dia 1 (D1) para o Dia 14 (D14), não houve diferença estatisticamente relevante entre os grupos. Entretanto, o nível médio de triglicerídeos no G2 mostrou um aumento maior quando comparado ao G0 ($P = 0,038$).

Conclusões: Neste estudo, a injeção da dose intermediária do antagonista do receptor *GRP*, o RC-3095 (0,3 mg/kg/dia), em ratos Wistar adultos jovens saudáveis submetidos a perda ponderal, interferiu na ingestão alimentar e no peso médio. Nenhum efeito sobre o ganho de peso, composição corporal ou parâmetros metabólicos e bioquímicos foi observado, exceto um aumento maior do nível sérico de triglicerídeos. Estes resultados demonstram alguns dos efeitos fisiológicos do *GRP* sobre a ingestão alimentar e peso, ampliando possibilidades de futuros estudos sobre fome, saciedade e metabolismo de macronutrientes ou em animais submetidos a uma condição de estresse maior, como o câncer.

Palavras chave: Antagonista; Composição corporal; *Gastrin-releasing peptide receptor*; Ingestão alimentar; Parâmetros metabólicos e bioquímicos; Ratos Wistar.

ABSTRACT

Introduction and Objective: Gastrin-releasing peptide (GRP) is involved in several brain and gastrointestinal functions, including pancreatic secretion, gastrointestinal peptide hormone release, and reduction of food intake. We tested the effects of an intraperitoneal injection of the GRP receptor (GRPR) antagonist RC-3095 on weight, food intake, biochemical metabolic parameters, and body composition.

Methods: Thirty-five young adult male Wistar rats, submitted to a minimal weight loss of 7%, were divided into four groups: the control group (G0) received saline; Group 1 (G1) received 0.1 mg/kg RC-3095; Group 2 (G2) received 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3) received 1.0 mg/kg RC-3095 for 14 days.

Results: The mean daily variation of food intake was statistically different between the groups (F: 3.139; df: 3; $P = 0.039$); and G2, which received the intermediate dose of 0.3 mg/kg RC-3095, showed a greater food intake than G0 ($P = 0.041$). There was a similar increase in weight, approximately 22% (F: 0.572; df: 3; $P = 0.638$), as well as a similar mean animal weight (F: 1.145; df: 9.685; $P = 0.338$) between the groups during the study period. However, the mean weight of G2 animals was more than the mean weight of G0 animals ($P = 0.042$). At the end of the study, no difference was observed between the groups in terms of the total lean mass or fat mass from the rat carcass, liver, and skin. Comparing the serum levels of albumin, amylase, glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and interleukin (IL)-6 from day 1 (D1) to D14, there were no statistically relevant differences between the groups. However, the mean triglyceride level in G2 compared to G0 showed a greater increase ($P = 0.038$).

Conclusion: In this study, the injection of an intermediate dose of GRPR antagonist RC-3095 (0.3 mg/kg/day) into healthy young adult Wistar rats submitted to weight loss affected food intake and the mean weight. No effects on weight gain, body composition, or biochemical metabolic parameters were observed, except for a great increase in the serum triglyceride levels. These results demonstrate some physiological effects of GRP on food intake and weight, expanding the possibilities of future studies on hunger/satiety and macronutrient metabolism as well as highly stressful conditions like cancer.

Keywords: Antagonist; Biochemical metabolic parameters; Body composition; Food intake; Gastrin-releasing peptide receptor; Wistar rats.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A variação do peso corporal é um indicador importante do estado nutricional do doente. O peso corporal traduz-se em uma distribuição da composição corporal em massa gorda e massa magra, cuja quantificação e características podem ser diferentes para o mesmo peso, e por isso merecem ser avaliadas (CORONHA *et al.*, 2011).

A diminuição da ingestão alimentar e a perda de peso corporal involuntária são muito frequentes em pacientes oncológicos (JEFFERY *et al.*, 2012; KHOSHNEVIS *et al.*, 2012). Se esta diminuição de peso ocorrer, sobretudo à custa de depleção de massa magra, surge a possibilidade de sarcopenia, definida como a perda de massa muscular mais do que dois desvios padrões abaixo da média do adulto saudável (BARACOS *et al.*, 2010). A sarcopenia tem sido associada a diminuição da capacidade funcional, a risco de quedas e/ou fraturas, a tempo de hospitalização prolongado e a aumento de infecções nosocomias (PRADO *et al.*, 2009; BARACOS *et al.*, 2010). Esta condição também pode ocorrer em diversas outras situações patológicas, transtornos alimentares (COOPER *et al.*, 2013), e em pacientes geriátricos (THOMAS, 2011; COOPER *et al.*, 2013).

A perda de peso em pacientes oncológicos e inflamados, pode ser induzida também pela ativação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 e interleucina 6 (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (em inglês, *tumor necrosis factor-alfa* – *TNF- α*) que diminuem o apetite e a ingestão alimentar, aumentam a depleção de massa magra e contribuem para o aumento do estado hipermetabólico (ARGILES *et al.*, 2003; UTECH *et al.*, 2012). Segundo Contente *et al.*, 2002, o aumento da liberação dos hormônios cortisol e glucagon, a diminuição da secreção de insulina, a resistência à insulina, a anemia, febre e aumento do gasto energético, tanto em animais como em humanos, podem estar associados também a liberação de *TNF- α* . Para este conjunto de manifestações utiliza-se o termo síndrome da anorexia-caquexia (SAC), que tem sido cada vez mais utilizado devido a forte correlação entre anorexia

e caquexia (CONSENSO BRASILEIRO DE CAQUEXIA E ANOREXIA, 2011). Pacientes com 15% de perda ponderal já apresentam prejuízos fisiológicos e a diminuição de 30% do peso corpóreo está freqüentemente associada à morte (FEARON *et al.*, 2006; (CONSENSO BRASILEIRO DE CAQUEXIA E ANOREXIA, 2011).

Além de acompanhar a ingestão alimentar e a evolução ponderal dos pacientes, é importante que sejam monitorados alguns parâmetros bioquímicos relacionados à nutrição que podem estar alterados, tais como: albumina, glicemia, perfil lipídico e hemograma (KHOSHNEVIS *et al.*, 2012; UTECH *et al.*, 2012). Assim como os cuidados clínicos durante o tratamento oncológico podem melhorar o prognóstico da doença, a minimização dos efeitos colaterais, a redução da frequência e do tempo de internação hospitalar também podem contribuir para a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes (BAUER *et al.*, 2002; HUHMANN & SCUNINGHAM, 2005).

Várias estratégias dietéticas têm sido utilizadas para aumentar a ingestão alimentar em pacientes emagrecidos, incluindo o aumento da densidade energética dos alimentos e bebidas, aumento da frequência das refeições, melhora do sabor e modificação da textura e consistência (SILVER, 2009; HOPKINSON *et al.*, 2011).

Atualmente algumas intervenções farmacológicas vêm sendo utilizadas para o tratamento da SAC induzida por neoplasia maligna. Estas intervenções incluem drogas que estimulam o apetite, tais como o acetato de megestrol e o dronabinol; incluem os inibidores de citocinas, tais como a ciproheptadina, talidomida, pentoxifilina e ácido eicosapentanóico, em inglês, *eicosapentaenoic acid (EPA)* e os agentes anabólicos, entre eles os corticosteróides (RUIZ GARCIA *et al.*, 2013).

Para associar a estas estratégias nutricionais já rotineiramente utilizadas e as intervenções farmacológicas, seria muito interessante a descoberta de novas substâncias que possam vir a ser estimuladoras do apetite. Estas substâncias poderiam fazer parte do arsenal terapêutico utilizado

para tratamento de qualquer doença que cursasse com diminuição da ingestão alimentar e perda ponderal.

Desde a última década, muito tem se estudado a respeito da regulação fisiológica do apetite (CUPPLES 2005), hormônios e neuropeptídeos reguladores de funções cerebrais (WYNNE *et al.*, 2005) e sistemas orexígenos e anorexígenos (HALFORD & HARROLD, 2008).

Tanto em roedores como em humanos é mais fácil induzir a perda ponderal do que o ganho. A estimulação do apetite humano tem sido um grande desafio terapêutico (HALFORD & HARROLD, 2008).

Devido a dificuldade em reproduzir neoplasia maligna e conseqüente caquexia de forma similar em animais e pela exigüidade de tempo para execução deste estudo, o grupo de pesquisadores decidiu buscar um modelo experimental que pudesse se aproximar da situação de perda ponderal aguda enfrentada pelos pacientes, principalmente oncológicos.

Sendo assim, o objetivo principal deste estudo é verificar o efeito da administração de um peptídeo sintético, o RC-3095, sobre o peso, ingestão alimentar, parâmetros bioquímicos e metabólicos e composição corporal, em ratos Wistar submetidos a uma situação de perda ponderal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REGULAÇÃO DO APETITE E SACIEDADE

Na última década muito tem se estudado a respeito da complexa interrelação entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e a atividade de diversos órgãos envolvidos na homeostase energética. Os sinais endócrinos periféricos tem um papel importante na transmissão de informações chaves para o cérebro fazer a regulação do balanço energético e o controle da ingestão alimentar. O cérebro recebe informações contínuas sobre os estoques de energia, níveis séricos de nutrientes, início e término das refeições e sobre a energia necessária para tecidos e órgãos críticos (WOODS & D'ALESSIO, 2008). Os sinais periféricos que influenciam a ingestão alimentar e o gasto energético podem ser divididos em duas grandes categorias: sinais de saciedade (que contribuem para a decisão de parar de comer ou para o retardo da sensação de fome) e os sinais de adiposidade (que incluem a secreção de hormônios como insulina e leptina) proporcional a quantidade de gordura corporal (WOODS *et al.*, 1998; SCHWARTZ *et al.*, 2000; WOODS, 2005), conforme Figura 1.

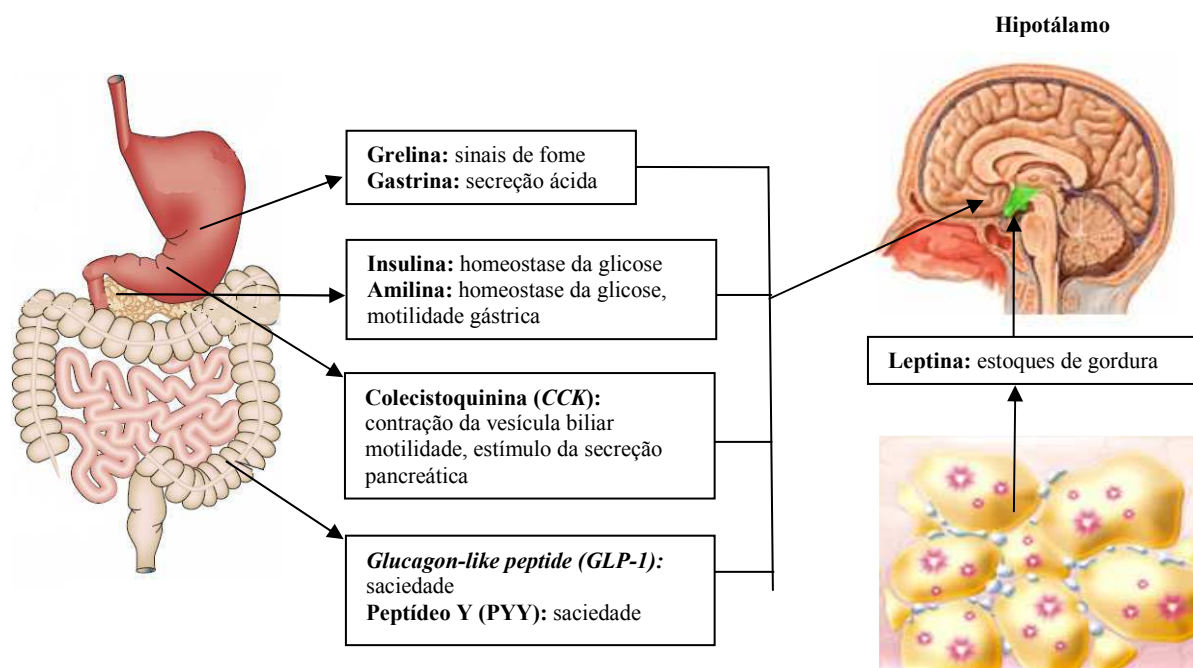


Figura 1 - Sinais de saciedade e adiposidade na homeostase energética.

Fonte: Modificado de Murphy & Bloom, 2006 e Woods & D'Alessio, 2008

Esses hormônios e peptídeos chegam ao cérebro e interagem com receptores neuronais específicos, principalmente no hipotálamo que regula o balanço energético (WOODS & D'ALESSIO, 2008). Após as refeições ocorre a liberação de colecistoquinina (abreviatura em inglês, *CCK*), estimulada principalmente pela ingestão de proteínas e gorduras (LIEVERSE *et al.*, 1994; HILDEBRAND *et al.*, 1998), enquanto que a liberação de *Glucagon-like peptide (GLP-1)* é estimulada principalmente pela ingestão de carboidratos (CH) e gorduras (THOMSEN *et al.*, 2003) e a de Peptídeo Y (PYY) a partir da ingestão de gorduras e outros nutrientes (BATTERHAM & BLOOM, 2003). A infusão de *CCK*, *GLP-1* e PYY em humanos reduzem a ingestão calórica e suprimem o apetite (NASLUND *et al.*, 1998; BATTERHAM *et al.*, 2003; MURPHY & BLOOM, 2006).

A *CCK* é um hormônio encontrado predominantemente no duodeno e jejuno, apesar de estar amplamente distribuído no trato gastrintestinal (LARSSON & REHFELD, 1978). É rapidamente liberada no intestino em resposta a circulação de nutrientes e permanece elevado por aproximadamente cinco horas após as refeições (LIDDLE *et al.*, 1985). A *CCK* coordena a digestão pelo estímulo a liberação de enzimas digestivas provenientes do pâncreas e vesícula biliar, aumentando a motilidade intestinal e inibindo o esvaziamento gástrico (LIDDLE *et al.*, 1985; MORAN & SCHWARTZ, 1994). Há muito tempo já se demonstrou que a administração de *CCK*, tanto em humanos como em animais, inibe a ingestão alimentar pela redução do número e tamanho das refeições. Porém, se administrada mais do que 15 minutos antes das refeições, estes efeitos não acontecem, pois sua meia-vida é curta (GIBBS *et al.*, 1973; KISSILEFF *et al.*, 1981). Entretanto, a infusão contínua de *CCK* em animais, reduz a ingestão alimentar, mas aumenta a frequência das refeições, não tendo efeito sobre o peso corporal, e ainda torna-se ineficaz depois das primeiras 24 horas de infusão (CRAWLEY & BEINFELD, 1983; WEST *et al.*, 1984; WEST *et al.*, 1987). As evidências sugerem um envolvimento da *CCK* nos mecanismos de saciedade, pois sua circulação envia sinais de saciedade, através da ativação das fibras do nervo vago (MORAN & SCHWARTZ, 1994). O nervo vago projeta estes sinais para o núcleo do trato solitário (NTS), os quais mandam a informação para o hipotálamo (SCHWARTZ *et al.*, 2000). A *CCK* demonstra ser um hormônio envolvido na saciedade, mas ineficaz para o tratamento da obesidade, de maneira isolada (WYNNE *et al.*, 2005). Seus efeitos a longo prazo resultam da interação com outros hormônios envolvidos na saciedade, tais como a leptina e a insulina (MATSON *et al.*, 2000).

A insulina é secretada pelas células β do pâncreas em resposta aos níveis plasmáticos de nutrientes, especialmente a glicose (ROSENFELD, 2002). Desempenha importante papel no controle do peso corporal, por ser um dos hormônios responsáveis pela regulação da ingestão alimentar e do gasto energético. Ela ultrapassa rapidamente a barreira hemato-encefálica, ligando-se a receptores específicos expressados no núcleo arqueado cerebral e ventromedial, projetando sinais para o hipotálamo (MARKS *et al.*, 1990), interagindo com neurotransmissores envolvidos no mecanismo de controle da fome e da saciedade (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Os níveis de insulina no sangue, assim como os de leptina, variam diretamente com as mudanças na adiposidade (BAGDADE *et al.*, 1967). Na presença de insulina, no tecido adiposo, a captação de glicose é estimulada e a liberação de ácidos graxos livres é inibida, afetando diretamente o metabolismo de lipídios. Com isto ocorre a redução da oxidação de gorduras, através da inibição da ação da lipase hormônio-sensível e estímulo da lipase lipoproteica, que ativa o depósito de gorduras (FRIEDMAN, 1998; HOWARD, 1999). Por este motivo, a insulina pode ser considerada um dos maiores ativadores dos estoques de energia no tecido adiposo (HILLEBRAND *et al.*, 2002). Camundongos com deleção específica de receptores de insulina no SNC são obesos e dislipidêmicos e tem a insulinemia aumentada (BRUNING *et al.*, 2000), assim como ratos com receptores de insulina bloqueados são hiperfágicos e tem maior massa adiposa (OBICI *et al.*, 2002).

Em conjunto com a insulina, outro hormônio peptídeo, também secretado pelas células β do pâncreas, é a amilina (BUTLER *et al.*, 1990). Semelhante a insulina, este peptídeo ultrapassa rapidamente a barreira hemato-encefálica, ligando-se a receptores específicos, porém em locais diferentes, na área postrema e no NTS, projetando sinais para o hipotálamo (SEXTON *et al.*, 1994). Este peptídeo age como um fator de saciedade, controlando níveis séricos de glicose e inibindo o esvaziamento gástrico e a secreção ácida do estômago, em curto prazo (LUDVIK *et al.*, 1997; HILLEBRAND, WIED, ADAN, 2002). A administração de amilina causa uma dose-dependente redução do tamanho das refeições quando administrada sistemicamente ou

diretamente no SNC (LUTZ, DEL PRETE, SCHARRER, 1994; RUSHING *et al.*, 2001; LUTZ, 2006).

Outro importante hormônio envolvido nos mecanismos de fome e saciedade é a grelina, produzida no estômago, principalmente nas células do fundo (corpo) (DATE *et al.*, 2000a), na mucosa do estômago (DATE *et al.*, 2000b), podendo também ser encontrada no duodeno, no jejuno, no íleo, no pâncreas, no cólon e em outros tecidos (DATE *et al.*, 2000a; GNANAPAVAN *et al.*, 2002; YOSHIMOTO *et al.*, 2002; KOJIMA & KANGAWA, 2008; KOJIMA & KANGAWA, 2010). Age no núcleo arqueado do hipotálamo (*ARC*) (em inglês, *arcuate núcleos*), uma importante região no controle do apetite (HOWARD *et al.*, 1996; GUAN *et al.*, 1997; NAKAZATO *et al.*, 2001). No *ARC*, a grelina induz uma pré-sinapse nos neurônios que expressam o neuropeptídeo Y (NPY) para liberá-los, estimulando a ingestão alimentar (KOJIMA & KANGAWA, 2005). O controle da secreção da grelina pré-prandial não está completamente esclarecido, mas a ação simpática pode estar envolvida (DE LA COUR *et al.*, 2007; KOJIMA & KANGAWA, 2010). Sua supressão pós-prandial não é mediada apenas por nutrientes no estômago ou duodeno, pois ocorre também quando os mesmos são administrados por infusão jejunal, gástrica ou duodenal (OVERDUIN *et al.*, 2005). O nível de glicose no sangue também pode ser um fator crítico, pois, quando a glicose é administrada oral ou intravenosamente, a concentração de grelina no plasma diminui (SHIYA *et al.*, 2002). Sanchez *et al.* (2004) referem que CH apresentam um maior efeito supressor em relação aos lipídios. A glicose e os aminoácidos suprimem mais efetivamente do que lipídios e frutose (TEFF *et al.*, 2004; OVERDUIN *et al.*, 2005). Além disso, a intensidade e a duração da supressão dos níveis de grelina pós-prandial estão relacionadas de forma dose-dependente com a quantidade de calorias das refeições (CALLAHAN *et al.*, 2004). Os níveis de grelina no plasma aumentam imediatamente antes de cada refeição e se reduzem aos níveis basais uma hora após a ingestão habitual (CUMMINGS *et al.*, 2001). A hipótese mais provável é que a grelina tenha um efeito anabólico no início da refeição seguido de um balanço energético positivo (SAVASTIO *et al.*, 2006).

O nível de grelina no plasma é mais baixo em indivíduos obesos do que em não obesos (TSCHOP *et al.*, 2001; HAQQ *et al.*, 2003). Relacionado a este fato, o nível de grelina no plasma se encontra bastante elevado em portadores de anorexia nervosa e retorna a níveis normais com ganho de peso e quando o indivíduo se recupera da doença (TANAKA *et al.*, 2003a). As concentrações de grelina também são elevadas em indivíduos com bulimia nervosa (TANAKA *et al.*, 2003b). Segundo Cummings *et al.* (2001), a concentração plasmática aumenta em condições de jejum e se reduz após alimentação, determinando o papel da grelina como um gatilho para o início da refeição. Além de sua influência sobre o apetite, a grelina interfere no peso corporal e na adiposidade (CHEN *et al.*, 2009b). Entre outras ações periféricas da grelina, destacam-se também a estimulação da secreção ácida, a motilidade gástrica e os distúrbios da motilidade gástrica (ASAKAWA *et al.*, 2001; BALDELLI *et al.*, 2001; ASAKAWA *et al.*, 2005; CAMILLERI *et al.*, 2009).

Assim como a grelina, a leptina é outro importante hormônio envolvido nos mecanismos de fome e saciedade, só que é derivado do tecido adiposo e é uma das adipocinas mais importantes no controle da homeostase energética. É produzida quase que exclusivamente em adipócitos diferenciados, principalmente no tecido subcutâneo, tem relação direta com o seu teor de triglicerídios, embora seja encontrada em outros tecidos (MEIER & GRESSNER, 2004). É considerado um sinal de adiposidade, pois seus níveis são diretamente relacionados a quantidade de gordura armazenada pelo corpo (WOODS & DIALESSIO, 2008). É prevalente no hipotálamo, nos núcleos arqueado, paraventricular (PVN), dorsomedial e ventromedial, que são áreas relacionadas ao controle da ingestão alimentar e gasto energético (MEIER & GRESSNER, 2004; ZHANG *et al.*, 2005), que envolvem a maioria dos seus efeitos biológicos e apresenta papel fundamental na homeostase energética pela ação anorexígena da leptina (FRIEDMAN, 2002). A leptina age através de receptores centrais, especialmente no hipotálamo, e em vários tecidos periféricos, como pâncreas, fígado, tecido adiposo e sistema imunológico (BJORBAEK & KAHN, 2004). Seus níveis diminuem no jejum, na perda de peso, em situações de estresse,

mostrando o efeito da leptina como um sinalizador do tamanho dos estoques de gordura. O ritmo circadiano e o pico de sua secreção ocorrem durante a noite e nas primeiras horas da manhã. O ritmo diurno da leptina é vinculado ao momento escolhido da alimentação. A velocidade de secreção da leptina é lenta (CISTERNAS, 2002). Uma das ações periféricas mais importantes da leptina é a redução da síntese e da secreção de insulina, estabelecendo-se, assim, um eixo “adipo-insular” (SEUFERT, 2004). Evidências sugerem que sinais hipotalâmicos regulam a sensibilidade da insulina no fígado via um neurocircuito envolvendo o nervo vago (GERMAN *et al.*, 2009), o que pode vir a ser um possível eixo cérebro-fígado no controle da homeostase energética. A leptina é responsável também por estimular a oxidação de ácidos graxos e a captação de glicose, impedindo assim o acúmulo de gordura nos tecidos (MARRA & BERTOLANI, 2009).

O termo “neuropeptídeo” surgiu na década de 70, quando seu conceito foi definido como fragmento de hormônio peptídeo sem a atividade hormonal, mas capaz de produzir efeitos como tal (De WIED, 1974). Vários neuropeptídeos centrais e gastrointestinais, já bem conhecidos e comentados anteriormente, entre eles a *CCK*, o *PYY* e os hormônios grelina, leptina e insulina interferem não só na regulação da ingestão dos alimentos como no gasto energético (INUI, 1999; INADERA *et al.*, 2002), podendo estar associados a síndrome de anorexia-caquexia (SAC), frequente em pacientes oncológicos (DAVIS, 2004; WAITZBERG *et al.*, 2004; INADERA *et al.*, 2002). O *NPY* também é um hormônio associado à caquexia, abundantemente distribuído no cérebro, incluindo o hipotálamo. Situado abaixo da leptina na via metabólica, é o mais potente peptídeo orexígeno, ativado pela diminuição de leptina, fazendo parte de uma rede interconectada de substâncias orexígenas, como a galanina, insulina, peptídeos opióides, entre outros. O *NPY* pode estimular o apetite por si só ou mediante a liberação de outros peptídios orexígenos acima citados e, entre outras funções, tem como ação aumentar a ingestão de alimentos, a lipogênese e diminuir o gasto energético, promovendo o balanço energético positivo e o aumento da reserva de gordura (INUI, 1999; INADERA *et al.*, 2002; INUI, 2002; McCARTHY, 2003). Em um destes estudos, realizado com animais com tumores malignos, a liberação de *NPY* no hipotálamo

mostrou-se reduzida e este efeito tornava-se mais intenso a medida que a anorexia progredia (INADERA *et al.*, 2002).

2.2 BOMBESINA E SEUS RECEPTORES

A bombesina (BB) é um peptídeo composto por 14 aminoácidos, inicialmente isolado da pele de sapos (*Bombina bombina*) em 1971 (ANASTASI *et al.*, 1971). Este peptídeo está ativo também em mamíferos e seus efeitos farmacológicos se estendem entre vários aspectos fisiológicos: ação hipertensiva, efeitos sobre a contração uterina, cólon ou íleo, ação estimuladora da secreção de gastrina, efeito hiperglicemiante ou aumento da secreção de insulina (ERSPAMER *et al.*, 1970). Muitos outros peptídeos relacionados estruturalmente com a BB foram descobertos a partir da pele de anfíbios, e denominados como fazendo parte da “família bombesina” (ERSPAMER *et al.*, 1988).

O primeiro análogo mamífero da BB, nomeado peptídeo liberador de gastrina, em inglês *gastrin-releasing peptide (GRP)* pela sua potente atividade liberadora de gastrina, foi caracterizado quimicamente a partir do tecido gástrico de suínos por McDonald *et al.* (1979). Este peptídeo é composto por 27 aminoácidos e sintetizado a partir de 148 aminoácidos precursores, no núcleo neuronal. Ele tem em comum com a BB nove de dez aminoácidos C-terminais. Também em suínos, porém na medula espinhal, foi identificado outro peptídeo similar, denominado Neuromedina B (NMB), com potente ação estimuladora da musculatura lisa (MINAMINO *et al.*, 1983). A similaridade estrutural destes três peptídeos da família bombesina está demonstrada a seguir:

BB: Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂

GRP: Ala-Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-
Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂

NMB: Gly-Asn--Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH₂

Estrutura da bombesina (BB), *gastrin-releasing peptide* (GRP) e neuromedina (NMB) e sua similaridade ()

Fonte: Modificado de Moody & Merali (2004)

Análises imunoquímicas revelaram ampla distribuição dos peptídeos GRP e NMB em mamíferos, tanto no SNC como nos tecidos periféricos, especialmente no trato gastrointestinal (TGI) (PRINCE *et al.*, 1984; WADA *et al.*, 1990; MOODY & MERALI, 2004). No TGI, o GRP encontra-se em maior quantidade no cólon e no intestino curto. A NMB também está no TGI, mas em menor quantidade do que o GRP. No SNC, o GRP está mais amplamente distribuído nos neurônios do prosencéfalo, núcleos hipotalâmico e sensorio, enquanto a NMB é mais abundante no bulbo olfatório e região dorsal (WADA *et al.*, 1990; WADA *et al.*, 1991).

Em uma ampla revisão publicada em 2008, estão citadas as três classes de receptores da família bombesina em mamíferos: uma de 384 aminoácidos, que tem preferência pelo GRP, chamado de *gastrin-releasing peptide receptor* (GRPR) ou receptor BB₂, uma de 390 aminoácidos, que tem preferência pela NMB, chamado de *neuromedin receptor* (NMBR) ou receptor BB₁, e uma de 399 aminoácidos, denominado receptor órfão, chamado de *bombesin-receptor-subtype-3* (BRS-3) ou receptor BB₃, que tem 47-52% de homologia com GRPR e NMBR (JENSEN *et al.*, 2008). Quando a sequência de aminoácidos do GRPR e NMBR foi comparada, verificou-se homologia de mais de 90% entre espécies de mamíferos e de 80% entre mamíferos e pássaros. Já entre os mamíferos, a similaridade dos BRS-3 é mais baixa do que o GRPR, em torno de 84%. Em relação aos sítios de ligação, o GRPR tem alta afinidade para GRP e BB e baixa

afinidade para NMB. Ao contrário, todos os *NMBR* tem alta afinidade para NMB, moderada afinidade para BB e baixa afinidade para *GRP* (OHKI-HAMAZAKI *et al.*, 2005).

O gene *GRPR* está localizado no cromossomo X em humanos (Xp22) e em ratos e frangos no cromossomo 1 (1q23-24) (IWABUCHI *et al.*, 2003). O gene *BRS-3* está mapeado em ratos também no cromossomo X, assim como em humanos (Xq26-28). Já o gene *NMBR* humano está localizado no 6q21-qter e em ratos no cromossomo 10 (OHKI-HAMAZAKI *et al.*, 2005).

2.3 FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS DA FAMÍLIA BOMBESINA

Os peptídeos da família bombesina estão envolvidos em diversas funções fisiológicas, tanto em animais como em culturas de tecidos e celulares (OHKI-HAMAZAKI, 2000), como por exemplo, em células de crescimento e diferenciação em vários epitélios derivados de tumores (GONZALES *et al.*, 2008) ou na ativação de processos inflamatórios a partir da migração de macrófagos *in vivo* (CZEPIELEWSKI *et al.*, 2012). O *GRP* exerce papel sobre algumas funções cerebrais, incluindo a regulação do ritmo circadiano, respostas ao medo, ao estresse, a ansiedade e na modulação da memória (ROESLER *et al.*, 2006), assim como sobre a termorregulação (GONZALES *et al.*, 2008). No TGI, a administração de BB produz uma variedade de efeitos direta ou indiretamente relacionados com a ativação dos receptores desta família. Entre eles estão a secreção exócrina pancreática, liberação de hormônios peptídeos gastrintestinais, contração da musculatura lisa, redução da ingestão alimentar e modulação de funções das células do sistema imunológico (HAMPTON *et al.*, 1998; GONZALES *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 2008; ISCHIA *et al.*, 2009; MAJUMDAR & WEBER *et al.*, 2011).

Diversas hipóteses sobre a ação biológica desta família de peptídeos sobre a alimentação vêm sendo estudadas nos últimos anos. Durante a refeição, o *GRP* é liberado na corrente sanguínea, sugerindo que, através de efeitos neuronais e humorais, o *GRP* age sobre os sinais de saciedade (KATEB & MERALI, 1992) e sobre a motilidade intestinal e os reflexos peristálticos

(GRIDER, 2004). Desde as décadas de 70 e 80, estudos vêm mostrando que a administração periférica de peptídeos da família bombesina, tanto de BB como *GRP*, inibem a ingestão alimentar (GIBBS *et al.*, 1979; PARROT & BALDWIN, 1982; STUCKEY *et al.*, 1985), em diferentes espécies animais, incluindo humanos (PARROT & BALDWIN, 1982; FIGLEWICZ *et al.*, 1985; GUTZWILLER *et al.*, 1994). *GRP* e BB são similares em suas ações sobre a alimentação mesmo quando administradas perifericamente (GIBBS *et al.*, 1979; STEIN & WOODS, 1982) ou centralmente (LADENHEIM & RITTER, 1988; PLAMODON *et al.*, 1998). Em mamíferos a infusão intraventricular de BB induziu a hipotermia e hiperglicemia em ratos (LADENHEIM & GUSS, 1995).

2.4 ANTAGONISTA SINTÉTICO DE RECEPTORES DE *GASTRIN-RELEASING PEPTIDE* (*GRPR*) – RC-3095

O RC-3095 é uma droga sintetizada em laboratório e age como antagonista dos receptores de BB/*GRP*. O RC-3095 foi desenvolvido para uma possível aplicação clínica no tratamento de neoplasias, tais como pancreática, gástrica, mama e carcinoma pulmonar (MAHMOUD, 1989; MILANOVIC, 1992; QIN, 1994a; QIN, 1994b), através da ligação em receptores BB/*GRP* específicos, que pode levar a inibição do crescimento tumoral e diminuição de mediadores pró-inflamatórios. A administração subcutânea em ratos de RC-3095 em doses diárias entre 10 mg/kg e 20 mg/kg de peso corporal está associada com regressão de marcadores tumorais, sem efeitos tóxicos importantes relacionados ao tratamento (QIN, 1994a; CHATZISTAMOU, 2000).

Diversos mediadores têm sido implicados na gênese e perpetuação de doenças inflamatórias agudas. A administração intratraqueal de BB induz resposta inflamatória em babuínos (GULLUOGLU, 1999). As doenças inflamatórias agudas, especificamente hepatite, síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) e sepse podem ser alvo para o tratamento com inibidores de *GRP*, uma vez que a função imune elevada está associada a estas doenças (DAL-

PIZZOL *et al.*, 2006). Mais recentemente, alguns estudos tem demonstrado que o RC-3095 tem efeito anti-inflamatório em artrite (OLIVEIRA *et al.*, 2008) e modelos de sepsis (DAL-PIZZOL *et al.*, 2006; PETRONILHO *et al.*, 2007), diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como a IL-1, IL-6 e o *TNF- α* . O *GRPR* tem sido encontrado expresso em células do sistema imune (ZHOU *et al.*, 2011). A inflamação é uma resposta imune de proteção iniciada pela exposição das células imunológicas aos sinais de infecção ou injúria (MEDZHITOV, 2010) e a migração de neutrófilos para os sítios de inflamação pode promover dano tecidual (NATHAN, 2002), apesar desta ação também ser crítica para a cicatrização das áreas afetadas (BANNENBERG & SERHAN, 2010). Interessante é que o RC-3095 modula a liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ativados, o que leva a uma diminuição do dano oxidativo, de infiltração inflamatória e da disfunção orgânica, sem modular a liberação de interleucina-10 (IL-10) que é antiinflamatória, o que sugere que o caminho intracelular modulado por BB/*GRP* é seletivo para citocinas pró-inflamatórias (GUO, 2001).

Alterações nos níveis de *GRP* no SNC de humanos têm sugerido o envolvimento do *GRP* em outras desordens psiquiátricas como anorexia e bulimia nervosa, bem como nos transtornos de humor (CUTTITTA, 1985; MOODY, 1992). Está bem estabelecido que a administração de BB suprime a ingestão alimentar em ratos (LADENHEIM & GUSS, 1995), camundongos (HOGGARD, 2007) e humanos (GUTZWILLER *et al.*, 1994). A introdução exógena deste peptídeo gera muitas respostas, incluindo a regulação da secreção exócrina e endócrina pelo TGI, contração da musculatura lisa, pressão arterial, glicemia, temperatura corporal e crescimento celular. O RC-3095 pode atuar também inibindo a secreção ácida no estômago se associado com omeprazol, apresentando um efeito protetor contra lesões gástricas induzida por danos oxidativos (PETRONILHO, 2009).

O efeito do RC-3095 é mais proeminente se a substância é infundida dentro do quarto ventrículo na região cerebral (SCHALLY, 1997). Administrações sistêmicas de antagonistas dos receptores de BB atenuam a redução da ingestão alimentar induzida pela BB (FEKETE *et al.*,

2002) e a infusão do antagonista seletivo de *GRPR* dentro do quarto ventrículo melhora a ingestão alimentar em estudo realizado com ratos (MARTINS, 2005; TSUSHIMA, 2005; FEKETE *et al.*, 2007). Desde a década passada, a evidência do envolvimento de peptídeos como a BB e *GRP* na regulação da ingestão alimentar é consistente visto que as disfunções deste sistema podem contribuir para as desordens psiquiátricas que afetam a ingestão alimentar, incluindo anorexia nervosa, bulimia e depressão (MCDONALD, 1978; MOODY, 1992; YAMADA, 2000).

2.5 ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM PACIENTES COM CÂNCER

Os pacientes com câncer necessitam de acompanhamento nutricional precoce, pois a desnutrição é um fator agravante da imunodepressão predispondo o organismo às infecções e complicações metabólicas (EYS *et al.*, 1998; WAITZBERG *et al.*, 2011). O próprio tratamento antineoplásico pode levar os pacientes à desnutrição, pois alguns dos efeitos adversos mais frequentes são gastrointestinais, entre eles a anorexia, a xerostomia, a mucosite oral, a plenitude gástrica e as alterações do paladar. Todos estes efeitos levam a uma redução da ingestão de alimentos pela via oral, podendo causar uma perda de peso involuntária e indesejada, especialmente no início do tratamento, pois um longo caminho ainda terá que ser percorrido (EYS *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2006; BORGES *et al.*, 2010; WANDERLEY *et al.*, 2011). Cerezo *et al.* (2005) observaram que a perda de peso pode ser mais acentuada em pacientes com tumores disseminados e que aqueles pacientes que apresentaram perda de peso mais grave tiveram piores taxas de sobrevida.

A anorexia ocorre em cerca de 40% dos pacientes com câncer no momento do diagnóstico e em mais de dois terços dos doentes terminais (MORLEY, 2002). De acordo com Waitzberg *et al.* (2004) em 100 pacientes com câncer avançado e em cuidados paliativos, a anorexia esteve presente em 66%, enquanto na oncologia infantil, a proporção é maior, pois 80% dos pais das crianças falecidas por câncer informaram queixas de anorexia em seus filhos no decorrer da

doença. A etiologia da anorexia é desconhecida, podendo ser considerada um fenômeno biopsicossocial, pois muitos fatores intervêm em sua aparição, entre elas substâncias já bem estudadas liberadas pelo próprio tumor e pelo hospedeiro, em resposta à presença da neoplasia (ERIC, 2013). A anorexia constitui a principal causa de ingestão alimentar deficiente, conduzindo a um progressivo comprometimento do estado nutricional e imunológico, o que pode levar à SAC (YOUNES & NOGUCHI, 2000; MORLEY, 2002; VAN HALTEREN *et al.*, 2003). A origem da SAC é multifatorial e ocorre secundariamente à inabilidade na ingestão ou utilização dos nutrientes. Pode estar associada a alterações mecânicas do TGI, como obstruções ou má-absorção, intervenções cirúrgicas ou toxicidade às drogas (FEARON *et al.*, 2006; CONSENSO BRASILEIRO DE CAQUEXIA E ANOREXIA, 2011). O aumento do consumo energético pelo tumor, a liberação de substâncias que agem no centro da saciedade diminuindo o consumo alimentar e as citocinas produzidas pelo hospedeiro e pelo tumor levam às anormalidades metabólicas características da SAC (GROSSBERG *et al.*, 2010).

O *TNF- α* é produzido pelo estímulo de células do sistema retículo endotelial e é a primeira citocina pró-inflamatória associada com a caquexia em resposta à endotoxina (RUBIN, 2003). A administração de *TNF- α* induz caquexia, resultante da diminuição da ingestão alimentar e balanço nitrogenado negativo, sendo que administrações repetidas induzem tolerância ao *TNF- α* , minimizando a influência na ingestão alimentar (YOUNES & NOGUCHI, 2000; ARGILÉS *et al.*, 2003). Essa citocina está associada ao aumento da lipólise por ser capaz de inibir a lipase lipoprotéica e a proteólise (INADERA *et al.*, 2002; TISDALE, 2002). De acordo com Contente *et al.* (2002) o aumento do cortisol e glucagon, diminuição de insulina, resistência à insulina, anemia, febre e aumento do gasto energético, tanto em animais como em humanos, podem estar associados à presença de *TNF- α* na corrente sanguínea. Outra citocina pró-inflamatória é a IL-1, que pode ser sintetizada por macrófagos e monócitos, mas também células endoteliais, fibroblastos, epitélio intestinal e, ainda, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos podem sintetizar IL-1 (CARVALHO *et al.*, 1992; KIM *et al.*, 1997; INADERA *et al.*, 2002). A infusão de IL-1 induz

saciedade, o que diminui a ingestão de alimentos e de água, sendo considerada um antagonista do NPY (McCARTHY, 2003). Esta interleucina parece produzir os mesmos efeitos do *TNF- α* , mas não age sobre o músculo e seus efeitos em induzir a caquexia tornam-se menos potentes do que os do *TNF- α* (DINARELLO, 2009). A IL-6 é uma outra citocina produzida por macrófagos, monócitos, fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (KISHIMOTO *et al.*, 1992). Seus efeitos no metabolismo intermediário de glicose em hepatócitos são semelhantes aos da IL-1, porém menos potentes (LAVIANO *et al.*, 1995). Altas concentrações circulantes de IL-6 são associadas à perda de peso em alguns pacientes com linfoma, câncer de pulmão e colorretal (RODRIGUEZ *et al.*, 2005).

As complexas consequências clínicas da desnutrição têm sido bem demonstradas nos últimos anos em muitos ensaios clínicos prospectivos e meta-análises (MATOS, 2007; STRATTON & ELIA, 2007). A desnutrição é um fator de risco independente com um efeito significativo sobre os parâmetros clínicos de mortalidade, morbidade, taxas de complicações, tempo de internação, tolerância ao tratamento, qualidade de vida e prognóstico (KRUIZENGA *et al.*, 2005; SOMANCHI *et al.*, 2011).

3 JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

Pacientes com neoplasia maligna frequentemente apresentam perda de apetite e diminuição da ingestão alimentar, que contribuem para a desnutrição e a SAC, aumentando o risco de morbimortalidade.

BB e *GRP* são peptídeos expressos na glândula pituitária, cérebro, pâncreas e no trato gastrintestinal (OHKI-HAMAZAKI, IWABUCHI, MAEKAWA, 2005). Estudos com a administração destes peptídeos têm demonstrado supressão da ingestão alimentar (FEKETE et al., 2007). O RC-3095, um antagonista sintético de receptores deste tipo de peptídeos, desenvolvido inicialmente para uma possível aplicação clínica no tratamento de neoplasias (MAHMOUD, 1989; MILANOVIC, 1992), vem sendo relacionado com diversos mecanismos comportamentais e de resposta ao estresse. A maioria destes estudos foi realizado com infusões da substância intracerebral ou utilizado em situações clínicas específicas.

O presente estudo investigou se a administração intraperitoneal de RC-3095 em ratos Wistar saudáveis, submetidos a perda ponderal, alterou seu peso, ingestão alimentar e composição corporal, bem como a sua relação com exames laboratoriais e liberação de citocinas pró-inflamatórias. A importância desta pesquisa deve-se principalmente ao impacto que a diminuição da ingestão alimentar e a perda ponderal involuntária causam em indivíduos doentes, afetando diretamente seu estado nutricional, podendo repercutir na evolução do tratamento e nos índices de qualidade de vida. Este trabalho visa testar uma substância com potencialidade terapêutica de melhorar a ingestão alimentar, o peso corporal e conseqüentemente a composição corporal.

4 OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do RC-3095 sobre o peso, ingestão alimentar, parâmetros bioquímicos e metabólicos e a composição corporal de ratos Wistar submetidos a perda ponderal.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir a ingestão alimentar dos ratos.
- Medir o desenvolvimento ponderal dos ratos.
- Comparar níveis séricos de albumina, glicose, HDL-colesterol, colesterol total, triglicerídeos, amilase e hemograma no início e ao final do estudo.
- Comparar os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias *TNF- α* , IL-1 e IL-6 no início e ao final do estudo.
- Determinar a quantidade de massa magra e massa adiposa dos animais ao final do estudo.

5 MÉTODOS

5 MÉTODOS

5.1 ESTUDO EXPERIMENTAL

5.1.1 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado considerando dois grupos: um grupo que receberia a maior dose de infusão, igual a 1,0 mg/kg/dia de RC-3095 e um G0, que receberia soro fisiológico. Para mostrar uma diferença no percentual de gordura corporal dos ratos de 6% ($31,35 \pm 1,09$ para $25,05 \pm 0,31$) conforme o autor DeLany *et al.* (1999), o maior número de animais encontrado foi 32. Acrescentado 10% para eventuais perdas, o número final de animais estimado foi de 36.

A partir deste número e, de acordo com a escala de infusão do RC-3095 em 0,1 mg/kg/dia, 0,3 mg/kg/dia e 1,0 mg/kg/dia, foram definidos oito animais para cada grupo respectivamente e 12 para o G0.

O nível de significância considerado foi de 0,05 com poder estatístico de 90%.

5.1.2 Animais e local da pesquisa

Foram utilizados ratos Wistar sadios, machos, adultos jovens, com sessenta dias de vida, com peso entre 200 g e 300 g, adquiridos do biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul. O estudo foi desenvolvido na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no Centro de Pesquisas, entre dezembro de 2010 e janeiro de 2011. No dia da chegada, os animais foram pesados e mantidos em caixas individuais, com ciclo claro-escuro de 12 horas, em ambiente com temperatura controlada de $22^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ e com oferta de água a vontade. A ração oferecida durante todo o período do estudo foi da marca

Nuvilab[®] com a seguinte composição: proteína bruta de 22% a 22,5%, gordura de 4,4% a 4,65%, CH de 53% a 55% e um total de energia metabolizável de 2.950 kcal/kg. No período de ambientação os animais não foram submetidos a nenhum procedimento invasivo ou gerador de estresse, conforme regulamento local.

5.1.3 Indução da perda ponderal e divisão dos grupos

Nos primeiros três dias do período de ambientação, foi realizado um controle de ingestão de ração, a partir da oferta de 30g diárias para cada animal. A partir do valor médio consumido foi calculada inicialmente uma redução de 30% de ração para iniciar a indução da perda ponderal, conforme Calingasan & Gibson (2000) e Agüero *et al.* (2006). No sétimo dia os animais foram pesados e calculado o percentual de perda de peso. De acordo com esta perda ponderal, a redução da ração para os próximos dois dias foi ajustada individualmente reduzindo em 20%, para aqueles animais que já haviam perdido pelo menos 5% do peso inicial, reduzida em 30%, para aqueles animais que haviam perdido entre 2% e 5% e, reduzida em 40%, para aqueles animais que haviam perdido menos de 2% de peso corporal. No 11^o dia os animais foram pesados novamente e calculado o percentual de perda de peso. A partir desta informação foi realizado novo ajuste de ração, sendo reduzida em 10%, para aqueles animais que já haviam perdido 10% do peso inicial, mantida em 30% de redução para aqueles animais que haviam perdido entre 8% e 10%, em 40% de redução para aqueles animais que haviam perdido entre 5% e 8% e, em 50% para aqueles animais que haviam perdido menos do que 5% do peso corporal. No 14^o dia da ambientação, e com uma perda ponderal média de 7% do peso corporal inicial, os animais foram sorteados para um dos quatro grupos: 11 animais no G0, oito animais no G1, oito no G2 e oito no G3. A partir deste dia, considerado o primeiro dia da intervenção do estudo, a ração não foi mais reduzida, sendo ofertada a todos os animais *ad libitum*.

5.1.4 Administração do RC-3095

Os animais receberam injeções intraperitoneais diárias de RC-3095 (Zentaris AG, Frankfurt, Alemanha), em doses escalonadas, divididas para cada um dos grupos, durante os 14 dias de intervenção. O G0 recebeu solução de cloreto de sódio a 0,9% (soro fisiológico) da marca *B Braun*[®] no volume máximo de 2 ml. O G1 recebeu 0,1 mg/kg/dia de RC-3095, o G2 recebeu 0,3 mg/kg/dia de RC-3095 e o G3 recebeu 1,0 mg/kg/dia de RC-3095, diluídos em no máximo 2 ml de soro fisiológico. As injeções foram administradas pela pesquisadora com seringa de 3 ml e agulha 0,45 x 13 mm diretamente no peritônio, no quadrante superior direito.

5.1.5 Coleta de amostras de sangue inicial

No primeiro dia da intervenção, antes da primeira injeção do RC-3095 ou soro fisiológico, foram coletadas amostras de sangue de todos os animais. A médica veterinária, responsável pela UEA, realizou a coleta de sangue com os animais anestesiados com isoflurano 5V%, vaporizado em 100% de O₂, através de máscara facial. Com os animais posicionados em decúbito ventral, um tubo capilar de micro-hematócrito foi inserido no canto medial do olho, em direção à orelha oposta, até atingir o plexo localizado atrás do globo ocular. Após a coleta de 4 ml, o capilar foi retirado e as pálpebras foram fechadas para fazer a hemostasia. Amostras de 1 ml de sangue foram acondicionadas em microfrascos com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (em inglês, *EDTA*), para a realização do hemograma, e armazenadas em geladeira a cada dez coletas, para serem entregues ao laboratório de análises do HCPA no mesmo turno. Outros 2 ml de sangue foram acondicionados em tubos a vácuo 13 mm x 75 mm com gel separador para realização da dosagem de glicemia, albumina, amilase e perfil lipídico. O volume restante de sangue foi levado até o Laboratório de Análise Molecular e Proteínas (UAMP) no HCPA, para a posterior realização das análises das citocinas pró-inflamatórias. O soro destas amostras foi armazenado em freezer em

temperatura -80°C , após 10 minutos de centrifugação, a 4.000 rotações por minuto (rpm), sob a temperatura de -4°C , utilizando-se o equipamento *Refrigerated Centrifuge*, modelo 4237R, da marca *Jouan*[®], fabricado na Itália.

5.1.6 Eutanásia e coleta de amostras de sangue final

Após os 14 dias do estudo, os animais foram eutanasiados em câmara de eutanásia da marca Biotécnicas[®], que faz duas entradas de gás carbônico (CO_2), onde permaneceram por um tempo total de quatro minutos. Logo após a eutanásia, foram coletadas novas amostras de sangue, pela mesma médica veterinária, desta vez através de punção cardíaca, com os mesmos procedimentos e encaminhamentos relacionados a coleta de sangue realizada no primeiro dia do estudo.

5.1.7 Análise das citocinas pró-inflamatórias

A análise da concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e *TNF- α* foi realizada no UAMP do HCPA, pelas biólogas da UAMP e do Serviço de Endocrinologia do HCPA, auxiliadas pela pesquisadora do estudo, pelo método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, específico para cada citocina, conforme os *kits* comerciais descritos abaixo:

- **IL-1 (pg/ml)** – foi utilizado o *kit* comercial *Rat IL-1 β Tissue Culture ELISA (eBioscience[®])*, cat # 88-6010-22, seguindo-se o protocolo conforme recomendado pelo fabricante (Anexo 1).
- **IL-6 (pg/ml)** – foi utilizado o *kit* comercial *Rat IL-6 ELISA Set (BD Bioscience[®])*, cat 550319, seguindo-se o protocolo conforme recomendado pelo fabricante (Anexo 2).

- **TNF- α (pg/ml)** – foi utilizado o *kit* comercial *Rat TNF- α ELISA (eBioscience®)*, cat# 887340-88, seguindo-se o mesmo protocolo da IL-1, conforme recomendado pelo fabricante (Anexo 1).

5.1.8 Análise da composição corporal

Para a análise da composição corporal as amostras precisaram ser preparadas, conforme orientação do Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Logo após a eutanásia, as carcaças dos animais foram embaladas em sacos plásticos comuns e congeladas, em freezer da marca Consul®, a uma temperatura média de -18° C, na UEA. As carcaças foram sendo descongeladas, de três em três, a temperatura ambiente, evisceradas, separados o fígado, removida a pele e retirada patas e cabeça. Carcaças evisceradas, fígados e peles foram novamente congelados, separadamente, no mesmo freezer citado acima, para análise da quantidade de proteína, gordura e cinzas. Ainda congeladas, as carcaças foram processadas em moedor, para a obtenção de uma massa homogênea de músculos, ossos e cartilagens e armazenadas no freezer do Laboratório. Todos os procedimentos de preparo das carcaças foram realizados pela pesquisadora. As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal que faz parte do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

O método utilizado para a determinação de gordura, proteínas e cinzas foi o método de *Weende*, desenvolvido em 1860, na Estação Experimental de *Weende* na Alemanha. É um método de compreensão universal e até hoje não foi encontrado um substituto aceito mundialmente. A maioria dos requisitos legais para produtos alimentícios se baseia no esquema de *Weende*. O método de *Weende* é também conhecido como análise bromatológica completa ou análise proximal do alimento, e incluem as determinações de umidade (matéria seca), cinzas (matéria orgânica), extrato etéreo, fibra bruta e extrativos não nitrogenados (ENN).

As técnicas para a análise da composição corporal seguiram padronização do Laboratório de Nutrição Animal, descritas conforme anexos: Matéria Seca (Anexo 3), Proteína (Anexo 4), Extrato Etéreo (Anexo 5) e Cinzas (Anexo 6).

5.1.9 Variáveis estudadas

- **Peso corporal** - coletado diariamente em balança digital da marca Marte® com precisão de 0,01 g.
- **Alimentação** - toda a ração oferecida e a ração ingerida foram pesadas diariamente na mesma balança digital da marca Marte® com precisão de 0,01 g.
- **Exames de sangue** - coletados no primeiro e no 14º dia de intervenção:
 - **Hemograma, albumina, glicose, HDL-colesterol, colesterol total, amilase e triglicerídeos**
 - **Citocinas pró-inflamatórias: IL-1, IL-6 e TNF- α .**
- **Composição corporal - ao final do estudo, no 14º dia de intervenção:**
 - **carcaça:** quantidade de proteína, gordura e cinzas em percentual;
 - **fígado:** quantidade de proteína e gordura em percentual;
 - **pele:** quantidade de gordura em percentual.

5.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa elaborado para o desenvolvimento deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA, conforme consta na Resolução do Projeto número 09-294.

Todos os procedimentos realizados com os animais no estudo estavam de acordo com o *Guide for the Care and use of laboratory animals* e as recomendações de cuidado de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

5.3 ANÁLISE DOS DADOS

As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão, exceto para análise das citocinas pró-inflamatórias, onde foi utilizado o erro-padrão da média. Para comparar os quatro grupos em relação às variáveis quantitativas foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA) *One-Way* (distribuição simétrica) ou a ANOVA para medidas repetidas, para as variáveis que foram medidas em diferentes momentos. As comparações múltiplas foram realizadas com ajuste de Bonferroni.

O programa utilizado para análise estatística foi o SPSS-*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 18.0, Inc., Chicago-IL, USA, 2009 e pertence ao GPPG do HCPA. O nível de significância adotado foi de 5% ($P \geq 0,05$).

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 35 ratos Wistar, adultos jovens, com sessenta dias de vida.

6.1 PESO CORPORAL

Antes do início da restrição alimentar, a média de peso dos animais foi de 290,53 g ($\pm 17,95$ g). No terceiro dia, após a redução da ração em 30% da ração, a média de peso foi de 286,84 g ($\pm 17,63$ g), que corresponde a uma perda ponderal de 1,23% ($\pm 2,68\%$). No sétimo dia, depois de ajustada individualmente a redução da ração, entre 20% e 50% a menos, a média de peso dos animais foi de 273,71 g ($\pm 17,87$ g), equivalendo a uma perda ponderal de 5,78% ($\pm 2,15\%$). Deste dia até o primeiro dia da intervenção, os animais foram pesados diariamente e a redução de ração novamente ajustada de maneira individual. No 10^o dia, na véspera do início da intervenção, o peso médio foi de 270,10 g ($\pm 16,52$ g) equivalendo a 7,00% ($\pm 1,88\%$) de perda ponderal, conforme ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Peso corporal e percentual de perda ponderal durante o período de restrição alimentar

Dia	Peso em gramas (\pm DP)	Perda peso, % (\pm DP)
1^o	290,53 ($\pm 17,95$)	–
3^o	286,84 ($\pm 17,63$)	-1,23 ($\pm 2,68$)
7^o	273,71 ($\pm 17,87$)	-5,78 ($\pm 2,15$)
8^o	273,16 ($\pm 17,96$)	-5,98 ($\pm 1,98$)
9^o	270,10 ($\pm 16,52$)	-7,00 ($\pm 1,88$)

Os dados foram expressos em média (\pm DP). N: 35 animais

Um animal foi excluído do estudo antes da divisão dos grupos porque não diminuiu o peso durante todo o período de restrição alimentar, provavelmente porque ingeriu suas fezes. No momento do sorteio dos quatro grupos, os 35 animais apresentavam peso similar ($F: 2.26; df: 3; P = 0,101$), em torno de 270,10 g ($\pm 16,52$). Foram sorteados 11 animais para o Grupo G0, que receberam soro fisiológico, oito animais para o G1, que receberam 0,1 mg/kg/dia de RC-3095, oito animais para o G2, que receberam 0,3 mg/kg/dia de RC-3095 e oito animais para o G3, que receberam 1,0 mg/kg/dia de RC-3095, uma vez ao dia. A partir deste dia, iniciou o período de intervenção, sendo considerado o primeiro dia do estudo (D1).

O Gráfico 1 demonstra a média diária de peso, por grupos, durante os 14 dias da intervenção. Todos os animais ganharam peso de maneira semelhante ($F: 1.145; df: 9.685; P = 0,338$), sendo que a média de peso dos animais do G2 foi superior quando comparada a média de peso dos animais do G0 ($P = 0,042$), de acordo com as comparações múltiplas ajustadas por Bonferroni.

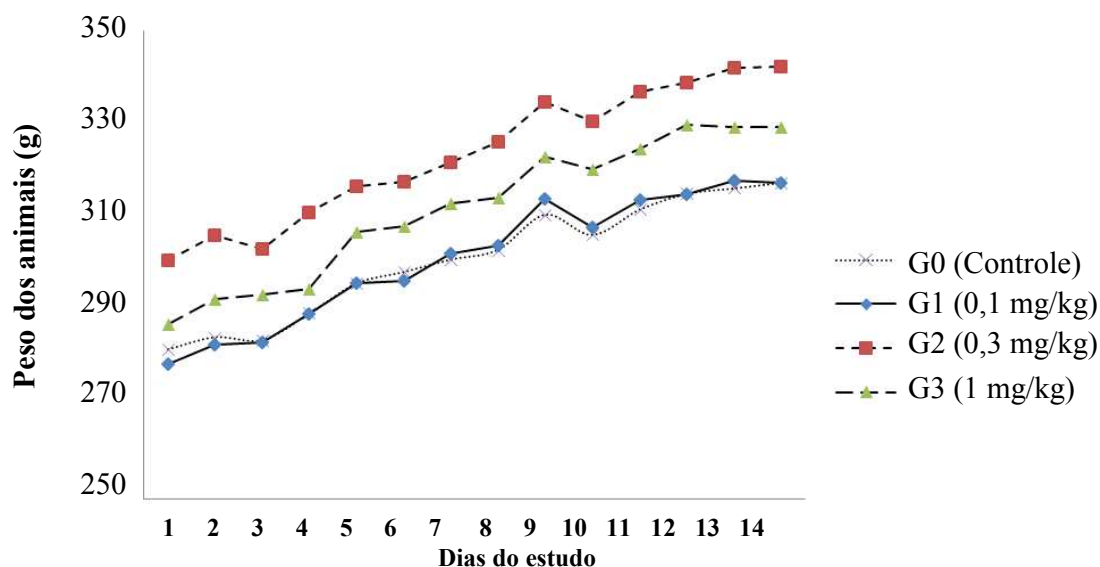


Gráfico 1 - Média de peso diária dos animais de acordo com os grupos. Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). P_1 : Comparação entre os momentos: ($F: 358,4; df: 3,228; P_1 < 0,001$). P_2 : Comparação entre os grupos: ($F: 3,488; df: 3; *P_2 = 0,027$). P_3 : Interação entre os momentos e os grupos ($F: 1,145; df: 9,685; P_3 = 0,338$). De acordo com as comparações múltiplas ajustadas por Bonferroni, o G2 mostrou média de peso superior quando comparado ao G0 ($*P = 0,042$). Grupo 0 (G0: controle): $N = 11$ animais que receberam injeção intraperitoneal de soro fisiológico, Grupo 1 (G1): $N = 8$ animais que receberam 0,1 mg/kg de RC-3095, Grupo 2 (G2): $N = 8$ animais que receberam 0,3 mg/kg de RC-3095 e Grupo 3 (G3): 8 animais que receberam 1,0 mg/kg de RC-3095, uma vez ao dia.

A média do peso dos animais, de acordo com os grupos, no D1 e no D14 está demonstrada na Tabela 2. Houve diferença significativa do peso do D1 para o D14 em todos os grupos (F: 511,605; df: 1; $P < 0,001$) e entre os grupos (F: 3,505; df: 3; $P = 0,027$). Entretanto, a interação entre os momentos e os grupos não mostrou significância estatística (F: 0,791; df: 3; $P = 0,508$), bem como o ganho de peso em percentual entre os grupos (F: 0,572; df: 3; $P = 0,638$), conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 2 - Média do peso dos animais no D1 e D14

Grupos	Peso D1 gramas (\pm DP)	Peso D14 gramas (\pm DP)
0 (controle)	265,21 (\pm 24,06)	317,66 (\pm 24,26)
1 (0,1 mg/kg)	260,14 (\pm 11,22)	317,51 (\pm 12,61)
2 (0,3 mg/kg)	280,21 (\pm 8,72)	342,51 (\pm 10,75)
3 (1,0 mg/kg)	271,96 (\pm 13,65)	329,46 (\pm 17,61)

Os dados foram expressos em média (\pm DP). Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). P_1 : Comparação entre os momentos (D1 x D14) (F: 511,605; df: 1; $P < 0,001$); P_2 : Comparação entre os grupos (F: 3,505; df: 3; $P = 0,027$); P_3 : Interação entre os tempos e os grupos (F: 0,791; df: 3; $P = 0,508$). Grupo 0 (G0: controle): $N = 11$ animais que receberam injeção intraperitoneal de soro fisiológico, Grupo 1 (G1): $N = 8$ animais que receberam 0,1 mg/kg de RC-3095, Grupo 2 (G2): $N = 8$ animais que receberam 0,3 mg/kg de RC-3095 e Grupo 3 (G3): 8 animais que receberam 1,0 mg/kg de RC-3095, uma vez ao dia.

Tabela 3 - Porcentagem de ganho de peso de acordo com os grupos

Grupos	Ganho de peso % (\pm DP)
0 (controle)	19,98 (\pm 4,49)
1 (0,1 mg/kg)	22,11 (\pm 3,55)
2 (0,3 mg/kg)	22,28 (\pm 3,78)
3 (1,0 mg/kg)	21,22 (\pm 5,19)

Os dados foram expressos em média (\pm DP). Análise de variância (ANOVA). Comparação do ganho de peso em % entre os grupos: (F: 0,572; df: 3; $P = 0,638$). Grupo 0 (G0: controle): $N = 11$ animais que receberam injeção intraperitoneal de soro fisiológico, Grupo 1 (G1): $N = 8$ animais que receberam 0,1 mg/kg de RC-3095, Grupo 2 (G2): $N = 8$ animais que receberam 0,3 mg/kg de RC-3095 e Grupo 3 (G3): 8 animais que receberam 1,0 mg/kg de RC-3095, uma vez ao dia.

6.2 INGESTÃO ALIMENTAR

De acordo com a ANOVA para medidas repetidas, a variação da média diária de ingestão alimentar foi diferente estatisticamente entre os grupos ao longo do período de intervenção (F: 2,196; df: 19,324; $P = 0,004$). Foi observado que em alguns momentos a quantidade de alimento ingerido variou diferentemente entre os grupos (F: 3,139; df: 3; $P = 0,039$). Por exemplo, no D5, o G0 foi o grupo que mais ingeriu ração, enquanto que nos outros dias isso não foi observado. Porém, de acordo com as comparações múltiplas ajustadas por Bonferroni, os animais do G2, quando comparados aos animais do G0, apresentaram uma média de ingestão alimentar maior ao longo do estudo ($P = 0,041$), conforme demonstrado no Gráfico 2.

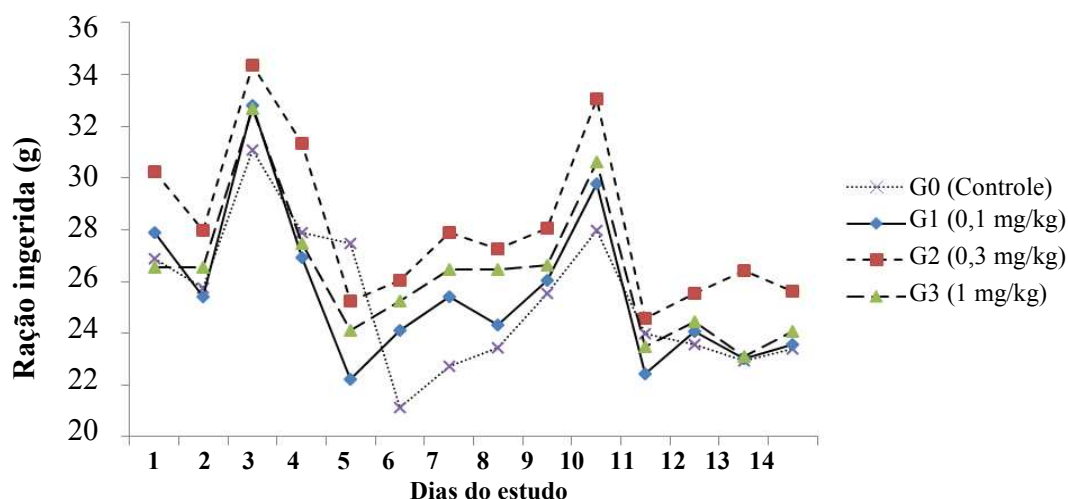


Gráfico 2 - Média diária de ingestão alimentar de acordo com os grupos. Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). Interação entre os momentos e os grupos: (**F: 2,196; df: 19,324; P = 0,004**). Comparação entre os grupos (**F: 3, 139; df: 3; P: 0,039**). De acordo com as comparações múltiplas ajustadas por Bonferroni, o G2 mostrou média de ingestão alimentar superior quando comparado ao G0 (***P = 0,041**). Grupo 0 (G0: controle): N = 11 animais que receberam injeção intraperitoneal de soro fisiológico, Grupo 1 (G1): N = 8 animais que receberam 0,1 mg/kg de RC-3095, Grupo 2 (G2): N = 8 animais que receberam 0,3 mg/kg de RC-3095 e Grupo 3 (G3): 8 animais que receberam 1,0 mg/kg de RC-3095, uma vez ao dia.

6.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS

Foram realizadas 35 coletas de sangue no D1 e no D14, sendo que duas amostras de sangue coletadas no D1 e 26 amostras coletadas no D14 para determinação do hemograma coagularam. O motivo deste alto número de coletas coaguladas no D14 foi em decorrência da utilização de volume excessivo de sangue para o anticoagulante contido nos microfrascos. Por este motivo, não foram realizadas análises do hemograma neste estudo, conforme estava previsto.

Quanto aos níveis séricos de albumina, estes se mantiveram estáveis quando comparados os valores do D1 com os obtidos no D14 (F: 1,754; df: 1; P = 0,195). Os níveis séricos de amilase, glicose, HDL-colesterol e colesterol total, aumentaram do D1 para o D14 (P < 0,001), mas sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Entretanto, os níveis de triglicerídeos apresentaram interação entre os momentos e os grupos (F: 3,761; df: 3; P = 0,021), conforme demonstrado na Tabela 4. De acordo com as comparações múltiplas ajustadas por Bonferroni, o G2 quando comparado com o G0 (controle) apresentou uma média significativamente mais alta de triglicerídeos no D14 (P = 0,038).

Tabela 4 – Parâmetros metabólicos e bioquímicos no D1 e no D14

	G0: controle	G1: 0,1 mg/kg	G2: 0,3 mg/kg	G3: 1,0 mg/kg	P₁	P₂	P₃
Albumina (g/dl)							
D1	4,19 (± 0,14)	4,26 (0,14)	4,20 (± 0,20)	4,18 (± 0,09)			
D14	4,10 (± 0,16)	4,17 (± 0,11)	4,15 (± 0,15)	4,26 (± 0,18)	0,195	0,494	0,174
Valor F: gl					F: 1,754; gl: 1	F: 0,818; gl: 3	F: 1,769; gl: 3
Amilase (U/l)							
D1	2364,7 (± 235,1)	2461,4 (± 376,9)	2347,6 (± 167,2)	2407,6 (± 218,7)			
D14	2740,5 (± 230,2)	2742,5 (± 274,6)	2800 (± 134,5)	2827,5 (± 160,5)	< 0,001	0,922	0,231
Valor F: gl					F: 171,1; gl: 1	F: 0,161; gl: 3	F: 1,511; gl: 3
Glicose (mg/dl)							
D1	138,5 (± 7,3)	136 (± 13,8)	133,1 (± 12,0)	140,7 (± 15,3)			
D14	275 (± 99,5)	237,8 (± 65,4)	280,7 (± 61,7)	210 (± 78,7)	< 0,001	0,322	0,188
Valor F: gl					F: 71,402; gl: 1	F: 1,212; gl: 3	F: 1,695; gl: 3
Colesterol Total (mg/dl)							
D1	47 (± 5,4)	48 (± 7,1)	47,7 (± 5,8)	47,7 (± 6,4)			
D14	51,3 (± 6,1)	51,1 (± 6,4)	54,4 (± 8,1)	52,7 (± 5,7)	< 0,001	0,922	0,627
Valor F: gl					F: 20,925; gl: 1	F: 0,161; gl: 3	F: 0,589; gl: 3
HDL-colesterol (mg/dl)							
D1	17,8 (± 2,0)	18,9 (± 2,9)	17,5 (± 2,5)	17,6 (± 2,7)			
D14	22,5 (± 2,6)	21,6 (± 2,26)	22,1 (± 3,3)	22,5 (± 2,6)	< 0,001	0,984	0,267
Valor F: gl					F: 106,115; gl: 1	F: 0,052; gl: 3	F: 1,381; gl: 3
Triglicerídeos (mg/dl)							
D1	53,3 (± 19,3)	59,4 (± 16,8)	59,1 (± 27,2)	63 (± 21,7)			
D14	99,5 (± 29,7)	115,8 (± 41,1)	153,7 (± 54,9)	148,1 (± 51,1)	< 0,001	0,102	0,021
Valor F: gl					F: 135,56; gl: 1	F: 2,255; gl: 3	F: 3,761; gl: 3

Os dados foram expressos em média (± DP). Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). **P₁**: Comparação entre os momentos (D1 x D14); **P₂**: Comparação entre os grupos; **P₃**: Interação entre os tempos e os grupos. **F**: Fisher-Snedecor; **gl**: graus de liberdade. De acordo com as comparações múltiplas ajustadas por Bonferroni, o G2 mostrou um aumento maior da média dos triglicerídeos comparado com o G0 (**P = 0,038**). Grupo 0 (G0: controle): N = 11 animais que receberam injeção intraperitoneal de soro fisiológico, Grupo 1 (G1): N = 8 animais que receberam 0,1 mg/kg de RC-3095, Grupo 2 (G2): N = 8 animais que receberam 0,3 mg/kg de RC-3095 e Grupo 3 (G3): 8 animais que receberam 1,0 mg/kg de RC-3095, uma vez ao dia.

6.4 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Apenas a IL-6 foi detectada nas amostras de acordo com o teste *ELISA*. Os níveis de IL-1 e *TNF- α* do soro dos animais foram indetectáveis pelo mesmo teste, portanto descartados da análise dos dados. A Tabela 5 apresenta os resultados de IL-6, mostrando uma redução nos níveis séricos do D1 para o D14 de maneira uniforme entre os grupos (F: 1,478; df: 3; $P = 0,240$).

Tabela 5 - Níveis séricos de IL-6 no D1 e no D14

	G0 (controle)	G1 (0,1 mg/kg)	G2 (0,3 mg/kg)	G3 (1,0 mg/kg)	P_1	P_2	P_3
IL-6 (pg/ml)							
D1	54,65 ($\pm 5,01$)	46,2 ($\pm 6,23$)	60,15 ($\pm 11,84$)	67,74 ($\pm 16,15$)			
D14	33,31 ($\pm 9,53$)	20,37 ($\pm 2,67$)	37,3 ($\pm 10,50$)	18,29 ($\pm 3,91$)	< 0,001	0,625	0,240
Valor F: gl					F: 31,048; gl: 1	F: 0,593; gl: 3	F: 1,478; gl: 3

Os dados foram expressos em média e erro padrão da média (\pm EP). Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). P_1 : Comparação entre os momentos (D1 x D14); P_2 : Comparação entre os grupos; P_3 : Interação entre os tempos e os grupos. **F**: Fisher-Snedecor; **gl**: grau de liberdade. Grupo 0 (G0: controle): $N = 11$ animais que receberam injeção intraperitoneal de soro fisiológico, Grupo 1 (G1): $N = 8$ animais que receberam 0,1 mg/kg de RC-3095, Grupo 2 (G2): $N = 8$ animais que receberam 0,3 mg/kg de RC-3095 e Grupo 3 (G3): 8 animais que receberam 1,0 mg/kg de RC-3095, uma vez ao dia.

6.5 COMPOSIÇÃO CORPORAL

A análise da composição corporal foi realizada a partir da determinação da quantidade de proteína e gordura da carcaça e do fígado e da quantidade de gordura da pele dos animais. De acordo com a *ANOVA One-way* não houve diferença estatisticamente significativa na composição corporal dos animais entre os grupos. As proporções médias de proteína (massa magra) e gordura (massa gorda), conforme os grupos e compartimentos estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição corporal dos ratos de acordo com os grupos

Compartimentos	G0 (controle)	G1 (0,1 mg/kg)	G2 (0,3 mg/kg)	G3 (1,0 mg/kg)	P	F; gl
Carcaça (%)						
Proteína	54,94 (± 3,26)	58,30 (± 4,01)	56,53 (± 2,88)	56,82 (± 5,26)	0,335	F:1,176; gl: 3
Gordura	33,62 (± 5,08)	31,67 (± 4,58)	32,14 (± 3,25)	32,80 (± 5,78)	0,828	F:0,297; gl: 3
Fígado (%)						
Proteína	73,48(± 1,34)	73,89(± 1,29)	71,81(± 1,55)	72,72(± 2,09)	0,061	F:2,742; gl: 3
Gordura	13,72(± 2,29)	11,91(± 2,72)	14,12(± 2,37)	12,75(± 2,03)	0,242	F:1,471; gl: 3
Pele (%)						
Gordura	27,13 (± 4,85)	26,31(± 5,25)	28,53 (± 3,51)	28,58 (± 6,60)	0,766	F:0,383; gl: 3

Os dados foram expressos em média e desvio-padrão (±DP). Análise de variância *One-way* (ANOVA). **P**: Comparação entre os grupos; **F**: Fisher-Snedecor; **gl**: graus de liberdade. Grupo 0 (G0: controle): *N* = 11 animais que receberam injeção intraperitoneal de soro fisiológico, Grupo 1 (G1): *N* = 8 animais que receberam 0,1 mg/kg de RC-3095, Grupo 2 (G2): *N* = 8 animais que receberam 0,3 mg/kg de RC-3095 e Grupo 3 (G3): 8 animais que receberam 1,0 mg/kg de RC-3095, uma vez ao dia.

A proporção de proteína, gordura e cinzas das carcaças estão representadas no Gráfico 3, de proteína e gordura dos fígados no Gráfico 4 e de gordura das peles no Gráfico 5, de acordo com os grupos de intervenção.

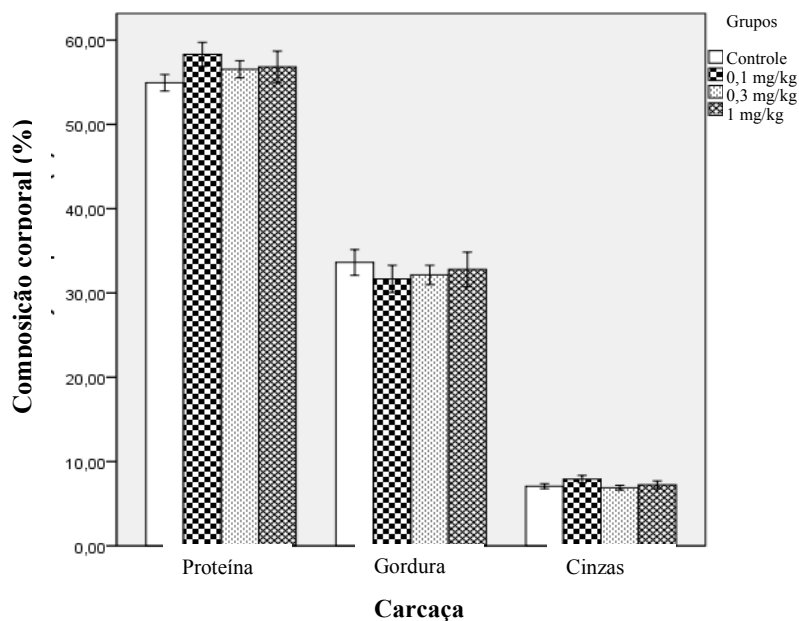


Gráfico 3 - Proporção de proteína, gordura e cinzas da carcaça dos animais de acordo com os grupos. Os dados foram expressos em média e desvio-padrão (\pm DP). Grupo 0 (G0: controle): $N = 11$ animais que receberam injeção intraperitoneal de soro fisiológico, Grupo 1 (G1): $N = 8$ animais que receberam 0,1 mg/kg de RC-3095, Grupo 2 (G2): $N = 8$ animais que receberam 0,3 mg/kg de RC-3095 e Grupo 3 (G3): 8 animais que receberam 1,0 mg/kg de RC-3095, uma vez ao dia.

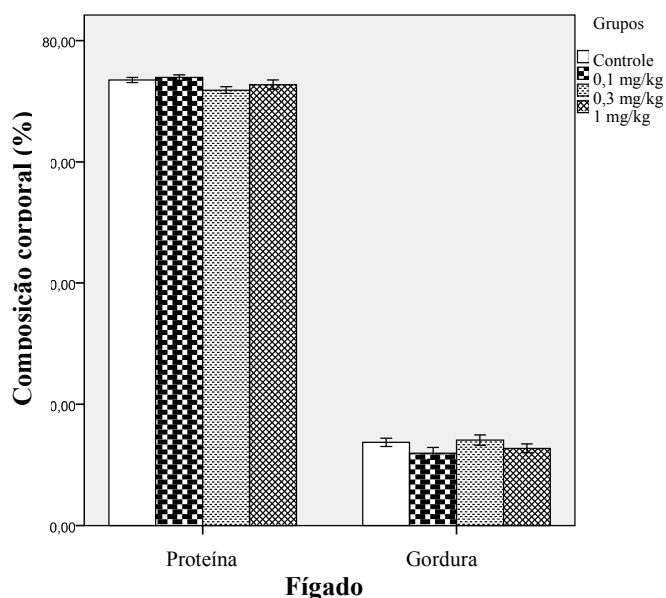


Gráfico 4 - Proporção de proteína e gordura do fígado dos animais de acordo com os grupos. Os dados foram expressos em média e desvio-padrão (\pm DP). Grupo 0 (G0: controle): $N = 11$ animais que receberam injeção intraperitoneal de soro fisiológico, Grupo 1 (G1): $N = 8$ animais que receberam 0,1 mg/kg de RC-3095, Grupo 2 (G2): $N = 8$ animais que receberam 0,3 mg/kg de RC-3095 e Grupo 3 (G3): 8 animais que receberam 1,0 mg/kg de RC-3095, uma vez ao dia.

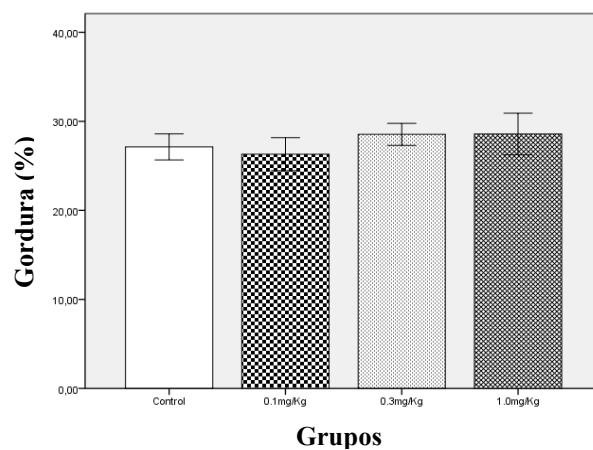


Gráfico 5 - Proporção de gordura da pele dos animais de acordo com os grupos. Os dados foram expressos em média e desvio-padrão (\pm DP). Grupo 0 (G0: controle): $N = 11$ animais que receberam injeção intraperitoneal de soro fisiológico, Grupo 1 (G1): $N = 8$ animais que receberam 0,1 mg/kg de RC-3095, Grupo 2 (G2): $N = 8$ animais que receberam 0,3 mg/kg de RC-3095 e Grupo 3 (G3): 8 animais que receberam 1,0 mg/kg de RC-3095, uma vez ao dia.

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

7.1 INGESTÃO ALIMENTAR E PESO CORPORAL

Os resultados do presente estudo mostram que, em ratos Wistar adultos jovens submetidos a perda ponderal, a injeção intraperitoneal do antagonista do *GRPR*, o RC-3095, na dose intermediária, determinou impacto sobre a ingestão alimentar, média de peso corporal e níveis séricos de triglicérides. Entretanto, nenhum efeito foi demonstrado sobre o ganho de peso, a composição corporal, e demais parâmetros metabólicos e bioquímicos.

Se os efeitos endógenos dos peptídeos da família bombesina estão envolvidos nos sinais de saciedade, espera-se que o antagonismo destes sinais promova a ingestão alimentar ou o prolongamento do tempo das refeições. Um dos trabalhos que norteou a hipótese deste estudo, de que a infusão do antagonista do *GRPR*, o peptídeo RC-3095 aumentaria a ingestão alimentar, foi o de Fekete *et al.* (2002), que estudou 187 ratos machos *CFY*, pesando entre 300 g-345 g. Estes animais receberam doses escalonadas de *GRP*, entre 50 ng e 600 ng, infundidas diretamente na amígdala cerebral bilateral e foi monitorada a ingestão alimentar durante o período de uma hora. Comparando com o G0, não foi observada qualquer influência na ingestão alimentar com as doses de 50 ng e de 600 ng, mas com as doses de 100 ng e 300 ng foi verificado uma diminuição da ingestão alimentar nos primeiros cinco e dez minutos após a injeção de *GRP*. Este efeito foi mais evidente com a dose de 200 ng, sendo observada uma diminuição da ingestão alimentar durante um período de tempo mais prolongado, ou seja, cinco, dez, 20 e 25 minutos após a injeção (FEKETE *et al.*, 2002). O mesmo grupo de pesquisadores em 2007 realizou a infusão intraventricular bilateral de 15 ng, 30 ng ou 60 ng de neuromedina C (NMC) em 68 ratos *CFY*, outro agonista dos receptores *GRP*, e igualmente observou que a dose intermediária foi associada significativamente a redução da ingestão alimentar ao longo de duas horas de observação após a injeção. O grupo que recebeu 30ng foi o que ingeriu menos alimentos durante os primeiros 25

minutos do período de observação (FEKETE *et al.*, 2007). Mesmo sendo dois estudos com a infusão de dois agonistas diferentes do *GRPR*, o *GRP* e a *NMC*, os resultados relacionados a diminuição da ingestão alimentar foram semelhantes. Estes resultados vêm corroborar com a hipótese de que a supressão alimentar induzida pelos agonistas do *GRPR*, não é dose-dependente. Estudando outros desfechos, a partir da infusão do antagonista do *GRPR*, o RC-3095, tais como memória, comportamento, ansiedade, medo e atividade locomotora também foi demonstrado que doses menores ou intermediárias se mostraram mais eficazes do que as doses mais altas (ROESLER *et al.*, 2003; ROESLER *et al.*, 2004a; 2004b; 2004c). Está indicado também no estudo de Venturela *et al.* (2005) que a administração de RC-3095, como droga moduladora de memória produz uma curva invertida de dose resposta, mostrando que as doses mais altas ou mais baixas são igualmente ineficazes.

Com relação a afinidade dos receptores, tem sido sugerido que o *GRP* se liga preferencialmente aos receptores *GRPR*, enquanto que a *BB* tem igual afinidade para receptores *GRPR* ou dos subtipos da família de neuromedinas, como o *NMBR* (WADA *et al.*, 1991). Isto em parte, explicaria porque no estudo de Landenheim *et al.* (1996), a aplicação periférica de *NMB* inibia a ingestão alimentar, mas quando associada ao *GRP*, este efeito foi maior. Como era esperado, considerando esta seletividade dos receptores e mesmo com a injeção do antagonista do *GRPR* em local diferente, no peritônio, encontramos resultados semelhantes, ou seja, houve um consumo alimentar médio maior no grupo que recebeu a dose intermediária de 0,3 mg/kg de RC-3095, quando comparado ao G0.

Outro peptídeo associado a saciedade, secretado pelas células beta pancreáticas no trato gastrintestinal após a ingestão alimentar, é a amilina (RINK *et al.*, 1993). Ao contrário, a grelina, um hormônio peptídeo produzido no estômago, promove a fome e estimula a ingestão alimentar (NAKAZATO *et al.*, 2001). Um estudo com ratos *Sprague Dawley (SD)* pesando entre 250 g-300 g, que avaliou a ingestão alimentar após a administração intraperitoneal de 13 µg/kg de grelina com soro fisiológico, 13 µg/kg grelina com mais 1 µg/kg ou 5 µg/kg amilina ou grelina com mais

4 µg/kg ou 8 µg/kg de BB, mostrou que a BB na dosagem de 8 µg/kg conseguiu bloquear o potente efeito orexígeno da grelina, enquanto que a dose associada mais alta de amilina não conseguiu o mesmo efeito. Esses achados mostram o potente efeito anorexígeno da BB (KOBELT *et al.*, 2006). Grelina, BB e amilina injetados periféricamente induzem uma ativação neuronal em diferentes áreas cerebrais envolvidas na regulação da fome e saciedade, mostrada precocemente pelo gene *Fos*, um marcador que indica a ativação neuronal específica da área cerebral. Este mesmo estudo mediu, através de imuno-histoquímica, a expressão de receptores *Fos-like immunoreactivity (FLI)* no *ARC*, no núcleo *PVN* e no *NTS* do cérebro dos ratos, demonstrando que a administração de grelina pura ou associada a BB expressava mais *Fos* no *ARC* projetando para o *PVN*. É importante salientar que os neurônios ativados pela administração periférica de grelina no *ARC*, contém o *NPY*, um orexígeno bem conhecido (WANG *et al.*, 2002). Pode-se então concluir que possivelmente a BB age no *ARC* inibindo o potente efeito do *NPY* e, que neste estudo ainda estava potencializado pela administração de grelina (SAWCHENKO *et al.*, 1985; LI & ROWLAND, 1996). Estudo semelhante, também com ratos *SD* entre 250 g-300 g, testou a ação de saciedade de outra substância bem conhecida, a leptina, que é um hormônio proveniente do tecido adiposo que sinaliza o término da refeição (MEIER & GRESSNER, 2004), quando administrada isolada ou simultaneamente com a BB. Os animais receberam 3,5 µg de leptina no terceiro ventrículo cerebral e uma hora depois, 0,32 nmol/kg ou 1,0 nmol/kg de BB no peritônio. Logo após a infusão da BB os animais tiveram acesso a dieta líquida, que foi medida nos primeiros 30 minutos. Todas as doses foram combinadas entre si ou com soro fisiológico e o G0 recebeu apenas soro fisiológico. Quando comparado ao G0, os grupos que receberam BB associada a leptina, tiveram uma maior redução da ingestão alimentar do que quando administrados sozinhos. Neste estudo a BB foi administrada uma hora depois da leptina, sustentando a hipótese de que a BB, tanto quanto a leptina, pode afetar a ingestão alimentar e o peso corporal também pela modificação dos sinais de saciedade promovidos pela refeição (LADENHEIM *et al.*, 2005). Em dois estudos da década de 80, foi demonstrado que estado

metabólico e obesidade podem alterar a habilidade dos peptídeos em afetar a ingestão alimentar, incluindo a BB. Quando administrada em ratos sob restrição alimentar, a BB foi menos efetiva para promover saciedade do que quando administrada em ratos recebendo ração *ad libitum* (BILLINGTON *et al.*, 1983; KRALY *et al.*, 1983). Além disso, ratos alimentados com rações ricas em gordura foram menos responsivos ao efeito inibitório da alimentação da BB do que os ratos alimentados com dieta pobre em gordura (COVASA & RITTER, 1998). E por fim, ratos obesos, modificados geneticamente, também responderam menos ao efeito supressor da alimentação quando receberam BB (McLAUGHLIN & BAILE, 1981). Estes estudos sugerem que a diminuição do efeito da leptina devido aos baixos níveis, como nos ratos subalimentados ou pela menor sensibilidade a leptina, como na obesidade ou com as dietas ricas em gordura, sugerem que a resposta diminuída a BB pode ser resultado da interação com a leptina (LADENHEIM *et al.*, 2005). Em nosso estudo, não pudemos fazer tais comparações, pois o antagonista dos receptores do tipo BB, o RC-3095, foi administrado independente do horário das refeições. O que podemos considerar é que nossos animais, mesmo recebendo ração *ad libitum* durante os 14 dias de infusão do RC-3095, foram submetidos a restrição alimentar prévia e diminuição de peso corporal, e talvez por isso os resultados sobre o aumento da ingestão alimentar, apesar de terem sido significativos, não tenham sido mais potentes.

Ao contrário do nosso estudo, outros pesquisadores que examinaram ingestão alimentar e peso corporal, porém em camundongos geneticamente deficientes em *GRPR* ou *NMBR*, não encontraram modificação na quantidade de ração consumida e no peso corporal comparados a camundongos *wild-type* (*WT*) (WADA *et al.*, 1997; HAMPTON *et al.*, 1998; OHKI-HAMAZAKI *et al.*, 1999; LANDENHEIM *et al.*, 2002; MAEKAWA *et al.*, 2004). Houve aumento na quantidade de ração consumida em cada refeição, mas não na quantidade total de alimento ingerido, sugerindo o envolvimento do *GRP/GRPR* na ação de sinalização do término da refeição em camundongos. Estudo de Landenheim *et al.*, em 2002, também com camundongos geneticamente deficientes em *GRPR* ou *NMBR*, injetou intraperitonealmente BB, *GRP* ou *NMB*

demonstrou que a BB e o *GRP* inibiram a ingestão de glicose em camundongos *WT*, mas não em camundongos sem os receptores *GRPR*. Em outro estudo, o *GRP* inibiu a ingestão de glicose tanto em camundongos deficientes em *NMBR* como em *WT* (OHKI-HAMAZAKI *et al.*, 1999), assim como a BB inibiu a ingestão alimentar em camundongos *WT* e sem o receptor *GRPR* (MAEKAWA *et al.*, 2004). Os autores sugerem que para a regulação da ingestão alimentar o *GRP/GRPR* parece ser mais importante do que a *NMB*, pois esta não foi efetiva na supressão da alimentação em camundongos.

Nosso estudo encontrou um peso médio maior nos ratos do G2, que receberam a dose intermediária de 0,3 mg/kg de RC-3095, quando comparados aos ratos do G0. Porém, em relação ao ganho ponderal, medido em percentual durante os 14 dias do estudo, houve um aumento médio em torno de 22% do peso inicial, em todos os grupos, independente da intervenção. Para servir como base comparativa, outro estudo sem nenhuma intervenção durante o mesmo período de 14 dias, conduzido com 84 ratos machos *SD*, com peso entre 225 g e 250 g no dia da chegada, semelhante ao peso dos nossos animais, mostrou aumento de peso corporal maior, em torno de 110 g, equivalente a 33%, recebendo ração padronizada *ad libitum* (WANG *et al.*, 2010). Estudo de Landenheim *et al.* (2002), já citado anteriormente, com modelo de camundongos geneticamente modificados sem o receptor *GRPR*, testou a ingestão alimentar e acompanhou o peso corporal ao longo de 54 semanas de vida dos animais. No período dos testes de ingestão alimentar, onde foram infundidos *NMB* ou *BB*, intraperitonealmente, não houve qualquer modificação na ingestão alimentar. Porém, quando foi infundido *CKK*, substância que independe deste tipo de receptor, houve sim supressão da ingestão alimentar, demonstrando que o consumo alimentar é mediado pelos receptores *GRPR*. Durante este período, não houve ganho de peso corporal significativo. O aumento de 12% do peso corporal só foi demonstrado a partir da semana 45 nos camundongos geneticamente modificados, quando comparado aos camundongos *WT*. Como esta mudança de peso só ocorreu mais para o final da vida, bem após o término do período dos testes, o estudo discute se os animais sem o *GRPR* mantiveram a mesma ingestão calórica ao

longo da vida e, por este motivo, aumentaram de peso, já que sabemos que o gasto energético corporal diminuiu com a idade. Em função do *GRPR* e do receptor do peptídeo orexígeno NPY estar localizados no mesmo centro no hipotálamo, outra hipótese para o ganho ponderal nos camundongos deficientes em *GRPR* ao final da vida é de que a expressão de NPY e seus receptores estão altamente suprimidos no hipotálamo de ratos idosos, justificando a perda de peso da senescência (KMIEC, 2006). Nossos resultados com a infusão do antagonista dos receptores *GRPR* durante 14 dias mostraram que houve impacto no peso corporal médio dos animais do Grupo que recebeu a dose intermediária de RC-3095, quando comparado ao G0. Apesar de ser o mesmo Grupo que apresentou uma ingestão alimentar maior, não foi observado ganho de peso superior total, em percentual, ao final do estudo. Se o nosso estudo tivesse incluído ratos com mais idade ou se o período de intervenção fosse maior do que 14 dias, talvez pudéssemos ter encontrado resultados semelhantes em ganho de peso percentual.

Os efeitos da administração de antagonistas de peptídeos da família BB são mais potentes quando administrados dentro do quarto ventrículo, quando comparado ao terceiro ventrículo (FLYNN, 1989; FLYNN, 1993; MERALI *et al.*, 1993). Pelo fato do quarto ventrículo estar em plena conexão com o NTS, no tronco cerebral, autores sugerem uma requintada seletividade e especificidade para os efeitos supressores da alimentação promovidos pela BB (MOODY & MERALI, 2004). Lesões no NTS suprimem os efeitos da BB injetadas no quarto ventrículo e atenuam os efeitos da administração sistêmica (LADENHEIM & RITTER, 1989). Mesmo tendo conhecimento disso e sabendo que o grupo de pesquisadores do nosso Centro conduz diversos estudos com a infusão no quarto ventrículo, optamos por fazer a infusão intraperitoneal, por ser mais fisiológica. Este foi o primeiro estudo neste Centro, com o antagonista RC-3095, realizado especificamente para avaliar o seu efeito sobre a ingestão alimentar e a composição corporal em ratos Wistar saudáveis.

7.2 PARÂMETROS METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS

Os níveis séricos dos exames coletados em nosso estudo ficaram dentro dos limites da normalidade, tanto no início como ao final do estudo para albumina, amilase, colesterol total e HDL-colesterol. A glicemia no D1 já estava acima do limite superior em todos os quatro grupos, conforme valores de referência para ratos Wistar (EBISUI *et al.*, 2009). No D14 os valores da glicemia chegaram quase ao dobro em todos os grupos, mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa entre os momentos e os grupos. Estudo de Wang *et al.* (2010) com ratos SD mostrou níveis séricos similares aos nossos de glicemia e triglicerídeos, mesmo com os animais recebendo uma dieta rica em gordura e após a infusão de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, em inglês, *Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)* ou Fator Estimulador de Colônias-alfa, em inglês, *Colony-Stimulating Factor (α -CSF)*. Os valores de glicemia se mostraram próximos e os triglicerídeos se mantiveram menos do que a metade dos nossos valores. A insulina, hormônio secretado pelas células β do pâncreas, é o regulador dos níveis de glicose sanguínea e a sua liberação é proporcional aos níveis séricos de glicemia. Sendo assim, a insulina pode ser considerada um dos maiores ativadores dos estoques de energia no tecido adiposo (HILLEBRAND *et al.*, 2002). Níveis altos de insulina cronicamente podem levar a obesidade (KIEFFER & HABENER, 2000). Ao mesmo tempo, se a secreção de GLP-1 está diminuída pode prejudicar a liberação de insulina, aumentando a resistência periférica a insulina, o que poderia levar a distúrbios metabólicos e obesidade (PEARSON *et al.*, 2000). Paralelamente a isso, a liberação de leptina, decorrente do tecido adiposo e em menor quantidade, das células parietais gástricas, é considerada também um sinal periférico de saciedade e os seus níveis séricos também estão correlacionados com massa adiposa (HILLEBRAND, WIED, ADAN, 2002). Conforme já citado anteriormente, o estudo de Ladenheim *et al.* (2005), sugere uma interação entre os efeitos biológicos da BB e da leptina, pois houve uma resposta diminuída sobre a supressão alimentar da BB em ratos com níveis altos de leptina. Isso nos faz pensar que a administração do antagonista

RC-3095 esteja envolvido com os níveis séricos de glicose e, conseqüentemente de insulina e de leptina, interagindo direta ou indiretamente com os estoques de gordura. Neste estudo, como esperado por ser um antagonista, houve o aumento dos níveis séricos de triglicérides no D14, com relação ao D1, no G2 comparado ao G0, e não menos importante, dos níveis séricos de glicose em todos os grupos, mesmo sem significância estatística, o que poderia contribuir para aumentar os estoques de gordura corporal ao longo do tempo.

7.3 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Entre os efeitos biológicos do RC-3095, já demonstrados na literatura (SCHWARTSMANN *et al.*, 2005), está a modulação da resposta inflamatória em doenças inflamatórias intestinais em humanos e animais (GULLUOGLU *et al.*, 1999; TER BEEK *et al.*, 2004) e em modelos experimentais de sepse (DAL-PIZZOL *et al.*, 2006). Conforme demonstrado neste estudo de Dal-Pizzol *et al.* em 2006 e em outro estudo recente de 2012 (CZEPIELEWSKI *et al.*, 2012), houve a diminuição da inflamação seletivamente para interleucinas pró-inflamatórias e *TNF- α* e não para IL-10, que é anti-inflamatória, em cultura de macrófagos peritoneais, sob a ação do RC-3095. Tem sido reportado que tanto em camundongos submetidos a restrição alimentar, como em obesos, os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão aumentados (LEE *et al.*, 2010). Em nosso experimento, a diminuição gradativa e individualizada da ração para redução do peso corporal dos ratos ao longo dos 10 dias, pode não ter gerado um estresse metabólico que induzisse a elevação significativa das citocinas pró-inflamatórias. Talvez por este motivo os níveis de *TNF- α* e IL-1 foram indetectáveis no soro dos animais, tanto no início como no fim da intervenção, não nos permitindo realizar análise comparativa. Em relação a IL-6, um estudo com camundongos obesos, verificou que os níveis de IL-6 alcançaram valores significativamente mais altos naqueles animais que receberam dieta rica em gordura do que naqueles que receberam dieta rica em CH. Porém, quando foi ofertada a dieta rica em CH para aqueles que estavam ingerindo a dieta rica em

gorduras, os níveis de IL-6 diminuíram concomitante com a diminuição do peso corporal (LEE *et al.*, 2010). Este estudo mostrou o envolvimento da IL-6 com o tipo de dieta e o peso corporal, sugerindo a sua interação com os hormônios do tecido adiposo, tais como leptina (XAVIER & SUNYER, 2006). Em nosso estudo, os níveis de IL-6 se mostraram mais altos no D1, logo após o período de restrição alimentar, e diminuíram no D14, quando a dieta já estava *ad libitum*. Porém, quando estes valores foram testados entre os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa, ou seja, a intervenção com o antagonista do *GRPR* em doses escalonadas, não influenciou na diminuição dos níveis de IL-6 nos ratos do estudo.

7.4 COMPOSIÇÃO CORPORAL

Contrário as nossas expectativas, não houve impacto no ganho de peso em percentual, nem diferença estatisticamente significativa na composição corporal entre os grupos, apesar do G2 ter apresentado uma ingestão alimentar e uma média de peso maior do que o G0.

Existem diversos métodos para medir a composição corporal de animais de laboratório, entre eles a ressonância magnética (KUNNECKE *et al.*, 2004; TINSLEY *et al.*, 2004) e a *dual energy X-ray absorptiometry (DEXA)* (LOCHMULLER *et al.*, 2001; BHATTACHARYA *et al.*, 2005). Estudo de Salomé *et al.* em 2009, que administrou em ratos Wistar durante 14 dias, soro fisiológico, grelina ou grelina associada a um antagonista, encontrou ganho de massa gorda e massa magra maior no período, com um aumento de peso real naqueles ratos que receberam grelina isolada. Por este hormônio gastrointestinal ter interação com o *GRP*, esperávamos uma diferença na massa adiposa, já que os níveis de triglicérides também se mostraram elevados ao final do nosso estudo. A discordância dos resultados pode ser explicada em parte, pela metodologia diferente de análise dos compartimentos corporais. O estudo de Salomé *et al.* (2009), usou a DEXA, que pode ser considerado padrão-ouro para determinação da massa óssea e consequentemente da água corporal e massa magra. Este método, além de ter um custo elevado,

não demanda nenhum preparo da carcaça, diferentemente do nosso estudo que necessitou da moagem da carcaça, pele e fígado separadamente, antes da análise de proteína bruta, extrato etéreo e cinzas. Outro estudo com estimulação elétrica do nervo esplênico, também com ratos Wistar, para estímulo do sistema nervoso simpático e redução da ingestão alimentar e aumento de metabolismo, mostrou através de ressonância magnética, um aumento de massa magra, outro método bastante preciso, mas igualmente de elevado custo (WU *et al.*, 2009). Encontramos dificuldade para comparar nossos resultados pela exiguidade de estudos com o mesmo método de análise da composição corporal. Três estudos com a mesma técnica utilizaram camundongos e não ratos Wistar, impossibilitando a comparação dos dados (PARK *et al.*, 1997; WEST *et al.*, 1998; DELANY *et al.*, 1999). A UEA do HCPA não dispunha de nenhum método para este tipo de análise. Por esta razão, e em parceria com o Laboratório de Nutrição Animal da UFRGS, analisamos os ratos com os mesmos procedimentos realizados para animais de médio porte como suínos e aves, o que consideramos uma importante limitação do nosso estudo.

Outras limitações deste estudo incluem o fato do modelo animal utilizado não ter neoplasia maligna e de não termos um Grupo de animais sem intervenção nenhuma, inclusive de perda ponderal, para que pudéssemos ter valores para fins comparativos de ganho ponderal fisiológico dos animais.

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Os animais que receberam RC-3095 na dose intermediária de 0,3 mg/kg apresentaram ingestão alimentar e peso médio maiores do que os animais que receberam soro fisiológico.

Os níveis séricos de triglicerídeos aumentaram no Grupo que recebeu a dose intermediária de RC-3095, de 0,3 mg/kg. Os demais parâmetros bioquímicos e metabólicos não sofreram influência do antagonista testado.

A administração de RC-3095 não influenciou na composição corporal dos ratos Wistar.

O efeito benéfico deste antagonista sobre a ingestão alimentar e peso dos animais, demonstrado neste estudo, amplia perspectivas de estudos futuros com doses equivalentes, em seres humanos, como alvo terapêutico para a anorexia de pacientes com doenças de alto consumo metabólico como o câncer.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguero G, Villena J, Racedo S, Haro C, Alvarez S. Beneficial immunomodulatory activity of *Lactobacillus casei* malnourished mice pneumonia: effect on inflammation and coagulation. *Nutrition* 2006; 22:810-19.
- Anastasi A, Erspamer V, Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alytensin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes. *Experientia* 1971;27:166-67.
- Argiles JM, Moore-Carrasco R, Fuster G, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(4):405-9.
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, *et al.* Ghrelin is an appetite stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001;120:337-45.
- Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, *et al.* Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 2005;54:18-24.
- Bagdade JD, Bierman EL, Porte Jr D. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *Journal of Clinical Investigation* 1967;46:1549-57.
- Baldelli R, Otero XL, Camina JP, Gualillo O, Popovic V, Dieguez C, *et al.* Growth hormone secretagogues as diagnostic tools in disease states. *Endocrine* 2001;14:95-9.
- Bannenberg G, Serhan CN. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:1260-73.
- Baracos VE, Reiman T, Mourtzakis M, Gioulbasanis I, Antoun S. Body composition in patients with non-small cell lung cancer: a contemporary view of cancer cachexia with the use of computed tomography image analysis. *Am J Clin Nutr* 2010;9(4):1133S-7S.
- Batterham RL & Bloom SR. The gut hormone peptide YY regulate appetite. *Ann N Y Acad Sci* 2003;994:162-68.
- Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS *et al.* Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* 2003;349:914-18.
- Bauer J, Capra S, Ferguson M. Use of the score patient generated subjective global assessment (PG-SGA) as a nutrition assessment tool in patients with cancer. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:779-85.
- Bhattacharya A, Rahman M, Dongxu S, Lawrence R, Mejia W, McCarter R, *et al.* The combination of dietary conjugated linoleic acid and treadmill exercise lowers gain in body fat mass and enhances lean body mass in high fat-fet male Balb-C mice. *J Nutr* 2005;135:1124-30.
- Billington CJ, Levine AS, Morley JE. Are peptides truly satiety agents? A method of testing for neurohumoral satiety effects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1983;245:920-26.
- Bjorbaek C & Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:305-31.

Borges LR, Paiva SI, Silveira DH, Assunção MCF, Gonzalez MCO. Estado nutricional pode influenciar a qualidade de vida de pacientes com câncer? Campinas: Rev. Nutr 2010; 23(5):745-53.

Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC *et al.* Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science 2000;289:2122-25.

Butler PC, Chou J, Carter WB, Wang YN, Bu BH, Chang D *et al.* Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans. Diabetes 1990;39:752-56.

Calingasan NY, Gibson GE. Dietary restriction attenuates the neuronal loss, induction of heme oxygenase-1 and blood-brain barrier breakdown induced by impaired oxidative metabolism. Brain Research 2000;885:62-9.

Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:1319-24.

Camilleri M, Papathanasopoulos A, Odunsi ST. Actions and therapeutic pathways of ghrelin for gastrointestinal disorders. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2009;6(6):343-52.

Carvalho EB, Correia MM, Torres HOG. Câncer. In: Carvalho EB. Manual de suporte nutricional. Rio de Janeiro: Medsi 1992. p. 221-32.

Cerezo L. Diagnóstico del estado nutricional y su impacto en el tratamiento del câncer. Oncología (Barc). Madrid, Mar 2005;28(3).

Chatzistamou I, Schally AV, Sun B, Armatis P, Szepeshazi K. Inhibition of growth of OV01063 human epithelial ovarian cancers and c- jun and c- fos oncogene expression by bombesina antagonists. Br J Cancer 2000;83(7):906-13.

Chen CY, Fujimiya M, Asakawa A, Chang FY, Cheng JT, Lee SD, *et al.* At the cutting edge: ghrelin gene products in food intake and gut motility. Neuroendocrinology 2009;89(1):9-17b.

Cisternas JR. Fisiologia da Ilhotas de Langerhans. In: Tratado de fisiologia aplicado a nutricao. Sao Paulo: Robe Editorial 2002. p. 791-804.

Consenso Brasileiro de Caquexia e Anorexia (CBCA). Revista Brasileira de Cuidados Paliativos 2011;3(3):7.

Continente AJC, Pluvins CC, Martinez CV. Nutrición y neoplasias digestivas. Rev Bras Nutr Clin 2002;17(Supl 1):53-63.

Cooper PC, Fielding R, Visser M, van Loon LJ, Rolland Y, Orwoll E, *et al.* Tool in the assessment of sarcopenia. Calcif Tissue Int 2013;93(3):201-10.

Coronha AL, Camilo ME, Ravasco P. A importância da composição corporal no doente oncológico. Acta Med Port 2011;24(S4):769-78.

Covasa M & Ritter RC. Rats maintained on high-fat diets exhibit reduced satiety in response to CCK and bombesin. Peptides 1998;19:1407-15.

Crawley JN & Beinfeld MC. Rapid development of tolerance to the behavioural actions of cholecystokinin. Nature 1983;302:703-06.

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;50:1714-9.

Cupples WA. Physiological regulation of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:1439-43.

Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, *et al.* Bombesin-like peptides can function as autocrine growth in human small cell lung cancer. *Nature* 1985;316:823-36.

Czepielewski RS, Porto BN, Rizzo LB, Roesler R, Abujamra A, Pinto LG, *et al.* Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) mediates chemotaxis in neutrophils. *PNAS* 2012;109:547-52.

Dal-pizzol F, DiLeone LP, Ritter C, Martins MR, Reinke A, Pens Gelain D, *et al.* Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:84-90.

Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, *et al.* Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000;141:4255-4261a.

Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsukura S, Kangawa K, *et al.* Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:477-80b.

Davis MP, Dreicer R, Walsh D, Lagman R, Legrand SB. Appetite and cancer-associated anorexia: a review. *J Clin Oncol* 2004;22(8):1510-7.

De la Cour CD, Norlen P, Hakanson R. Secretion of ghrelin from rat stomach ghrelin cells in response to local microinfusion of candidate messenger compounds: a microdialysis study. *Regul Pept* 2007;143(1-3):118-26.

De Wied D. Neuropeptides and behavior. *Ned Tijdschr Geneesk* 1974;118:1865-69.

Delany JP, Blohm F, Truett AA, Sciameca JC, West DB. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am J Physiol* 1999; 276(4):1172-79.

Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519-50.

Ebisui L, Fontes RS, Lapchik VB. In: Cuidado e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Editora Atheneu 2009. p. 229-50.

Eric P. Olanzapine: Palliative Medicine Updat. *Am J Hosp Palliat Care* Feb 2013;3 (1):75-82.

Erspamer V, Erspamer GF, Inselvini M. Some pharmacological actions of alytensin and bombesin. *J Pharm Pharmacol* 1970;22:875-6.

Erspamer V. Discovery, isolation and characterization of bombesin-like peptides. *Ann N Y Acad Sci* 1988;547:3-9.

Eys JV. Benefits of nutritional intervention on nutritional status, quality of life and survival. *Int J Cancer* 1998;(Supl 11):66-8.

Fearon KC, Voss AC, Husted DS. Cancer Cachexia Study Group. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1345 e 50.

Fekete E, Vigh J, Bagi EE, Lénárd L. Gastrin-releasing peptide microinjected into the amygdala inhibits feeding. *Brain Research* 2002;955:55-63.

Fekete EM, Bagi EE, Tóth K, Lénárd L. Neuromedin C microinjected into the amygdala inhibits feeding. *Brain Research Bulletin* 2007;71:386-92.

Figlewicz DP, Stein LJ, Woods SC, Porte Jr. D. Acute and chronic gastrin-releasing peptide decreases food intake in baboons. *Am J Physiol* 1985;248:578-83.

Flynn FW. Fourth ventricle bombesin injection suppresses ingestive behaviors in rats. *Am J Physiol* 1989;256:R590-6.

Flynn FW. Fourth ventricular injection of selective bombesin receptor antagonists facilitates feeding in rats. *Am J Physiol* 1993;264:R218-21.

Friedman JM. The function of Leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 2002;60:1-14.

German J, Kim F, Schwartz GJ, Havel PJ, Rhodes CJ, Schwartz MW, *et al.* Hypothalamic leptin signaling regulates hepatic insulin sensitivity via a neurocircuit involving the vagus nerve. *Endocrinology* 2009;150(10):4502-11.

Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *Journal of Comparative Physiology and Psychology* 1973;84:488-95.

Gibbs J, Fauser DJ, Rowe EA, Rolls BJ, Rolls ET, Maddison SP. Bombesin suppress feeding in rats. *Nature* 1979;282:208-10.

Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, *et al.* The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2988.

Gonzales N, Moody TW, Igarashi H *et al.* Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:58-64.

Grider JR. Gastrin-releasing peptide is a modulatory neurotransmitter of the descending phase of the peristaltic reflex. *Am J Physiol* 2004;287:G1109-G15.

Grossberg AJ, Scarlett JM, Marks DL. Hypothalamic mechanisms in cachexia. *Physiol Behav* 2010;100(5):478-489. Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, *et al.* Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res* 1997;48:23-9.

Gulluoglu BM, Kurtel H, Gulluoglu MG, Aktan AO, Yegen BC, Dizdaroglu F *et al.* Bombesin ameliorates colonic damage in experimental colitis. *Dig Dis Sci* 1999;44(8):1531-38.

Guo YS, Hellmich MR, Wen XD, Townsend CM Jr. Activator protein-1 transcription factor mediates bombesin-stimulated cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2001;276(25):22941-7.

Gutzwiller JP, Drewe J, Hildebrand P, Rossi L, Lauper JZ, Beglinger C. Effect of intravenous human gastrin-releasing peptide on food intake in humans 1994;106:1168-73.

Halford JCG & Harrold JA. Neuropharmacology of human appetite expression. *Dev Disabil Res Rev* 2008;14:158-64.

Hampton LL, Ladenheim EE, Akeson M, Way JM, Weber C, Sutliff VE *et al.* Loss of bombesin-induced feeding suppression in gastrin-releasing peptide receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:3188-92.

Haqq AM, Farooqi IS, O'Rahilly S, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, *et al.* Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:174-8.

Hildebrand P, Petrig C, Buckhardt B, Ketterer S, Lengsfeld H, Fleury A. Hydrolysis of dietary fat by pancreatic lipase stimulated cholecystokinin releases. *Gastroenterology* 1998;114:123-9.

Hillebrand JJG, Wied D, Adan RAH. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 2002;23:2283-306.

Hoggard N, Bashir S, Cruickshank M, Speakman JR. Expression of neuromedin B in adipose tissue and its regulation by changes in energy balance. *J Mol Endocrinol* 2007;39:199-210.

Hopkinson JB, Okamoto I, Addington-Hall JM. What to eat when off treatment and living with involuntary weight loss and cancer: a systematic search and narrative review. *Support Care Cancer* 2011;19:1-7.

Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, *et al.* A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996;273:974-7.

Huhmann MB, Scuningham R. Importance of nutritional screening in treatment of cancer related weight loss. *Lancet Oncol* 2005;6:334-43.

Inadera H, Nagai S, Dong HY, Matsushima K. Molecular analysis of lipid-depleting factor in a colon-26-inoculated cancer cachexia model. *Int J Cancer* 2002;101(1):37-45.

Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: are neuropeptides the key? *Cancer Res* 1999;59:4493-501.

_____. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin* 2002;52(2):72-91.

Ischia J, Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrin-releasing peptide: different forms, different functions. *Biofactors* 2009;35:69-75.

Iwabuchi M, Ui-Tei K, Yamada K, Matsuda Y, Sakai Y, Tanaka K *et al.* Molecular cloning and characterization of avian bombesin-like peptide receptors: new tools for investigating molecular basis for ligand selectivity. *Br J Pharmacol* 2003;139:555-66.

Jeffery E, Sherriff J, Langdon C. A clinical audit of the nutritional status and need for nutrition support amongst head and neck cancer patients treated with radiotherapy. *Australasian Medical Journal* 2012;5(1):8-13.

Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV. International union of pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 2008;60:1-42.

Kateb CC, Merali Z. A single meal elicits regional changes in bombesin-like peptide levels in the gut and brain. *Brain Res* 1992;596:10-6.

Khoshnevis N, Ahmadizar F, Alizadeh M, Akbari ME. Nutritional assessment of cancer patients in Tehran, Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2012;13:1621-6.

Kieffer TJ & Habener JF. The adipoinular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E1-14.

Kim GS, Kim CH, Choi CS, Park JY, Lee KU. Involvement of different second messengers in parathyroid hormone and interleukin-1-induced interleukin-6 and interleukin production in human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 1997;12:896-902.

Kishimoto T, Akira S, Taniuchi T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm of cytokines. *Science* 1992;258:593-7.

Kissileff HR, Pi-Sunyer FX, Thornton J, Smith GP. C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. *American Journal of Clinical Nutrition* 1981;34:154-60.

Kmiec Z. Central regulation of food intake in ageing. *Journal of Physiol Pharmacol* 2006;57(6):7-16.

Kobelt P, Goebel M, Stengel A, Schmidtman M, Voort IR, Tebbe JT, *et al.* Bombesin, but not amylin, blocks the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:903-13.

Kojima M & Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005;85(2):495-522.

Kojima M & Kangawa K. Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ* 2008;46:89-115.

Kojima M & Kangawa K. Ghrelin: from gene to physiological function. *Results Probl Cell Differ* 2010;50:185-205.

Kraly FS, Miller LA, Gibbs J. Diurnal variation for inhibition of eating by bombesin in the rat. *Physiol Behav* 1983;31:395-9.

Kruizenga HM, van Tulder MW, Seidell JC, Thijs A, Ader HJ, Van Bokhorst-de van der Schueren MA. Effectiveness and cost-effectiveness of early screening and treatment of malnourished patients. *Am J Clin Nutr* 2005;82(5):1082-9.

Kunnecke B, Verry P, Benardeau A, von Kienlin M. Quantitative body composition analysis in awake mice and rats by magnetic resonance relaxometry. *Obes Res* 2004;12(10):1604-15.

Ladenheim EE & Ritter RC. Low-dose fourth ventricular bombesin selectively suppresses food intake. *Am J Physiol* 1988;255(24):R988-R2.

_____. Caudal hindbrain participation in suppression of feeding by central and peripheral bombesin. *Society Neurosci Abstr* 1989;15:964.

Ladenheim EE & Guss JL. Bombesin receptor subtypes: implications in bombesina satiety. *Appetite* 1995;24(3):261.

Ladenheim EE, Wirth KE, Moran TH. Receptor subtype mediation of feeding suppression by bombesin-like peptides. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54(4):705-11.

Ladenheim EE, Hampton LL, Whitney AC, White WO. Disruptions in feeding and body weight control in gastrin-releasing peptide receptor deficient mice. *Journal of Endocrinology* 2002;174:273-81.

Ladenheim E, Emond M, Moran TH. Leptin enhances feeding suppression and neural activation produced by systemically administered bombesin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:473-7.

Larsson LI & Rehfeld JF. Distribution of gastrin and CCK cells in the rat gastrointestinal tract. Evidence for the occurrence of three distinct cell types storing COOH-terminal gastrin immunoreactivity. *Histochemistry* 1978;58:23-31.

Laviano A, Renvyle T, Meguid MM, Yang ZJ, Cangiano C, Rossi Fanelli F. Relationship between interleukin-1 and cancer anorexia. *Nutrition Sep/Oct, 1995;11(Supl 5):680-3.*

Lee IS, Shin G, Choue R. Shifts in diet from high fat to high carbohydrate improved levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in mice fed a high-fat diet. *Endocrine Journal* 2010;57(1):39-50.

Li BH & Rowland NE. Peripherally and centrally administered bombesin induce Fos-like immunoreactivity in different brain regions in rats. *Regul Pept* 1996;62:167-72.

Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *Journal of Clinical Investigation* 1985;75:1144-52.

Lieverse RJ, Jansen JB, Masclee AA, Rovati LC, Lamers CB. Effect of a low dose of intraduodenal fat on satiety in humans: studies using the type A cholecystokinin receptor antagonist loxiglumide. *Gut* 1994;35:501-05.

Lochmuller EM, Jung V, Weusten A, Wehr U, Wolf E, Eckstein F. Precision of high-resolution dual energy X-ray absorptiometry of bone mineral status and body composition in small animal models. *Eur Cell Mater* 2001;20(1):43-51.

Ludvik B, Kautzly-Willer A, Prager R, Thomaseth K, Pacini G. Amylin: history and overview. *Diabet Med* 1997;14(2):S9-S13.

Lutz TA, Del Prete E, Scharrer E. Reduction of food intake in rats by intraperitoneal injection of low doses of amylin. *Physiol Behav* 1994;55:891-95.

Lutz TA. Amylinergic control of food intake. *Physiol Behav* 2006;89:465-71.

Maekawa F, Quah HM, Tanaka K, Ohki-Hamazaki H. Leptin resistance and enhancement of feeding facilitation by melanin-concentrating hormone in mice lacking bombesin receptor subtype-3. *Diabetes* 2004;53(3):570-8.

Mahmoud S, Palaszynski E, Fiskum G, Coy DH, Moody TW. Small cell lung cancer bombesin receptors are antagonized by reduced peptide bond analogues. *Life Sci* 1989;44:367-73.

Majumdar ID & Weber HC. Biology of mammalian bombesin-like peptides and their receptors. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2011;18:68-74.

Marks JL, Porte Jr D, Stahl WL, Baskin DG. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 1990;127:3234-6.

Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver disease. *Hepatology* 2009;50:957-69.

Martins MR, Reinke A, Valvassori SS, Machado RA, Quevedo J, Schwartsmann G et al. Non-associative learning and anxiety in rats treated with a single systemic administration of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095. *Peptides* 2005;26(12):2525-9.

Matos LRC. A desnutrição associada à doença na admissão hospitalar: Um contributo para o rastreio. Dissertação de Mestrado, 2007

Matson CA, Reid DF, Cannon TA, Ritter RC. Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2000;278:R882-R90.

McCarthy DO. Rethinking nutritional support for persons with cancer cachexia. *Biol Res Nurs* 2003;5(1):3-17.

McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, et al. Characterization of a gastrin-releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;90:227-33.

McDonald TJ, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V. A gastrin releasing peptide from the porcine nonnatal gastric tissue. *Gut* 1978;19(9):767-74.

McLaughlin CL, Baile CA. Obese mice and satiety effects of cholecystokinin, bombesin and pancreatic polypeptide. *Physiol Behav* 1981;26:433-7.

Medzhitov R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell* 2010;140:771-6.

Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004;50(9):1511-25.

Merali Z, Moody TW, Coy D. Blockade of brain bombesin/GRP receptors increases food intake in satiated rats. *Am J Physiol* 1993;264:R1031-R4.

Milovanovic SR, Radulovic S, Groot K, Schally AV. Inhibition of growth of PC-82 human prostate cancer line xenografts in nude mice by bombesin antagonist RC-3095 or combination of agonist [D-Trp6]-luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin analog RC-160. *Prostaglandins* 1992;20:269-80.

Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;114:541-8.

Moody TW, Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides* 2004;25:511-20.

- Moody TW, Staley J, Zia F, Coy DH, Jensen RT. Neuromedin B binds with high affinity, elevates cytosolic calcium and stimulates the growth of small-cell lung cancer cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263:311-7.
- Moran TH, Schwartz GJ. Neurobiology of cholecystokinin. *Critical Reviews in Neurobiology* 1994;9:1-28.
- Morley JE. Pathophysiology of anorexia. *Clin Geriatr Med* 2002;18(4):661-73.
- Murphy KG & Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 2006;444(7121):854-9.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, *et al.* A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001;409:194-8.
- Naslund E, Gutniak M, Skogar S, Rossner S, Hellstrom PM. Glucagon-like peptide 1 increase the period of postprandial satiety and slows gastric emptying in obese men. *Am J Clin Nutr* 1998;68:525-30.
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-52.
- Obici S, Feng Z, Karkanas G, Baskin DG, Rossetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nature Neuroscience* 2002;5:566-72.
- Ohki-Hamazaki H, Sakai Y, Kamata K, Ogura H, Okuyama S, Watase K, Yamada K, Wada K. Hyperresponsiveness to palatable and aversive taste stimuli in genetically obese (bombesin receptor subtype-3-deficient) mice. *Physiol Behav* 1999;66(5):863-7.
- Ohki-Hamazaki H. Neuromedin B. *Prog Neurobiol* 2000;62:297-312.
- Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol* 2005;49:293-300.
- Oliveira PG, *et al.* (2008) Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Peptides* 29:1726-31.
- Overduin J, Frayo RS, Grill HJ, Kaplan JM, Cummings DE. Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology* 2005;146:845-50.
- Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza M. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 1997;8(32):853-8.
- Parrot RF & Baldwin BA. Centrally-administered bombesin produces effects unlike short-term satiety in operant feeding pigs. *Physiol Behav* 1982;28:521-4.
- Pearson K, Gingerich RL, Nayak S, Wada K, Wada E, Ahren B. Reduced GLP-1 and insulin responses and glucose intolerance after gastric glucose in GRP receptor-deleted mice. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 2000;279:E956-E62.
- Petronilho F, Roesler R, Schwartzmann G, Dal Pizzol F (2007) Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 6:197-200.

Petronilho F, Araújo JH, Steckert AV, Rezin GT, Ferreira GK, Roesler R et al. Effect of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. *Peptides* 2009;30(8):1460-5.

Plamondon H, Lambert C, Meraly Z. Sustained bombesin exposure results in receptor down-regulation and tolerance to the chronic but not acute effects of bombesin on ingestion. *Brain Res* 1998;782:202-11.

Prado CM, Baracos VE, Mccargar LJ, et al. Sarcopenia as a determinant of chemotherapy toxicity and time to tumor progression in metastatic breast cancer patient receiving capecitabine treatment. *Clin Cancer Res* 2009;15(8):2920-6.

Price J, Penman E, Wass JA, Rees LH. Bombesin-like immunoreactivity in human gastrointestinal tract. *Regul Pept* 1984;9:1-10.

Qin Y, Ertl T, Cai RZ, Halmos G, Schally AV. Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res* 1994a;54:1035-41.

Qin Y, Halmos G, Cai R-Z, Szoke B, Ertl T, Schally AV. Bombesin antagonist inhibit *in vitro* and *in vivo* growth of human gastric cancer and binding of bombesin to its receptors. *J Cancer Res Oncol* 1994b;120:519-28.

Rink TJ, Beaumont K, Koda J, Young A. Structure and biology of amylin. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14:113-8.

Rodríguez L, González C, Flores L, Jiménez-Zamudio L, Graniel J, Ortiz R. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12(4):502-7. doi: 10.1128/CDLI.12.4.502-507.2005.

Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JA, Schwartzmann G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides* 2003;24:1069-74.

Roesler R, Kopschina MI, Rosa RM, Henriques JA, Souza DO, Schwartzmann G. RC-3095, a bombesin-gastrin-releasing peptide antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol* 2004a;486:35-41.

Roesler R, Lessa D, Venturella R, Luft T, Henriques JAP, Schwartzmann G. Hippocampal bombesin/gastrin-releasing peptide receptors are involved in fear-motivated memory but not in innate fear. *FENS Abstr* 2004b;2:A114-5.

Roesler R, Lessa D, Venturella R, Vianna MR, Luft T, Henriques JA, et al. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci* 2004c;19:1041-5.

Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006;5:197-204.

Rosenfeld L. Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem* 2002;48(12):2270-88.

Rubin H. Cancer cachexia: its correlations and causes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(9):5384-9.

Ruiz Garcia V, López-Briz E, Carbonell Sanchis R, Gonzales Perales JL, Bort-Marti S. Megestrol acetate for treatment of anorexia-cachexia syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 3. Art. No: CD004310.DOI:10.1002/14651858.CD004310.pub3.

Rushing PA, Hagan MM, Seeley RJ, Lutz TA, D'Alessio DA, Air EL *et al.* Inhibition of central amylin signaling increases food intake and body adiposity in rats. *Endocrinology* 2001;142:5035.

Salomé N, Hansson C, Taube M, Gustafsson-Ericson L, Egecioglu E, Karlsson-Lindahl L *et al.* On central mechanism underlying ghrelin's chronic pro-obesity effects in rats: new insights from studies exploiting a potent ghrelin receptor antagonist. *Journal of Neuroendocrinology* 2009;21:777-85.

Sanchez J, Oliver P, Palou A, Pico C. The inhibition of gastric ghrelin production by food intake in rats is dependent on the type of macronutrient. *Endocrinology* 2004;145(11):5049-55.

Savastio S, Bellone S, Baldelli R, Ferraris M, Lapidari A, Zanetta F *et al.* Role of ghrelin in the regulation of appetite in children. *Minerva Pediatr* 2006;58(1):21-6.

Sawchenko PE, Swanson LW, Grzanna R, Howe PR, Bloom SR, Polak JM. Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brain-stem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 1985;241:138-53.

Schally AV & Comaru-Schally AM. Hypothalamic and other peptide hormones. In: Holland JF, Frei E, Bast Jr RC, Kufe DE, Morton DL. *Cancer Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins 1997. P. 1067-85.

Schwartsmann G, Roesler R, Dal Pizzol F, Rocha A, Pohlmann P, DiLeone LP. Antagonistas de receptores do tipo bombesina/fator de liberação da gastrina como um novo alvo terapêutico nas neoplasias e outras enfermidades. *Prática Hospitalar* 2005;39:2017-39.

Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404:661-71.

Seufert J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 2004;53(1):152-8.

Sexton PM, Paxinos G, Kenney MA, Wookey PJ, Beaumont K. In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain. *Neuroscience* 1994;62:553-67.

Shiia T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M *et al.* Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:240-4.

Silva MPN. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2006;52(1):59-77.

Silver HJ. Oral strategies to supplement older adults' dietary intakes: comparing the evidence. *Nutr Rev* 2009;67:21-31.

Somanchi M, Tao X, Mullin GE. The facilitated early enteral and dietary management effectiveness trial in hospitalized patients with malnutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* Mar 1, 2011;35:209-16.

Stein LJ & Woods SC. Gastrin releasing peptide reduces meal size in rats. *Peptides* 1982;3:833-35.

Stratton RJ, Elia M. Who benefits from nutritional support: what is the evidence? *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* May 2007;19(5):353-8.

Stuckey JA, Gibbs J, Smith GP. Neural disconnection of gut from brain blocks bombesin-induced satiety. *Peptides* 1985;6:1249-52.

Tanaka M, Naruo T, Nagai N, Kuroki N, Shiiya T, Nakazato M *et al.* Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders. *J Psychiatr Res* 2003a;37:17-22.

Tanaka M, Naruo T, Yasuhara D, Tatebe Y, Nagai N, Shiiya T *et al.* Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 2003b;28:829-35.

Teff KL, Elliott SS, Tscho-p M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M *et al.* Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2963-72.

Ter Beek WP, Muller ES, Van Hogezaand RA, Biemond I, Lamers CB. Gastrin releasing peptide receptor expression is decreased in patients with Chron's disease but not in ulcerative colitis. *J Clin Pathol* 2004;57(10):1047-51.

Thomas DR. Use of orexigenic medications in geriatric patients. *Am J Geriatr Pharmacother* 2011;9(2):97-108.

Thomsen C, Storm H, Holst JJ, Hermansen K. Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2003;77:605-11.

Tinsley FC, Taicher GZ, Heiman ML. Evaluation of a quantitative magnetic resonance method for mouse whole body composition analysis. *Obes Res* 2004;12(1):150-60.

Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2002;2(11):862-71.

Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001;50:707-9.

Tsushima H & Mori M. Mechanisms underlying anorexia after microinjection of bombesin into the lateral cerebroventricle. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80(2):289-96.

Utech AE, Tadros EM, Hayes TG, Garcia JM. Predicting survival in cancer patients: the role of cachexia and hormonal, nutritional and inflammatory markers. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2012;3(4):245-51.

Van Halteren HK, Bongaerts GPA, Wagener DJTH. Cancer cachexia: what is known about its etiology and what should be the current treatment approach? *Anticancer Res* 2003; 23(6):5111-6.

Venturella R, Lessa D, Luft T, Roozendaal B, Schwartzmann G, Roesler R. Dexamethasone reverses the memory impairment induced by antagonism of hippocampal gastrin-releasing peptide receptors. *Peptides* 2005;26:821-5.

Wada E, Way J, Lebacq-Verheyden AM, Battley JF. Neuromedin B and gastrin-releasing peptide mRNAs are differentially distributed in the rat nervous system. *J Neurosci* 1990;10:2917-30.

Wada E, Way J, Saphira K, Kusano AM, Lebacqz-Verheyden D, Coy R, *et al.* cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of neuromedin-B-preferring bombesin receptor. *Neuron* 1991;6:421-30.

Wada E, Watase K, Yamada K, Ogura H, Yamano M, Inomata Y, *et al.* Generation and characterization of mice lacking gastrin-releasing peptide receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997;239:28-33.

Waitzberg DL, Nardi L, Ravacci G, Torrinhas R. Síndrome da anorexia e caquexia em câncer: abordagem terapêutica. In: Waitzberg DL. *Dieta, nutrição e câncer*. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 334-52.

Waitzberg D, Nardi L, Horie L. Desnutrição em câncer. *Revista Onco* 2011;8(2):34.

Wanderley FM, Cardoso RM, Liberali R, Coutinho VF. Estado Nutricional de Pacientes com neoplasia: Revisão Sistemática. *Ensaio e Ciência* 2011;15(4):167.

Wang C, Bomberg E, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hypothalamic ventromedial nucleus increases energy expenditure. *Brain Res* 2010;8(1336):66-77.

Wang L, Saint-Pierre DH, Taché Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2002;325:47-51.

West DB, Fey D, Woods SC. Cholecystokinin persistently suppress meal size but not food intake in free-feeding rats. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 1984;246:R776-R87.

West DB, Greenwood MR, Sullivan AC, Prescod L, Marzullo LR, Triscari J. Infusion of cholecystokinin between meals into free-feeding rats fails to prolong the intermeal interval. *Physiology and Behavior* 1987;39:111-5.

West DB, DeLany JP, Camet PM, Blohm F, Truett AA, Scimeca J. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1998;275:667-72.

Woods SC, Seeley RJ, Porte Jr D, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 1998;280:1378-83.

_____. Signals that influence food intake and body weight. *Physiol Behav* 2005;86:709-16.

Woods SC, D'Alessio DA. Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(11):37-50.

Wu X, McLaughlin L, Polk JP, Chalasani M, Greenway FL, Zheng J. A pilot study to evaluate the effect of splanchnic nerve stimulation on body composition and food intake in rats. *Obes Surg* 2009;19:1581-5.

Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *Journal of Endocrinology* 2005;184:291-318.

Xavier Pi, Sunyer F. The relation of adipose tissue to cardiometabolic risk. *Clinical Cornerstone* 2006;8:S14-S23.

Yamada K, Wada E, Wada K. Bombesin-like peptides: studies on food intake and social behaviour with receptor knock-out mice. *Ann Med* 2000;32(8):519-29.

Yoshimoto A, Mori K, Sugawara A, Mukoyama M, Yahata K, Suganami T *et al.* Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2748-52.

Younes RN, Noguchi Y. Pathophysiology of cancer cachexia. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 2000;55(5):181-93.

Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C *et al.* Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005;310(5750):996-9.

Zhou S, Potts EN, Cuttitta F, Foster WM, Sunday ME. Gastrin-releasing peptide blockade as a broad-spectrum anti-inflammatory therapy for asthma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:2100-5.

10 PAPER

EFFECTS OF THE GASTRIN-RELEASING PEPTIDE (GRP) RECEPTOR ANTAGONIST ON WEIGHT, FOOD INTAKE, BIOCHEMICAL METABOLIC PARAMETERS, AND BODY COMPOSITION OF WISTAR RATS

Effects of the gastrin-releasing peptide (GRP) receptor antagonist on weight, food intake, biochemical metabolic parameters, and body composition of Wistar rats

*Luciane Beitler da Cruz⁽¹⁾, Lauro José Gregianin⁽²⁾, Rafael Roesler⁽³⁾, Gilberto Schwartzmann⁽⁴⁾

Animal Experimental Unit, Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Brazil

- ⁽¹⁾ Clinical Dietitian, MSc, Department of Nutrition and Dietetics of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: lcruz@hcpa.ufrgs.br
- ⁽²⁾ MD, PhD, Pediatric Oncology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Email: lgregianin@hcpa.ufrgs.br
- ⁽³⁾ MD, PhD, Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: rroesler@terra.com.br
- ⁽⁴⁾ MD, PhD, Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. National Institute for Translational Medicine, Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: gschwartzmann@hcpa.ufrgs.br

Conflict of interest: all authors declare no conflict of interest.

* **Corresponding author:** Luciane Beitler da Cruz. Rua Ramiro Barcelos 2350, Serviço de Oncologia Pediátrica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CEP 900135-903, Porto Alegre-RS, Brazil. Phone: (5551) 3359-8672, fax: (5551) 3330-8087. E-mail: lcruz@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Gastrin-releasing peptide (GRP) is involved in several brain and gastrointestinal functions, including pancreatic secretion, gastrointestinal peptide hormone release, and reduction of food intake. We tested the effects of an intraperitoneal injection of the GRP receptor (GRPR) antagonist RC-3095 on food intake, biochemical metabolic parameters, and body composition. Thirty-five young adult male Wistar rats, submitted to a minimal weight loss of 7%, were divided into four groups: the control group (G0) received saline; Group 1 (G1) received 0.1 mg/kg RC-3095; Group 2 (G2) received 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3) received 1.0 mg/kg RC-3095 for 14 days. The mean daily variation of food intake was statistically different between the groups (F: 3.139; df: 3; $P = 0.039$); and G2, which received the intermediate dose of 0.3 mg/kg RC-3095, showed a greater food intake than G0 ($P = 0.041$). There was a similar increase in weight, approximately 22% (F: 0.572; df: 3; $P = 0.638$), as well as a similar mean animal weight (F: 1.145; df: 9.685; $P = 0.338$) between the groups during the study period. However, the mean weight of G2 animals was more than the mean weight of G0 animals ($P = 0.042$). At the end of the study, no difference was observed between the groups in terms of the total lean mass or fat mass from the rat carcass, liver, and skin. Comparing the serum levels of albumin, amylase, glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and interleukin (IL)-6 from day 1 (D1) to D14, there were no statistically relevant differences between the groups. However, the mean triglyceride level in G2 compared to G0 showed a greater increase ($P = 0.038$). In this study, the injection of an intermediate dose of GRPR antagonist RC-3095 (0.3 mg/kg/day) into healthy young adult Wistar rats submitted to weight loss affected food intake and the mean weight. No effects on weight gain, body composition, or biochemical metabolic parameters were observed, except for a great increase in the serum triglyceride levels. These results demonstrate some physiological effects of GRP on food intake and weight, expanding the possibilities of future studies on hunger/satiety and macronutrient metabolism as well as highly stressful conditions like cancer.

Key-words: Antagonist; Biochemical metabolic parameters; Body composition; Food intake; Gastrin-releasing peptide receptor; Wistar rats.

1 Introduction

Gastrin-releasing peptide (GRP) is a mammalian homolog of bombesin (BN), a tetradecapeptide originally isolated from frog skin and chemically characterized from swine gastric tissue due to its intense gastrin-releasing activity [1]. Other peptides that are structurally related to BN have been identified and belong to the BN family [2].

Peptides from the BN family are involved in many physiological functions in animals, cells, and tissue cultures [3], such as cell growth and differentiation in several tumor-derived epithelia [4] as well as activation of inflammatory processes and macrophage migration *in vivo* [5]. GRP plays a role in some brain functions, including circadian rhythm regulation, fear, stress and anxiety response, and memory modulation [6-9], as well as thermoregulation [4]. GRP is also involved in the development and regulation of the immune response, acting directly on GRP receptor (GRPR)-expressing immune cells [10-11]. Furthermore, GRP is overexpressed in cancer cells, and the production of GRP together with GRPR overexpression results in autocrine tumor growth stimulation [12].

In the gastrointestinal tract, the administration of BN affects exocrine pancreatic secretion, gastrointestinal peptide hormone release, smooth muscle contraction, food intake reduction, and functional modulation of immune system cells [4; 13-16]. While eating a meal, GRP is released into the bloodstream, suggesting that, through humoral and neuronal effects, GRP may act on satiety signs, intestinal motility, and peristaltic reflexes [17]. Since the 1970s and 1980s, studies have shown that the peripheral administration of BN family peptides, both BN and GRP, inhibit food intake [18-20] in various animal species including humans [19; 21-24]. GRP and BN have similar influences on food intake, and it does not matter if the peptide is administered peripherally [18; 25] or centrally [26; 27].

RC-3095 is a synthetic antagonist of the GRPR. It was developed and tested for an eventual clinical application in the treatment of cancer [28]. RC-3095 modulates proinflammatory

cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin (IL)-1 by activated macrophages, which leads to diminished oxidative damage, inflammatory infiltration, and organ dysfunction [12; 29]. This antagonist may also act on acid secretion inhibition in the stomach, if associated with omeprazol, affording a protective effect against gastric lesions induced by oxidative damage [30]. Furthermore, systemic administration of BN receptor antagonists decreases the anorexic effect induced by BN [31]; and infusion of the GRPR-selective antagonist inside the fourth ventricle stimulates food intake in rats [32-34]. Evidence of the involvement of peptides such as BN and GRP on food intake regulation it is in accordance with the fact that dysfunction of this system may contribute to psychiatric disorders, such as anorexia nervosa, bulimia, and depression, which affect food ingestion [6-9; 35].

In the present study, we investigated the effects of pharmacological blockade of GRPR by systemic administration of RC-3095 on food intake, weight, body composition, biochemical metabolic parameters, and serum levels of proinflammatory cytokines in healthy Wistar rats submitted to weight loss.

2 Methods

2.1 Animals

Thirty-five 60-day-old adult male Wistar rats, weighing 200-300 g and obtained from the Central Bioterium of the Federal University of Pelotas, Rio Grande do Sul, were maintained at the University Hospital Experimental Animal Facility (UEA, CPE-HCPA). Animals were weighed and housed individually in plastic cages on a 12-h light/dark cycle at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). The rats were allowed *ad libitum* access to water. The pellet food used was Nuvilab (Paraná, Brazil), which contains 22-22.5% crude protein, 4.4-4.65% fat, and 53-55% carbohydrates for a total metabolizable energy of 2953 kcal/kg.

2.2 Weight loss and RC-3095 injection

The control food intake was determined in the first 3 days of habituation. From the amount of food consumed, a 30% reduction in the supply of feed was calculated so that the rats would start losing weight [36; 37]. On the seventh day, the animals were weighed and the weight loss percentage was calculated. According to this weight loss, the supply of feed in the following days was individually calculated, with reductions of 20%, 30%, or 40% to match the weight loss. On the 11th day, the animals were weighed again and a new individual feed adjustment was performed with reductions between 10% and 50%. On the 14th habituation day, a 7% mean weight loss from the initial weight was observed. At this time, the rats were randomly assigned to one of four experimental groups and received an i.p. injection of saline (2 ml) (0.9% NaCl) or RC-3095 (Zentaris, Frankfurt, Germany) dissolved in saline (0.1, 0.3, or 1.0 mg/kg in an injection volume of 2 ml). The number of animals assigned and the dose of each experimental group were as follows: Group 0 (G0; control), $N = 11$, saline; Group 1 (G1), $N = 8$, 0.1 mg/kg RC-3095; Group 2 (G2), $N = 8$, 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3), $N = 8$, 1.0 mg/kg RC-3095. The rats received an injection once a day, using a 3-ml syringe with a 0.45 mm \times 13 mm needle, in the upper right abdominal quadrant. From this day on, the feed was supplied *ad libitum* and the daily amount consumed and the body weight were controlled throughout the 14 days of intervention.

2.3 Biochemical metabolic parameters:

Blood samples were collected at two time points. The first sample was collected before the intervention began, on D1, with rats under the effect of the anesthetic 5% isoflurane, vaporized with 100% O₂ through a facial mask. The collection was performed with a microhematocrit capillary tube inserted in the medial corner of the eye, towards the opposite ear,

until reaching the plexus located behind the ocular globe. After collecting 4 ml of blood, the capillary was removed and the eyelids were closed for local homeostasis. The samples were kept in 13 mm × 75 mm gel separator vacuum tubes to determine glucose, albumin, amylase, and lipid levels. The blood serum was separated and stored in a freezer at -80°C before analysis of IL-6 by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the commercially available Rat IL-6 ELISA Set (BD Bioscience®). On the 14th day of intervention (D14), the animals were euthanatized in a Biotécnicas® euthanasia chamber, which has two inputs for carbon gas (CO₂). They were maintained for 4 min. immediately after euthanasia, the second blood collection was performed through cardiac puncture following the same procedures as the D1 samples.

2.4 Body composition analysis

The carcasses were eviscerated, the livers were separated, and the skin, pads, and heads were removed. The eviscerated carcasses, livers, and skins were stored separately in a freezer at -18° C before the amounts of protein, fat, and ash were analyzed. The frozen carcasses were processed in a grinder to obtain a homogeneous mass of muscle, bone, and cartilage and again stored in the same freezer. The analyses were performed at the Animal Nutrition Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), following the recommendations of the Official Methods of Analysis [38]. Dry matter was analyzed according to method number 930.15; crude protein (lean mass) was analyzed according to method number 984.13, adapted by [39]; ash was analyzed according to method number 942.05; and crude fat (fat mass) was analyzed according to method number 920.39.

2.5 Statistical analysis

The quantitative variables were described by the mean and standard deviation (SD), except that IL-6 was analyzed by the standard error of the mean. To compare the quantitative variables of the different groups, one-way analysis of variance (ANOVA) for symmetric distribution or ANOVA for repeated measures (for the variables that were measured at different time points) was used. The multiple comparisons were performed with the Bonferroni adjustment. The significance level was 5% ($P \leq 0.05$), and all analyses were performed using SPSS, version 18.0, software.

2.6 Ethical considerations

All experimental procedures were performed in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Research and Teaching (DBCA, published by CONCEA, MCTI; http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226494.pdf) and were approved by the institutional animal care committee under protocol number 09-294.

3 Results

3.1 Body weight

Before the start of feed restriction, the mean weight of the animals was 290.53 ± 17.95 g. On the third day, after feed restriction of 30%, the mean weight was 286.84 ± 17.63 g, which corresponds to a weight loss percentage of $1.23 \pm 2.68\%$. On the seventh day, after individual feed reduction adjustment, the mean animal weight was 273.71 ± 17.87 g, which corresponds to a weight loss percentage of $5.78 \pm 2.15\%$. From this day to the first intervention

day, the animals were weighed daily and the feed restriction was individually adjusted. On the tenth day, considering the initial weight, the weight loss percentage was equivalent to $7.00 \pm 1.88\%$, as shown in **Table 1**.

Table 1 - Body weight and weight loss percentage during the feed restriction period

Day	Weight, g (\pm SD)	Weight loss % (\pm SD)
1	290.53 (\pm 17.95)	–
3	286.84 (\pm 17.63)	-1.23 (\pm 2.68)
7	273.71 (\pm 17.87)	-5.78 (\pm 2.15)
8	273.16 (\pm 17.96)	-5.98 (\pm 1.98)
9	270.10 (\pm 16.52)	-7.00 (\pm 1.88)

Data are mean and standard deviation (\pm SD). N: 35 rats.

One animal was excluded because it did not decrease its weight during the feed restriction period, probably because it ingested its droppings. Thirty-five animals were randomly assigned to one of four experimental groups. At this moment, the rats showed similar weights (F: 2.26; df: 3; $P = 0.101$).

Fig. 1 shows the mean daily weight of each group during the 14 days of intervention. Each animal gained a similar amount of weight (F: 1.145; df: 9.685; $P = 0.338$); however, the mean weight of the G2 animals was greater than the mean weight of the G0 animals ($P = 0.042$), according to multiple comparisons with the Bonferroni adjustment.

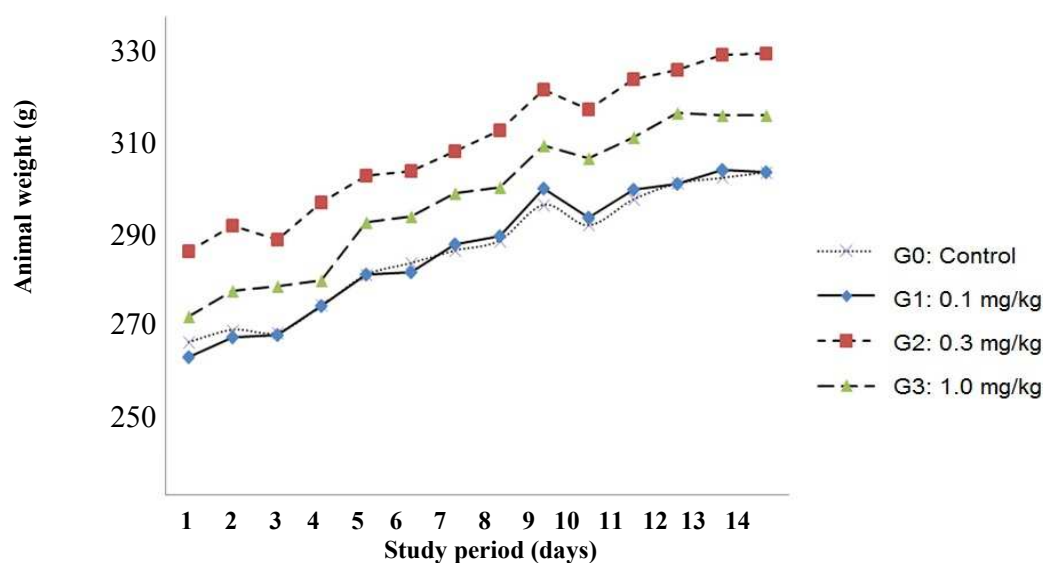


Fig. 1 - Mean daily animal weight according to group. Analysis of variance for repeated measures (ANOVA). P_1 : Comparison between the times: (F: 358.4; df: 3.228; $P_1 < 0.001$). P_2 : Comparison between the groups: (F: 3.488; df: 3; $*P_2 = 0.027$). P_3 : Interaction between the times and groups: (F: 1.145; df: 9.685; $P_3 = 0.338$). According multiple comparisons with the Bonferroni adjustment, G2 showed a greater mean weight compared to G0 ($*P = 0.042$). Group 0 (G0: control): $N = 11$, animals received an i.p. injection of saline; Group 1 (G1): $N = 8$, animals received 0.1 mg/kg RC-3095; Group 2 (G2): $N = 8$, animals received 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3): $N = 8$, animals received 1.0 mg/kg RC-3095, once a day.

The mean animal weights, according to groups, on D1 and D14 are shown in **Table 2**.

There were significant differences in the weights on D1 and D14 in all of the groups (F: 511.605; df: 1; $P < 0.001$) and between the groups (F: 3.505; df: 3; $P = 0.027$). Therefore, the interaction between the times and groups was not statistically significant (F: 0.791; df: 3; $P = 0.508$); in addition, the weight gain percentage between the groups was not statistically significant (F: 0.572; df: 3; $P = 0.638$), as shown in **Table 3**.

Table 2 - Mean weight of animals on D1 and D14

Group	D1 Weight, g (\pm SD)	D14 Weight, g (\pm SD)
G0 (control)	265.21 (\pm 24.06)	317.66 (\pm 24.26)
G1 (0.1 mg/kg)	260.14 (\pm 11.22)	317.51 (\pm 12.61)
G2 (0.3 mg/kg)	280.21 (\pm 8.72)	342.51 (\pm 10.75)
G3 (1.0 mg/kg)	271.96 (\pm 13.65)	329.46 (\pm 17.61)

Data are mean and standard deviation (\pm SD). Analysis of variance for repeated measures (ANOVA). P_1 : Comparison between the times (D1 and D14): (F: 511.605; df: 1; $P < 0.001$); P_2 : Comparison between groups: (F: 3.505; df: 3; $P = 0.027$); P_3 : Interaction between the times and groups: (F: 0.791; df: 3; $P = 0.508$). Group 0 (G0: control): $N = 11$, animals received an i.p. injection of saline; Group 1 (G1): $N = 8$, animals received 0.1 mg/kg RC-3095, Group 2 (G2): $N = 8$, animals received 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3): $N = 8$, animals received 1.0 mg/kg RC-3095, once a day.

Table 3 - Percentage weight gain according to group

Group	Weight Gain % (\pm SD)
G0 (control)	19.98 (\pm 4.49)
G1 (0.1 mg/kg)	22.11 (\pm 3.55)
G2 (0.3 mg/kg)	22.28 (\pm 3.78)
G3 (1.0 mg/kg)	21.22 (\pm 5.19)

Data are mean and standard deviation (\pm SD) by analysis of variance (ANOVA). Comparison of weight gain % between the groups (F: 0.572; df: 3; $P = 0.638$). Group 0 (G0: control): $N = 11$, animals received an i.p. injection of saline; Group 1 (G1): $N = 8$, animals received 0.1 mg/kg RC-3095; Group 2 (G2): $N = 8$, animals received 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3): $N = 8$, animals received 1.0 mg/kg RC-3095, once a day.

3.2 Food Intake

According to ANOVA for repeated measures, the variation in mean daily food intake was statistically different between the groups throughout the intervention period (F: 2.196; df: 19.324; $P = 0.004$). It was observed that in some instances, the amount of food eaten varied between groups (F: 3.139; df: 3; $P = 0.039$). For example, on the 5th day, G0 showed the greatest food intake; while on other days, this was not observed. However, according to multiple comparison

analysis with the Bonferroni adjustment, the G2 animals, compared to G0, showed greater food intake throughout the study ($P = 0.041$) (Fig. 2).

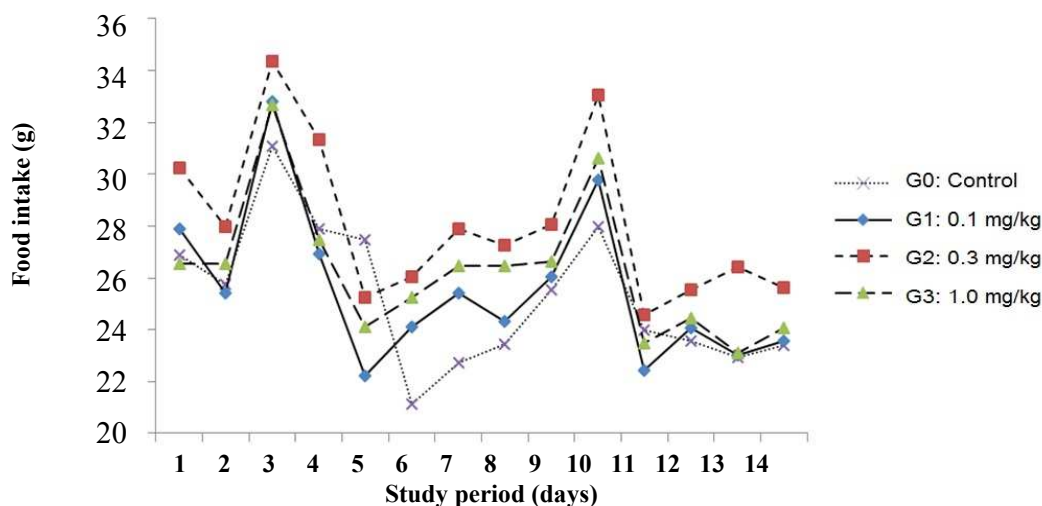


Fig. 2 - Mean daily food intake according to group. Analysis of variance for repeated measures (ANOVA). Interaction between the times and groups: ($F: 2.196$; $df: 19.324$; $P = 0.004$). Comparison between the groups: ($F: 3.139$; $df: 3$; $P: 0.039$). Multiple comparisons with the Bonferroni adjustment, G2 showed a greater food intake compared to G0 ($*P = 0.041$). Group 0 (G0: control): $N = 11$, animals received an i.p. injection of saline; Group 1 (G1): $N = 8$, animals received 0.1 mg/kg RC-3095; Group 2 (G2): $N = 8$, animals received 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3): $N = 8$, animals received 1.0 mg/kg RC-3095, once a day.

3.3 Biochemical metabolic parameters

Serum albumin levels remained stable from D1 to D14 ($F: 1.754$; $df: 1$; $P = 0.195$). Serum amylase, glucose, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, total cholesterol, and triglyceride levels increased from D1 to D14 ($P < 0.001$), but the differences between the groups were not statistically significant. However, the serum triglyceride level showed interactions between the times and groups ($F: 3.761$; $df: 3$; $P = 0.021$), as shown in **Table 4**. According to multiple comparison analysis with the Bonferroni adjustment, G2 animals showed a greater increase in the mean triglyceride level compared to G0 ($P = 0.038$).

Table 4 - Biochemical metabolic parameters on D1 and D14

	G0: control	G1: 0.1 mg/kg	G2: 0.3 mg/kg	G3: 1.0 mg/kg	P₁	P₂	P₃
Albumin (g/dl)							
D1	4.19 (± 0.14)	4.26 (0.14)	4.20 (± 0.20)	4.18 (± 0.09)			
D14	4.10 (± 0.16)	4.17 (± 0.11)	4.15 (± 0.15)	4.26 (± 0.18)	0.195	0.494	0.174
F and df values					F: 1.754; df: 1	F: 0.818; df: 3	F: 1.769; df: 3
Amylase (U/l)							
D1	2364.7 (± 235.1)	2461.4 (± 376.9)	2347.6 (± 167.2)	2407.6 (± 218.7)			
D14	2740.5 (± 230.2)	2742.5 (± 274.6)	2800 (± 134.5)	2827.5 (± 160.5)	< 0.001	0.922	0.231
F and df values					F: 171.1; df: 1	F: 0.161; df: 3	F: 1.511; df: 3
Glucose (mg/dl)							
D1	138.5 (± 7.3)	136 (± 13.8)	133.1 (± 12.0)	140.7 (± 15.3)			
D14	275 (± 99.5)	237.8 (± 65.4)	280.7 (± 61.7)	210 (± 78.7)	< 0.001	0.322	0.188
F and df values					F: 71.402; df: 1	F: 1.212; df: 3	F: 1.695; df: 3
Total cholesterol (mg/dl)							
D1	47 (± 5.4)	48 (± 7.1)	47.7 (± 5.8)	47.7 (± 6.4)			
D14	51.3 (± 6.1)	51.1 (± 6.4)	54.4 (± 8.1)	52.7 (± 5.7)	< 0.001	0.922	0.627
F and df values					F: 20.925; df: 1	F: 0.161; df: 3	F: 0.589; df: 3
HDLcholesterol (mg/dl)							
D1	17.8 (± 2.0)	18.9 (± 2.9)	17.5 (± 2.5)	17.6 (± 2.7)			
D14	22.5 (± 2.6)	21.6 (± 2.26)	22.1 (± 3.3)	22.5 (± 2.6)	< 0.001	0.984	0.267
F and df values					F: 106.115; df: 1	F: 0.052; df: 3	F: 1.381; df: 3
Triglycerides (mg/dl)							
D1	53.3 (± 19.3)	59.4 (± 16.8)	59.1 (± 27.2)	63 (± 21.7)			
D14	99.5 (± 29.7)	115.8 (± 41.1)	153.7 (± 54.9)	148.1 (± 51.1)	< 0.001	0.102	0.021
F and df values					F: 135.56; df: 1	F: 2.255; df: 3	F: 3.761; df: 3

Data are mean and standard deviation (±SD). Analysis of variance for repeated measures (ANOVA). **P₁**: Comparison between the times; **P₂**: Comparison between the groups; **P₃**: Interaction between the times and groups. **F**: Fisher-Snedecor; **df**: degrees of freedom. Multiple comparisons with the Bonferroni adjustment, G2 showed a greater increase of the mean triglyceride level compared to G0 (**P = 0.038**). Group 0 (G0: control): *N* = 11, animals received an i.p. injection of saline; Group 1 (G1): *N* = 8, animals received 0.1 mg/kg RC-3095; Group 2 (G2): *N* = 8, animals received 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3): *N* = 8, animals received 1.0 mg/kg RC-3095, once a day.

3.4 Proinflammatory cytokine IL-6 levels

Table 5 shows the serum levels of IL-6. There was a reduction in the serum level from D1 to D14; however, the differences between the groups throughout the intervention period were not statistically significant (F: 1.478; df: 3; *P* = 0.240).

Table 5 - Serum levels of IL-6 on D1 and on D14

	G0 (control)	G1 (0.1 mg/kg)	G2 (0.3 mg/kg)	G3 (1.0 mg/kg)	P_1	P_2	P_3
IL-6 (pg/ml)							
D1	54.65 (± 5.01)	46.2 (± 6.23)	60.15 (± 11.84)	67.74 (± 16.15)			
D14	33.31 (± 9.53)	20.37 (± 2.67)	37.3 (± 10.50)	18.29 (± 3.91)	< 0.001	0.625	0.240
F and df values					F: 31.048; df: 1	F: 0.593; df: 3	F: 1.478; df: 3

Data are mean and standard error of the mean (\pm SEM). Analysis of variance for repeated measures (ANOVA). P_1 : Comparison between the times; P_2 : Comparison between the groups; P_3 : Interaction between the times and groups. **F**: Fisher-Snedecor; **df**: degrees of freedom. Group 0 (G0: control): $N = 11$, animals received an i.p. injection of saline; Group 1 (G1): $N = 8$, animals received 0.1 mg/kg RC-3095; Group 2 (G2): $N = 8$, animals received 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3): $N = 8$, animals received 1.0 mg/kg RC-3095, once a day.

3.5 Body composition

The body composition of rats was performed by determining the amount of protein and fat from body compartments, such as the carcass and liver. The amount of fat was only determined from the skin. According to one-way ANOVA, there was no statistically significant difference in the body composition of the animals between the groups. The proportions of protein, considered as lean mass, and fat, considered as fat mass from the carcass and liver and fat from the skin, are shown in **Table 6**.

Table 6 - Body composition of the rats according to groups

Compartment	G0 (control)	G1 (0.1 mg/kg)	G2 (0.3 mg/kg)	G3 (1.0 mg/kg)	P	F and df values
Carcass (%)						
Protein	54.94 (± 3.26)	58.30 (± 4.01)	56.53 (± 2.88)	56.82 (± 5.26)	0.335	F: 1.176; df: 3
Fat	33.62 (± 5.08)	31.67 (± 4.58)	32.14 (± 3.25)	32.80 (± 5.78)	0.828	F: 0.297; df: 3
Liver (%)						
Protein	73.48 (± 1.34)	73.89 (± 1.29)	71.81 (± 1.55)	72.72 (± 2.09)	0.061	F: 2.742; df: 3
Fat	13.72 (± 2.29)	11.91 (± 2.72)	14.12 (± 2.37)	12.75 (± 2.03)	0.242	F: 1.471; df: 3
Skin (%)						
Fat	27.13 (± 4.85)	26.31 (± 5.25)	28.53 (± 3.51)	28.58 (± 6.60)	0.766	F: 0.383; df: 3

Data are mean and standard deviation (\pm SD). One-way analysis of variance (ANOVA). **P**: Comparison between the groups. **F**: Fisher-Snedecor; **df**: degrees of freedom. Group 0 (G0: control): $N = 11$, animals received an i.p. injection of saline, Group 1 (G1): $N = 8$, animals received 0.1 mg/kg RC-3095; Group 2 (G2): $N = 8$, animals received 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3): $N = 8$, animals received 1.0 mg/kg RC-3095, once a day.

The proportions of protein, fat, and ash from the carcasses are graphically represented in **Fig. 3**; the protein and fat from the liver are represented in **Fig. 4**; and the fat from skin is represented in **Fig. 5**, according to groups.

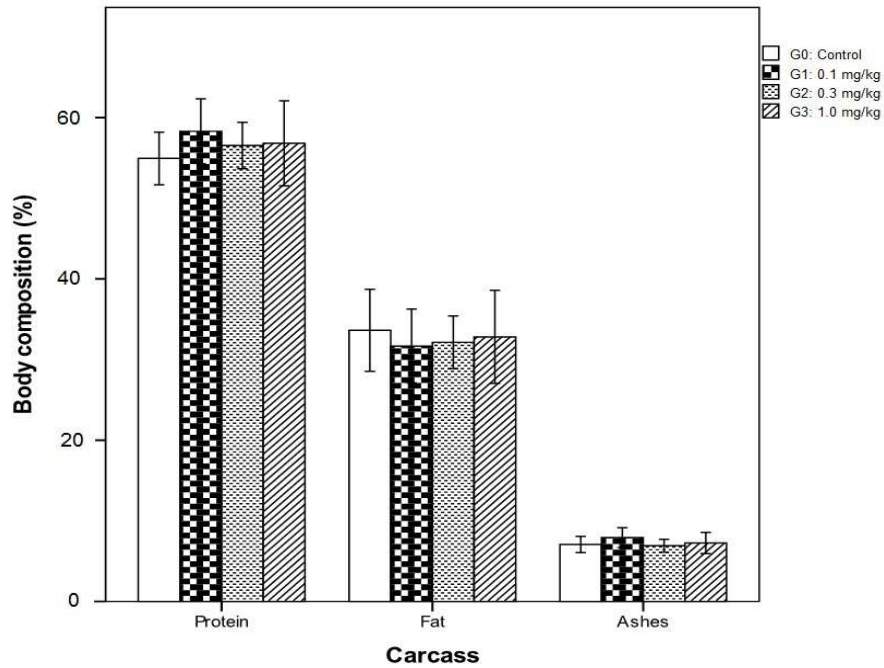


Fig. 3 - Proportion of protein, fat, and ash from the rat carcasses according to groups. Data are mean and standard deviation (\pm SD). Group 0 (G0: control): $N = 11$, animals received an i.p. injection of saline; Group 1 (G1): $N = 8$, animals received 0.1 mg/kg RC-3095; Group 2 (G2): $N = 8$, animals received 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3): $N = 8$, animals received 1.0 mg/kg RC-3095, once a day.

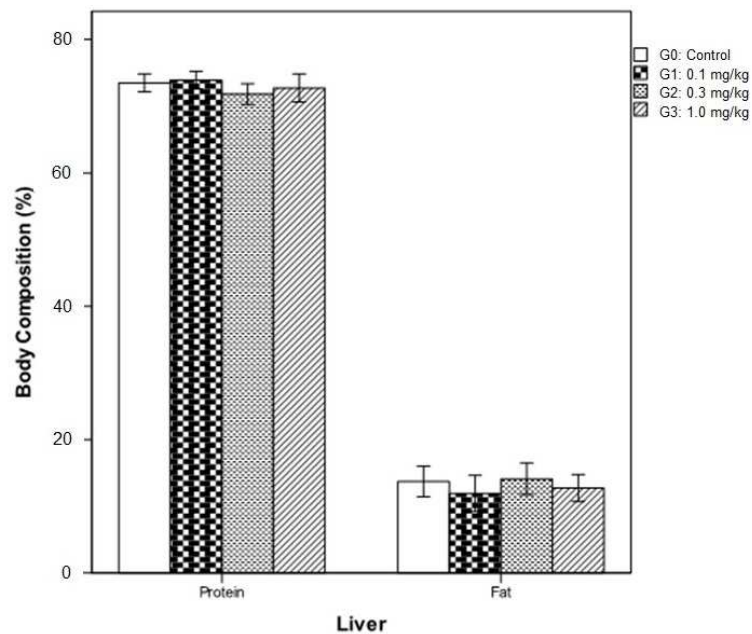


Fig. 4 - Proportion of protein and fat from the rat livers. Data are mean and standard deviation (\pm SD). Group 0 (G0: control): $N = 11$, animals received an i.p. injection of saline; Group 1 (G1): $N = 8$, animals received 0.1 mg/kg RC-3095; Group 2 (G2): $N = 8$, animals received 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3): $N = 8$, animals received 1.0 mg/kg RC-3095, once a day.

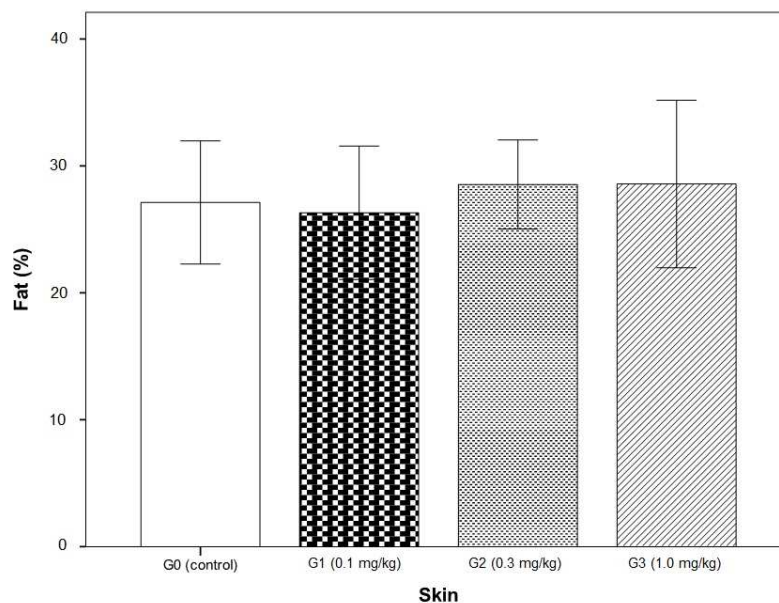


Fig. 5 - Proportion of fat from the rat skin. Data are mean and standard deviation (\pm SD). Group 0 (G0: control): $N = 11$, animals received an i.p. injection of saline; Group 1 (G1): $N = 8$, animals received 0.1 mg/kg RC-3095; Group 2 (G2): $N = 8$, animals received 0.3 mg/kg RC-3095; and Group 3 (G3): $N = 8$, animals received 1.0 mg/kg RC-3095, once a day.

4 Discussion

The results of the present study show that young adult rats submitted to weight loss and given a single systemic intraperitoneal injection of the GRPR antagonist RC-3095 at the intermediate dose of 0.3 mg/kg/day affected food intake and mean weight. No effects on weight gain, body composition, or biochemical metabolic parameters were observed, except for the great increase of serum triglyceride levels.

The report by Fekete *et al.* (2002), who studied 187 CFY male rats, guided the hypothesis of this study that the injection of the GRPR antagonist RC-3095 could increase food intake. In their study, animals received scheduled doses of GRP between 50 ng and 600 ng in the bilateral brain amygdala, and food intake was monitored for 1 h. Compared with the control group, no difference was observed in food intake with RC-3095 at doses of 50 and 600 ng; but with doses of 100 ng and 300 ng, a reduction in food intake during the first 5-10 min after GRP injection was

observed. This effect was more evident with a dose of 200 ng, which showed food intake over a longer period of time, i.e., 5, 10, 20, and 25 min [31]. In 2007, the same research group performed a bilateral intraventricular injection of 15, 30, or 60 ng of neuromedin C (NMC) in 68 CFY rats and equally observed that the intermediate dose was significantly associated with a reduction of food intake throughout the 2-h observation period. The group receiving 30 ng of NMC had a lower food intake during the first 25 min of the observation period [34]. Although this study and our study analyzed the effects of different GRPR agonists, NMC and GRP, respectively, the results showed a similar reduction in food intake. These results support the hypothesis that food suppression induced by GRPR agonists is not dose dependent. For other outcomes such as memory, behavior, anxiety, fear, and locomotor activity, RC-3095 injections at intermediate doses also have shown more efficiency [40-44]. Regarding their affinity to receptors, it has been suggested that GRP preferably binds to GRPR while BN has an equal affinity for both GRPR and neuromedin B receptor (NMBR) [45]. This finding partly explains why the peripheral injection of NMB inhibited the food intake, but when it was associated with GRP, this effect was stronger [23]. As expected, considering the receptor selectivity and the different local injection site of the GRP antagonist, we found similar results on food intake. There was an increase in the mean food intake in the group that received the intermediate dose of 0.3 mg/kg RC-3095. This result supports the hypothesis that both feeding suppression and food intake, induced by agonists or antagonists, respectively, are not dose dependent.

It has been suggested that BN/GRP and its receptors interact with other hormones and peptides associated with appetite, like ghrelin, [46] and those involved with satiety such as amylin [47] and leptin [48]. In addition, in a study with Sprague Dawley rats that evaluated the food intake after intraperitoneal injection of ghrelin combined with saline, amylin, or BN, it was observed that BN blocked the ghrelin orexigenic effect, while the highest dose of amylin could not block it, showing the powerful anorexigenic effect of BN. The overexpression of the specific receptors in the rat hypothalamic arcuate nucleus (ARC) in this study, detected through

immunohistochemistry, also suggests an interaction between signaling pathways and the powerful suppression effect of BN on feeding, since the neurons activated by ghrelin in the ARC have the neuropeptide Y (NPY), a well-known orexigen [49; 50]. Similarly, an intraperitoneal injection of BN at 1 h after intraventricular injection of leptin decreased food intake more than just leptin, supporting the hypothesis that both BN and leptin may affect food intake by modifying the satiety signals promoted by feeding [50]. Other studies with genetically modified mice, GRPR- or NMBR-deficient, also suggest the involvement of signaling at the end of meal time, but not on total intake, when compared to wild-type mice [10; 51].

A previous study [52] also compared the body weight of GRPR-deficient mice with wild-type mice over 54 weeks. During the first 45 weeks, there was not a significant weight gain; but from the 45th week, a gain of 12% was observed. Whereas this weight change only occurred at the end of life, the study discusses whether GRPR-deficient mice maintained the same caloric intake throughout life and only gained weight at the end by the decrease of energy expenditure due to aging [53]. Because GRP and the orexigenic peptide NPY receptor are at the same center on the hypothalamus, another hypothesis for weight gain in GRPR-deficient mice at the end of life is that the expression of NPY and its receptors is highly suppressed in the hypothalamus of old rats, justifying weight loss due to senescence [54]. Our study observed a greater mean weight in the group of rats that received an intermediate dose of RC-3095 (0.3 mg/kg), and the same group had a greater food intake compared with the control group. Although this group weighed more and ate more, no difference was observed in the weight gain percentage throughout the 14-day study between the groups. If our study had included elderly rats or if the study period was longer, we might have found an increase in the weight percentage.

Serum albumin, amylase, total cholesterol, and HDL cholesterol from all rats, regardless of the group, remained within the limits of normality [55]. Although there was no difference between the groups, blood glucose levels increased significantly from D1 to D14. Insulin is the regulator of glucose levels, and its secretion is proportional to blood glucose levels. So, insulin

may be considered one of the major activators of energy stores in adipose tissue [56]. Similarly, if the secretion of glucagon-like peptide 1 is decreased, insulin release may be impaired, thus enhancing peripheral insulin resistance, which may lead to metabolic disorders and obesity [57]. Furthermore, chronically high insulin levels lead to obesity [58]. Moreover, the release of leptin from adipose tissue is a peripheral satiety signal, and serum levels are also correlated with adiposity [59]. Ladenheim et al. suggest an interaction between the biological effects of BN and leptin; they found a lower response to food suppression in BN rats with high levels of leptin [50]. Our results suggest that the administration of the GRPR antagonist RC-3095 affects serum glucose levels, and consequently insulin and leptin, because we observed increased levels of triglycerides in G2. These findings suggest a direct or indirect interaction of RC-3095 on blood glucose and serum insulin, which may contribute to an increase of body fat storage over the long term.

Among the biological effects of RC-3095 shown in the literature [61], RC-3095 modulates inflammatory responses in intestinal inflammatory diseases in humans and animals [62-64], as well as in experimental sepsis models [29]. According to studies by Dal-Pizzol et al. and Czepielewski et al., there is a decrease in proinflammatory interleukin and TNF- α levels but not IL-10 levels, which is anti-inflammatory, in peritoneal macrophages cultured in the presence of RC-3095 [29; 5]. Two other studies have reported that in rats submitted to food restriction as well as in obese rats that the serum levels of proinflammatory cytokines are increased [59; 60]. In our study, the gradual and individualized feed reduction to afford weight loss throughout the 10 days may not have sufficiently stimulated metabolic stress that could induce a proinflammatory cytokine increase. A study with obese rats has verified that higher IL-6 levels were achieved in those animals who received a fat-rich diet than the ones who received a carbohydrate (CH)-rich diet. Therefore, when a CH-rich diet was supplied to those who were ingesting a fat-rich diet, the IL-6 levels diminished concomitantly with body weight [60]. This study showed the involvement of IL-6 with the diet type and body weight, suggesting its interaction with adipose tissue

hormones, such as leptin [60; 65]. Our results showed greater serum levels of IL-6 on D1, just after the period of food restriction, and they decreased on D14 when the feed was given *ad libitum*, i.e. there was no interaction between the groups and doses of the RC-3095 injections throughout the study period.

Unexpectedly, there was no impact on the weight gain percentage and no differences in body composition in terms of both lean mass and fat mass of the rats. Salomé et al. administered saline, ghrelin, or ghrelin associated with an antagonist in Wistar rats for 14 days and showed an increase in both lean mass and fat mass within the study period, with a real weight gain among rats who received only ghrelin [66]. The difference in the results of the Salome study and those of our study may be partially explained by differences in methodology for the body composition analysis. They used dual-energy X-ray absorptiometry, considered the gold standard to determine bone mass and consequently body water and lean mass. This method, besides its high cost, does not demand any special preparation of the carcass, which is different from ours, which needs the carcass, skin, and liver to be ground separately, before the analysis of crude protein, ethereal extract, and ash. Another study with splenic nerve electric stimulation in Wistar rats for sympathetic nervous system stimulation and food intake reduction showed, through magnetic resonance imaging, a lean mass increase; this method is another highly precise method, but it is also equally expensive [67]. We had difficulty comparing our results for the exiguity of studies with the same body composition analysis method. Three other studies with the same method used mice and not Wistar rats [68-70]. The Unit of Animal Experimentation of the Clinical Hospital of Porto Alegre does not have any equipment for this type of analysis. Therefore, we performed the body composition analysis in the Animal Nutrition Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul with the same method used for medium-sized animals, such as poultry and swines; thus, this method should be considered a limitation of our study.

In conclusion, injection of the intermediate dose of 0.3 mg/kg/day of the GRPR antagonist RC-3095 in healthy young adult Wistar rats submitted to weight loss affected food intake and

mean weight. No effects on weight gain, body composition, or biochemical metabolic parameters were observed, except for the great increase of serum triglyceride levels. These results demonstrate some physiological effects of GRP on food intake and weight, expanding the possibilities of future studies on hunger/satiety and macronutrient metabolism as well as highly stressful conditions like cancer.

Acknowledgments

We would like to thank the Research Incentive Fund (FIPE) from Hospital de Clínicas de Porto Alegre for financial support.

References

1. McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, et al. Characterization of a gastrin-releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;90:227-33.
2. Erspamer V. Discovery, isolation and characterization of bombesin-like peptides. *Ann N Y Acad Sci* 1988;547:3-9.
3. Ohki-Hamazaki H. *Neuromedin B*. *Prog Neurobiol* 2000;62:297-312.
4. Gonzales N, Moody TW, Igarashi H *et al*. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:58-64.
5. Czepielewski RS, Porto BN, Rizzo LB, Roesler R, Abujamra A, Pinto LG et al. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) mediates chemotaxis in neutrophils. *PNAS* 2012;109:547-52.
6. Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006;5:197-204.
7. Roesler R & Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptors in the central nervous system: role in brain function and as a drug target. *Frontiers in Endocrinology/Neuroendocrine Science* 2012;159(3):1-12.
8. Roesler R, Kent P, Schröder N, Schwartzmann G, Merali Z. Bombesin receptor regulation of emotional memory. *Rev Neurosci* 2012;23(5-6):571-86.
9. Roesler R, Kent P, Luft T, Shwartzmann G, Merali Z. Gastrin-releasing peptide receptor signaling in the integration of stress and memory. *Neurobiology of Learning and Memory* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2013.08.013>. IN PRESS
10. Tokita K, Katsuno T, Hocart S, Coy DH, Linares M, Martinez J et al. Molecular basis for selectivity of high affinity peptide antagonists for the gastrin-releasing peptide receptor. *J Biol Chem* 2001;276:36652-663.
11. Petronilho F, Danielski LG, Roesler R, Schwartzmann G, Dal-Pizzol F. Gastrin-releasing peptide as a molecular target for inflammatory diseases: an update. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2013;12(3):172-77.
12. Schwartzmann G, Di Leone LP, Horowitz M, Schunemann D, Cancellà A, Pereira AS et al. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 2006;24:403-412.
13. Hampton LL, Ladenheim EE, Akeson M, Way JM, Weber C, Sutliff VE *et al*. Loss of bombesin-induced feeding suppression in gastrin-releasing peptide receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:3188-92.

14. Ischia J, Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrin-releasing peptide: different forms, different functions. *Biofactors* 2009;35:69-75.
15. Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV. International union of pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 2008;60:1-42.
16. Majumdar ID & Weber HC. Biology of mammalian bombesin-like peptides and their receptors. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2011;18:68-74.
17. Grider JR. Gastrin-releasing peptide is a modulatory neurotransmitter of the descending phase of the peristaltic reflex. *Am J Physiol* 2004;287:G1109-G1115.
18. Gibbs J, Fauser DJ, Rowe EA, Rolls BJ, Rolls ET, Maddison SP. Bombesin suppress feeding in rats. *Nature* 1979;282:208-10.
19. Parrot RF & Baldwin BA. Centrally-administered bombesin produces effects unlike short-term satiety in operant feeding pigs. *Physiol Behav* 1982;28:521-24.
20. Stuckey JA, Gibbs J, Smith GP. Neural disconnection of gut from brain blocks bombesin-induced satiety. *Peptides* 1985;6:1249-52.
21. Figlewicz DP, Stein LJ, Woods SC, Porte Jr. D. Acute and chronic gastrin-releasing peptide decreases food intake in baboons. *Am J Physiol* 1985;248:578-83.
22. Gutzwiller JP, Drewe J, Hildebrand P, Rossi L, Lauper JZ, Beglinger C. Effect of intravenous human gastrin-releasing peptide on food intake in humans 1994;106:1168-73.
23. Landenheimer EE, Wirth KE, Moran TH. Receptor subtype mediation of feeding suppression by bombesin-like peptides. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54(4):705-11.
24. Hoggard N, Bashir S, Cruickshank M, Speakman JR. Expression of neuromedin B in adipose tissue and its regulation by changes in energy balance. *J Mol Endocrinol* 2007; 39:199-210.
25. Stein LJ & Woods SC. Gastrin releasing peptide reduces meal size in rats. *Peptides* 1982;3:833-35.
26. Ladenheimer EE & Ritter RC. Low-dose fourth ventricular bombesin selectively suppress food intake. *Am J Physiol* 1988;255(24):R988-R992.
27. Plamondon H, Lambert C, Meraly Z. Sustained bombesin exposure results in receptor down-regulation and tolerance the chronic but not acute effects of bombesin on ingestion. *Brain Res* 1998;782:202-211.
28. Schally AV & Comaru-Schally AM. Hypothalamic and other peptide hormones. In.: Holland JF, Frei E, Bast Jr RC, Kufe DE, Morton DL. *Cancer Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins 1997.p1067-85.
29. Dal-pizzol F, DiLeone LP, Ritter C, Martins MR, Reinke A, Pens Gelain D et al. Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:84-90.

30. Petronilho F, Araújo JH, Steckert AV, Rezin GT, Ferreira GK, Roesler R et al. Effect of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. *Peptides* 2009;30(8):1460-65.
31. Fekete E, Vigh J, Bagi EE, Lénárd L. Gastrin-releasing peptide microinjected into the amygdala inhibits feeding. *Brain Research* 2002;955:55-63.
32. Martins MR, Reinke A, Valvassori SS, Machado RA, Quevedo J, Schwartzmann G et al. Non-associative learning and anxiety in rats treated with a single systemic administration of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095. *Peptides* 2005;26(12):2525-29.
33. Tsushima H & Mori M. Mechanisms underlying anorexia after microinjection of bombesin into the lateral cerebroventricle. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80(2):289-96.
34. Fekete EM, Bagi EE, Tóth K, Lénárd L. Neuromedin C microinjected into the amygdala inhibits feeding. *Brain Research Bulletin* 2007;71:386-92.
35. Yamada K, Wada E, Wada K. Bombesin-like peptides: studies on food intake and social behaviour with receptor knock-out mice. *Ann Med* 2000;32(8):519-29.
36. Agüero G, Villena J, Racedo S, Haro C, Alvarez S. Beneficial immunomodulatory activity of *Lactobacillus casei* malnourished mice pneumonia: effect on inflammation and coagulation. *Nutrition* 2006; 22:810-19.
37. Calingasan NY, Gibson GE. Dietary restriction attenuates the neuronal loss, induction of heme oxygenase-1 and blood-brain barrier breakdown induced by impaired oxidative metabolism. *Brain Research* 2000; 885:62-69.
38. Association of Official Agricultural Chemistry (AOAC). Official Methods of Analysis. 16^a edição, 1995
39. Prates ER. Técnicas de pesquisa em nutrição animal. Porto Alegre: Editora UFRGS 2007.414p.
40. Roesler R, Kopschina MI, Rosa RM, Henriques JA, Souza DO, Schwartzmann G. RC-3095, a bombesin-gastrin-releasing peptide antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol* 2004;486:35-41.
41. Roesler R, Lessa D, Venturella R, Luft T, Henriques JAP, Schwartzmann G. Hippocampal bombesin/gastrin-releasing peptide receptors are involved in fear-motivated memory but not in innate fear. *FENS Abstr* 2004;2:A114-5.
42. Roesler R, Lessa D, Venturella R, Vianna MR, Luft T, Henriques JA, et al. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci* 2004;19:1041-5.
43. Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JA, Schwartzmann G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides* 2003;24:1069-74.
44. Venturella R, Lessa D, Luft T, Roozendaal B, Schwartzmann G, Roesler R. Dexamethasone reverses the memory impairment induced by antagonism of hippocampal gastrin-releasing peptide receptors. *Peptides* 2005;26:821-5.

45. Wada E, Way J, Saphira K, Kusano AM, Lebacqz-Verheyden D, Coy R et al. cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of neuromedin-B-preferring bombesin receptor. *Neuron* 1991;6:421-30.
46. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K *et al.* A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001;409:194-98.
47. Rink TJ, Beaumont K, Koda J, Young A. Structure and biology of amylin. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14:113-118.
48. Meier U & Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004;50(9):1511-1525.
49. Kobelt P, Goebel M, Stengel A, Schmidtman M, Voort IR, Tebbe JT et al. Bombesin, but not amylin, blocks the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:903-13.
50. Ladenheim E, Emond M, Moran TH. Leptin enhances feeding suppression and neural activation produced by systemically administered bombesin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:473-77.
51. Wang L, Saint-Pierre DH, Taché Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2002;325:47-51.
52. Ladenheim EE, Hampton LL, Whitney AC, White WO. Disruptions in feeding and body weight control in gastrin-releasing peptide receptor deficient mice. *Journal of Endocrinology* 2002;174:273-81.
53. Wang C, Bomberg E, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hypothalamic ventromedial nucleus increases energy expenditure. *Brain Res* 2010;8(1336):66-77.
54. Kmiec Z. Central regulation of food intake in ageing. *Journal of Physiol Pharmacol* 2006;57(6):7-16.
55. Ebisui L, Fontes RS, Lapchik VB. In.: *Cuidado e manejo de animais de laboratório*. São Paulo: Editora Atheneu 2009. p229-50.
56. Hillebrand JJG, Wied D, Adan RAH. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 2002;23:2283-2306.
57. Pearson K, Gingerich RL, Nayak S, Wada K, Wada E, Ahren B. Reduced GLP-1 and insulin responses and glucose intolerance after gastric glucose in GRP receptor-deleted mice. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 2000;279:E956-E962.
58. Kieffer TJ & Habener JF. The adipoinular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E1-14.
59. Stevanovic D, Starcevic V, Vilimanovich U, Nesic D, Vuciecevic L, Misirkic M et al. Immunomodulatory actions of central ghrelin in diet-induced energy imbalance. *Brain Behav Immun* 2012;26(1):150-58.

60. Lee IS, Shin G, Choue R. Shifts in diet from high fat to high carbohydrate improved levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in mice fed a high-fat diet. *Endocrine Journal* 2010;57(1):39-50.
61. Schwartzmann G, Roesler R, Dal Pizzol F, Rocha A, Pohlmann P, DiLeone LP. Antagonistas de receptores do tipo bombesina/fator de liberação da gastrina como um novo alvo terapêutico nas neoplasias e outras enfermidades. *Prática Hospitalar* 2005;39:2017-39.
62. Ter Beek WP, Muller ES, Van Hogezaand RA, Biemond I, Lamers CB. Gastrin releasing peptide receptor expression is decreased in patients with Chron's disease but not in ulcerative colitis. *J Clin Pathol* 2004;57(10):1047-51.
63. Gulluoglu BM, Kurtel H, Gulluoglu MG, Aktan AO, Yegen BC, Dizdaroglu F et al. Bombesin ameliorates colonic damage in experimental colitis. *Dig Dis Sci* 1999;44(8):1531-38.
64. Damin DC, Santos FS, Heck R, Rosito MA, Meurer L, Kliemann LM et al. Effects of the gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 in a rat model of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2010;55:2203-10.
65. Xavier Pi, Sunyer F. The relation of adipose tissue to cardiometabolic risk. *Clinical Cornerstone* 2006;8:S14-S23.
66. Salomé N, Hansson C, Taube M, Gustafsson-Ericson L, Egecioglu E, Karlsson-Lindahl L et al. On central mechanism underlying ghrelin's chronic pro-obesity effects in rats: new insights from studies exploiting a potent ghrelin receptor antagonist. *Journal of Neuroendocrinology* 2009;21:777-85.
67. Wu X, McLaughlin L, Polk JP, Chalasani M, Greenway FL, Zheng J. A pilot study to evaluate the effect of splanchnic nerve stimulation on body composition and food intake in rats. *Obes Surg* 2009; 19:1581-85.
68. Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza M. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 1997;8(32): 853-58.
69. West DB, DeLany JP, Camet PM, Blohm F, Truett AA, Scimeca J. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1998;275:667-72.
70. Delany JP, Blohm F, Truett AA, Scimeca JC, West DB. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am J Physiol* 1999; 276(4):1172-79.

ANEXO 1

Protocolo do teste de ELISA - IL-1 e TNF- α

1. Revestir a placa com 100 μ l/poço do anticorpo de captura diluído no tampão de revestimento (diluir conforme Certificado de Análise). Selar a placa e incubar a 4° C, *overnight*.
2. Aspirar e lavar 5x com 250 μ l/poço do tampão de lavagem. Durante cada sequência de lavagem, deixar a placa com a solução de lavagem por aproximadamente um minuto.
3. Diluir o diluente do ensaio numa proporção 1:5 com água deionizada. Bloquear as placas com 200 μ l/poço de 1x *Assay Diluent*. Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
4. Aspirar-lavar conforme o item 2. Repetir um total de 5 lavagens.
5. Utilizando 1x *Assay Diluent*, diluir os padrões conforme o Certificado de Análise. Adicionar 100 μ l/poço dos padrões nos poços conforme o desenho da placa. Adicionar 100 μ l/poço de amostras conforme o desenho da placa. Selar a placa e incubar a temperatura ambiente por 2 horas (ou durante uma noite a 4° C, para aumentar a sensibilidade).
6. Aspirar/lavar conforme o item 2. Repetir um total de 5 lavagens.
7. Adicionar 100 μ l/poço do anticorpo de detecção diluído 1x no *Assay Diluent*. Selar a placa e incubar em temperatura ambiente por 30 minutos.
8. Aspirar e lavar conforme item 2. Repetir um total de 5 lavagens.
9. Adicionar 100 μ l/poço da Solução de avidina-HRP (reagente enzimático) diluído no diluente do ensaio 1x. Selar e incubar a placa em temperatura ambiente por 15 minutos.
10. Aspirar/lavar conforme o item 2. Durante cada sequência de lavagem, deixar a placa com a solução de lavagem por aproximadamente um minuto. Repetir um total de 7 lavagens.
11. Adicionar 100 μ l/poço da solução de substrato. Selar e incubar a placa em temperatura ambiente por 15 minutos.
12. Adicionar 50 μ l/poço da solução de parada
13. Ler a placa a um comprimento de onda de 450 nm. Se a subtração do comprimento de onda estiver viável, subtrair os valores de 570 nm daqueles de 450 nm e analisar os dados.

ANEXO 2

Protocolo do teste de ELISA - IL-6

1. Revestir a placa com 100 μl /poço de Anticorpo de Captura diluído no tampão de revestimento *Coating Buffer*. Para realizar a diluição, ver instrução específica de acordo com o lote/Certificado de Análise. Selar e incubar a placa *overnight* a 4° C.
2. Aspirar os poços e lavar 5 vezes com ≥ 300 μl /poço de solução de lavagem. Depois da última lavagem, virar a placa e colocar sobre papel absorvente para remover qualquer resíduo da solução.
3. Bloquear a placa com ≥ 200 μl /poço do *Assay Diluent*. Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
4. Aspirar/lavar conforme item 2.
5. Preparar/diluir os padrões e as amostras no *Assay Diluent*, conforme protocolo do fabricante.
6. Adicionar 100 μl /poço de cada padrão, amostra e controle no poço apropriado. Selar a placa e incubar a temperatura ambiente por 2 horas.
7. Aspirar/lavar conforme item 2, com um total de 5 lavagens.
8. Adicionar 100 μl /poço do Anticorpo de Detecção diluído em cada poço. Selar a placa e incubar por 1 hora a temperatura ambiente.
9. Aspirar/lavar conforme item 3, com um total de 5 lavagens.
10. Adicionar 100 μl /poço do reagente enzimático diluído (SAv-HRP) em cada poço. Selar a placa e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Aspirar/lavar conforme item 2, com um total de 7 lavagens. Obs.: nesta lavagem final, deixar a placa na solução de lavagem por 30 segundos a 1 minuto a cada lavagem.
12. Adicionar 100 μl /poço de solução substrato TMB. Incubar a placa (sem selar) por 30 minutos a temperatura ambiente, deixando-a no escuro.
13. Adicionar 50 μl /poço de solução de parada.

14. Ler a absorvência a 450nm dentro de 30 minutos da reação de parada. Se a correção do comprimento de onda estiver disponível, subtrair a absorbância de 570 nm das de 450 nm e analisar os dados.

ANEXO 3

Determinação de matéria seca a 105° C

1. Material

Estufa à 105° C

Balança analítica

Cadinhos de porcelana

Dessecador com um dessecante (sílica ou cloreto de cálcio anidro).

2. Procedimento

Secar por 3 horas e meia ou uma noite, em estufa à 105°C, pesa-filtros ou cadinhos de porcelana. Esfriar em dessecador. Pesquisar o cadinho e anotar na planilha (T).

Pesar aproximadamente 2 a 3 g de amostra; anotar o peso (P1).

Secar em estufa a 105° C até peso constante, por 3 horas e 30 minutos ou durante uma noite.

Esfriar em dessecador no mínimo 1 hora. Pesquisar (P2).

Guardar este material que será utilizado para a determinação da matéria orgânica.

3. Cálculo

$$\% \text{ MS} = \frac{P_2 - T}{P_1 - T} \times 100$$

4. Ajuste à base seca

$$(a) \frac{\text{análise em \% da amostra como oferecida}}{\% \text{ de matéria seca na amostra como oferecida}} \times 100$$

ANEXO 4

Determinação do nitrogênio total ou proteína bruta

O método de Kjeldahl utilizado para a determinação do nitrogênio total, proteínas e outros compostos consiste em três passos: digestão, destilação e titulação.

1. Material e Reagentes

Bloco digestor de proteína

Destilador de proteína

Balança analítica

Bureta automática

Tubos de proteína

Frascos de erlenmeyer, com capacidade de 250 ml

Ácido sulfúrico (conc. 98%; d = 1,84)

Catalisador (mistura de digestão)

Hidróxido de Sódio (NaOH) 50%

Ácido bórico (HBO_2)

Indicador

Solução padrão de ácido sulfúrico 0,50 N

Solução padrão de ácido sulfúrico 0,10 N (quando há pouco N na amostra).

2. Soluções

Catalizador

Moer separadamente cada reagente no liquidificador, almofariz, ou num gral: 10,0 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); 1,0 g de selênio metálico (Se), fazer a moagem na capela porque o selênio é muito tóxico e volátil e 100,0 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) ou sulfato de

potássio (K_2SO_4). Depois de moído misturar aos poucos, moendo sempre para obter uma perfeita mistura.

Hidróxido de Sódio NaOH 50%

Diluir 500 g de NaOH em lentilhas em 1 litro de água destilada.

Indicador de ácido bórico

Solução de ácido bórico: Dissolver 40 g de ácido bórico (HBO_2) em água destilada (fervida e fria) e completar um litro. É necessário obter completa dissolução do soluto.

Solução Indicador: Dissolver 400 mg (0,400 g) de verde-bromo cresol e 80 mg (0,080 g) de vermelho de metila em 480 ml de álcool etílico a 95%.

Adicionar 117 ml desta solução a cada 10 litros de solução de ácido bórico.

Solução padrão de H_2SO_4 0,1 N

Diluir 2,72 ml de H_2SO_4 p.a. (concentração 98%) por litro de água destilada, livre de CO_2 (fervida e fria). Fatorar com TRIS.

Padronização da solução de ácido sulfúrico 0,01 N com TRIS

O TRIS ou THAM (Tris-(hidróximetil) amino metano) é um padrão primário para a estandarização de soluções diluídas de ácidos. Possui alto peso equivalente, é incolor, não hidrocópico e pode ser obtido com alta pureza. Não absorve CO_2 quer na forma sólida quer em solução. Seu pH no ponto de equivalência é de 4,7. As soluções são estáveis à temperatura ambiente por no mínimo 3 meses. Conservar na geladeira.

Pesar 0,7 g de TRIS e secar em estufa a $102^\circ C$ por uma hora, não deixar por mais de 2 horas.

Dissolver 0,6057 g de TRIS seco, em um balão volumétrico de 100 ml, com água fervida livre de CO_2 (fervida e fria). Ajustar o volume e homogeneizar. A solução assim preparada é 0,050 N.

Em um erlenmeyer de 125 ml, pipetar 10 ml da solução Tris 0,05 N, e

Adicionar 10 ml de água destilada livre de CO₂ (fervida e fria) e

Adicionar 5 ml do indicador de ácido bórico. Fazer duplicata.

Titular com H₂SO₄ 0,01 N.

No ponto de viragem o indicador passa da cor azul, verde claro, cinza, a rosa claro permanente.

Calcular a normalidade do ácido sulfúrico.

Anotar o fator da normalidade no frasco que contém o ácido sulfúrico.

Para a titulação do ácido H₂SO₄ 0,005 N utilizar somente 2,00 ml da solução de TRIS 0,05 N.

$$N_1 V_1 = N_2 V_2 \quad Eq = Eq$$

$$N \text{ H}_2\text{SO}_4 \cdot V \text{ H}_2\text{SO}_4 = N \text{ ac. Bórico} \cdot V \text{ ac. bórico}$$

$$\text{Normalidade do H}_2\text{SO}_4 = \frac{10,0 \text{ ml} \times 0,050 \text{ N}}{\text{ml H}_2\text{SO}_4 \text{ gasto}}$$

$$FC = \frac{\text{Normalidade Calculada}}{\text{Normalidade Esperada}}$$

Preparo da Solução de H₂SO₄ aproximadamente 0,05 N

Dissolver 1,38 ml de H₂SO₄ concentrado em 1 litro de água destilada fervida e fria.

As soluções pouco concentradas menor do que 0,1N são desejáveis preparar com água destilada fervida. Estas soluções são menos estáveis e podem ser preparadas antes do uso.

3. Digestão das Amostras

Pesar aproximadamente 1,0 a 2,0 g de amostra e colocar dentro do tubo de digestão;

Correr dois brancos somente com os reagentes, seguindo todos os passos do processo.

Adicionar meia colher medida de catalisador, aproximadamente 16,0 g de mistura de digestão/tubo.

Adicionar 25 ml de H_2SO_4 concentrado lentamente pelas paredes do tubo, com auxílio de uma proveta ou seringa graduada.

Para carne fresca adicionar 40 ml de H_2SO_4 .

Aumentar o volume de H_2SO_4 em 10 ml para cada grama de amostra acima de 2,0 g.

Levar ao bloco digestor, ligar a exaustão da capela e ligar o pirômetro em 150°C por 1 hora.

Aumentar para 330°C e deixar até completar a digestão, indicada quando a amostra no tubo ficar verde transparente. O processo de digestão das proteínas demora em torno de 3 a 4 horas.

Terminada a digestão, desligar o pirômetro e deixar os tubos esfriarem com o exaustor ligado até a completa remoção dos vapores ácidos.

Retirar os tubos do bloco e colocar em uma bancada de madeira, apropriada para os tubos.

Quando os tubos estiverem frios, adicionar 70 ml de água destilada, agitar bem e deixá-los tampados com papel de alumínio para iniciar a destilação.

4. Destilação

A destilação é feita no aparelho macro destilador e procede-se da seguinte maneira:

Abrir a torneira de resfriamento do aparelho. Ligar a chave geral do equipamento. Aguardar até aquecer a água da caldeira, então lavar o aparelho colocando 20 ml de água destilada em um tubo como também no erlenmeyer.

Deixar atingir volume de 150 ml no erlenmeyer, retirar e então iniciar a destilação começando pela prova em branco.

Enquanto o aparelho está sendo lavado organizar os erlenmeyers devidamente identificados conforme a numeração dos tubos.

Colocar 25 ml da solução de ácido bórico no erlenmeyer.

Acoplar o erlenmeyer na saída do condensador, de forma que a mangueira fique mergulhada no ácido bórico.

Encaixar cuidadosamente o tubo que será destilado entre a rolha e o macaco.

Adicionar lentamente a solução de NaOH 50%, até que a coloração fique marron, se a solução azular indica excesso de soda (não irá influir no resultado).

Destilar até que o volume no erlenmeyer esteja em 150 ml, então retirar o mesmo. Separar para titulação.

Retirar cuidadosamente o tubo e levar para lavagem. Terminado este procedimento, repetir todos os passos já descritos com os tubos seguintes.

Após destilar o último tubo, fazer a lavagem do aparelho usando apenas água destilada no tubo e erlenmeyer para que esteja limpo para a próxima série de análises.

Desligar a chave geral do aparelho, a torneira da água de refrigeração (quando a água estiver saindo fria).

Lavar os tubos, os erlenmeyers e colocar secar na estufa de secagem da vidraria.

5. Titulação

Antes de iniciar a titulação deve-se agitar a solução titulante de H₂SO₄ 0,1 N fatorada, e encher a bureta e zerar. Colocar o agitador magnético dentro de erlenmeyer e iniciar a titulação.

Titular até a coloração passar do verde esmeralda para o rosa límpido.

Anotar o volume gasto na planilha. Retirar o agitador magnético com o auxílio de um imã.

Zerar a bureta toda vez que iniciar uma nova titulação.

6. Cálculo

$$\% N = \frac{[(\text{ml de H}_2\text{SO}_4 \text{ gasto} - \text{ml do branco}) \times \text{FN ácido} \times \text{N ácido sulfúrico}] \times 0,01401 \times 100}{\text{Peso seco da amostra}}$$

$$\% \text{ proteína bruta} = \% \text{ nitrogênio} \times 6,25$$

$$\text{Ajuste peso seco da amostra: } \frac{(\text{peso da amostra "como recebida"}) \times (\% \text{ de matéria seca } 105^\circ \text{ C})}{100}$$

ANEXO 5

Determinação da gordura bruta ou extrato etéreo

1. Princípio

A determinação da gordura bruta é feita pela extração das gorduras com solvente orgânico (éter etílico, éter de petróleo, éter sulfúrico, etc...) seguida da remoção por evaporação ou destilação do solvente.

O resíduo obtido contém todos os compostos que nas condições da determinação possam ser extraídos pelo solvente (lipídios, esteróis, fosfatídeos, vitaminas A e D, carotenoides, óleos, essências, pigmentos, etc...).

2. Material e Reagentes

Goldfish Fat Extraction com placas de aquecimento, suportes e condensadores de refluxo

Beckers de 100 ml (para adaptação aos suportes)

Cartuchos de celulose

Suportes para cartuchos

Frascos para recuperação do solvente

Estufa a 105° C

Balança analítica

Dessecador com dessecante

Éter anidro ou sulfúrico p. a

Nota: os itens 2, 3, 4 e 5 são próprios do aparelho Goldfish.

3. Procedimento

Secar o becker por 2 horas na estufa à 105°C. Deixar 1 hora no dessecador e pesar (P).

Pesar 2,0 g de amostra seca (em estufa 105°C por uma noite), num papel de filtro previamente identificado. Enrolar e fazer um pacote e colocar dentro do cartucho de celulose.

Colocar o cartucho dentro do suporte especial e adaptá-lo para a extração, junto ao condensador.

Adicionar no becker 40 ml de éter anidro ou sulfúrico e adaptá-lo ao suporte, junto ao condensador. Levantar cuidadosamente as placas de aquecimento. Ligar a água e a placa de aquecimento (no “High”). E extrair a gordura até o refluxo se tornar límpido (em torno de 4 a 8 horas). Esfriar.

Recuperar o solvente em frasco especial, adaptado ao conjunto, por evaporação. Evaporar o restante do éter contido no copo de becker, usando a placa de aquecimento em (“Low”). Esfriar.

Colocar o copo de becker com a gordura e o pacote com a amostra desengordurada, na estufa à 105° C por 2 horas e 15 minutos.

Esfriar em dessecador, no mínimo 1 hora. Pesar (P₁).

Guardar o cartucho com o material desengordurado para determinação de Fibra Bruta.

4. Cálculo

$$\% \text{ de gordura bruta} = \frac{P_1 - P \times 100}{\text{peso da amostra}}$$

ANEXO 6

Determinação das cinzas

As cinzas são obtidas pela queima de uma quantidade conhecida de amostra num forno tipo mufla à temperatura de aproximadamente 600° C até eliminação completa do carvão. As cinzas deverão ficar brancas ou ligeiramente acinzentadas. Nem sempre este resíduo representa toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização nesse aquecimento.

A matéria orgânica é o material que desaparece com a queima da amostra.

1. Material

Forno tipo Mufla

Dessecador

Balança analítica.

2. Procedimento

Pesar 2,0 g de amostra em cadinho de porcelana previamente seco a 105° C, ou

Utilizar o material que se determinou a umidade.

Colocar o cadinho com a amostra seca na mufla à 600° C por duas horas.

Esfriar em dessecador, no mínimo uma hora. Pesar as cinzas (P3).

3. Cálculo

$$\% \text{ MO na MS} = \frac{P_2 - P_3}{P_1 - T} \times 100$$

$$\% \text{ de Cinzas} = 100 - \% \text{ MO}$$