

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Efeitos comportamentais, ingestivos e metabólicos de injeções
intracerebroventriculares de Orexina A e Orexina B em pombos
(*Columba livia*)**

EDUARDO SIMÃO DA SILVA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito
à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: José Marino Neto

Florianópolis – SC

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Silva, Eduardo Simão da. **Efeitos comportamentais, ingestivos e metabólicos de injeções intracerebroventriculares de Orexina A e Orexina B em pombos (*Columba livia*)**. Florianópolis. 2007. 68 p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Curso de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto

Defesa: 31/07/2007

O presente trabalho descreve experimentos realizados com o objetivo de avaliar os efeitos de injeções intracerebroventriculares (ICV) de Orexina A (OxA) ou Orexina B (OxB) sobre a ingestão de alimentos, comportamento espontâneo e nos níveis plasmáticos de glicose e ácidos graxos livres (AGL) em pombos (*Columba Livia*). A duração, frequência e latência para o primeiro episódio dos comportamentos de comer, beber, locomoção, autolimpeza, exploração do ambiente, imobilidade alerta e sonolência foram avaliados ao longo de 1, 2, 3 e 24 horas. As injeções ICV de OxA (0,6 e 2,0 mol) aumentaram significativamente a duração e frequência, bem como reduziram a latência de comportamentos ligados a vigília. A OxA (0,6 e 2,0 mol) também diminuiu a duração e frequência, bem como aumentou a latência de comportamentos ligados ao sono. A ingestão de alimentos ao curto prazo, não foi modificada nem pela injeção de OxA ou de OxB ao final de 1, 2, 3 e 24 horas. A injeção de OxB não causou alteração dos comportamentos. O registro contínuo da ingestão de alimento e água durante 24 horas da ingestão de água e ração após a injeção de OxA (0,6 nmol), OxB (0,6 nmol) ou veículo (NaCl 0,9%) mostrou que a OxA aumentou a ingestão de ração 4 horas após a injeção e diminuiu a ingestão de ração 6 horas após a injeção. A OxB não modificou a ingestão de alimentos nesses experimentos. A avaliação das alterações dos níveis plasmáticos de glicose e AGL 0, 15 e 30 minutos após a injeção ICV de OxA (0,2 ou 0,6) ou veículo (NaCl 0,9%) mostrou que a OxA não foi capaz de induzir mudanças significativamente na concentração de glicose e AGL. Podemos concluir a partir desses experimentos que a OxA participa da regulação do estado sono/vigília nos pombos, o que indica que essa função do sistema orexinérgico é um atributo conservado em aves.

Agradecimentos

Agradeço a Deus.

Aos meus pais, Ailton e Mercedes que com muito amor, sabedoria, paciência e crença no meu potencial dedicaram esforço imensurável à minha formação.

À minha esposa Kathryn, pela compreensão, amor e por me auxiliar em momentos decisivos para a realização deste trabalho.

Agradeço especialmente ao meu Orientador, Prof Dr José Marino Neto, pelos ensinamentos e compreensão dedicados e por me orientar a ser o meu “pior juiz”.

À prof. Dra. Marta Aparecida Paschoalini, pelas valiosas orientações.

Ao prof Dr Edison Sanfelice André pela participação na banca examinadora e relevantes considerações

Aos colegas de laboratório que participaram ativamente deste trabalho, os acadêmicos Ana Izabel Pezlin e Thiago Viçoso dos Santos.

Aos colegas de laboratório que compartilharam momentos alegres e desafiadores, Murilo Marcos dos Santos,

Bruno Blanco Araújo, Fábio Rodrigo Mesquita Borges.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Ciências Fisiológicas, Carlos Corrêa Jacob, Ana Cláudia, Carlos Espíndola e Dona Vilma.

Aos colegas docentes do Departamento de Ciências Fisiológicas, prof Dr Moacir Serralvo Faria e Prof Dra

Cristina Maria Henrique Pinto e Prof Washington Portela pelo companheirismo e compreensão dispensados à este novo professor

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADO!

À Kathryn, Ailton e Mercedes.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	I
Lista de Tabelas.....	II
Lista de Figuras.....	III
Resumo.....	IV
Abstract.....	V
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	12
3. Materiais e Métodos.....	14
3.1 Animais.....	15
3.2 Implantação de cânulas-guia para as injeções intracerebroventricular (ICV).....	15
3.2.1 Verificação da localização da cânula ICV.....	17
3.3 Injeção intracerebroventricular de drogas.....	17
3.4 Soluções e doses administradas.....	18
3.5 Protocolos experimentais.....	19
3.5.1 Experimento 1: Efeitos de injeções ICV de orexina A e B sobre comportar ingestivos e não ingestivos.....	19
3.5.1.1 Registro comportamental.....	20
3.5.2 Experimento 2: Controle ao longo prazo da ingestão de alimentos.....	22
3.5.3 Experimento 3: Canulação da artéria braquial.....	26
3.5.3.1 Coleta de amostras sanguíneas.....	27
3.5.3.2 Determinação de AGL e glicose plasmática.....	27
3.6 Análise dos resultados.....	28
4. Resultados.....	29
4.1 Experimento 1: Efeitos comportamentais de injeções ICV de orexinas em pombos....	30
4.1.1. Efeitos de injeções ICV de veículo.....	31
4.1.2. Efeitos ingestivos de injeções ICV de orexinas.....	31
4.1.3. Efeitos comportamentais de injeções ICV de orexinas.....	31
4.2. Experimento 2: Efeitos ingestivos a longo prazo de injeções ICV de orexinas.....	46

4.3. Experimento 3: Efeitos metabólicos de injeções ICV de orexinas.....	49
5. Discussão.....	51
6. Referências Bibliográficas.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos ingestivos de injeções IVC de orexina A em pombos.....	37
Tabela 2: Efeitos ingestivos de injeções IVC de orexina B em pombos.....	37
Tabela 3: Efeitos comportamentais da injeção de Orexina A em pombos.....	38
Tabela 4: Efeitos comportamentais da injeção de Orexina B em pombos.....	38
Tabela 5: Efeitos comportamentais de injeções ICV de OxA em pombos.....	39
Tabela 6: Efeitos comportamentais de injeções ICV de OxB em pombos.....	40
Tabela 7. Valores de linha de base para glicose sanguínea e ácidos graxos livres (AGL) pombos.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH.....	Hormônio estimulador de Melanócitos α
AgRP.....	Peptídeo Relacionado ao gene de Cutia
AL.....	Aulto-Limpeza
CART.....	Peptídeo Relacionado à Cocaína e Anfetamina
CEUA.....	Comitê de ética no Uso de Animais
COBEA.....	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EA.....	Exploração do Ambiente
EPM.....	Erro Padrão da Média
GPCR.....	Receptor Acoplado á Proteína G
ICV.....	Intracerebroventricular
IA.....	Imobilidade Alerta
LC.....	Lócus Cerúleos
LH.....	Hipotálamo Lateral
LO.....	Locomoção
MCH.....	Hormônio Concentrador de Melanocortina
OxA.....	Orexina A
OxB.....	Orexina B
OX1R.....	Receptor de Orexina tipo 1
OX2R.....	Receptor de Orexina tipo 2
PVN.....	Núcleo Paraventricular
RNAm.....	Ácido Ribonucléico mensageiro
SNC.....	Sistema Nervoso Central
SQN.....	Núcleo Supraquiasmático
SO.....	Sonolência
TMN.....	Núcleo Tuberomamilar
UFSC.....	Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografia do ambiente experimental de registro da ingestão de alimento e água.....	24
Figura 2: Modelo de gráfico gerado pelo SIRC.....	26
Figura. 3. Ingestão de alimentos 1, 2, 3, horas após injeção ICV.....	35
Figura. 4. Ingestão de alimentos 3h e 24 após injeção ICV.....	36
Figura 5. Duração de Sonolência (SO) e Latência para Sonolência (SO).....	41
Figura 6. Duração de exploração do ambiente (EA) e Latência para Imobilidade Alerta	81

RESUMO

O presente trabalho descreve experimentos realizados com o objetivo de avaliar os efeitos de injeções intracerebroventriculares (ICV) de Orexina A (OxA) ou Orexina B (OxB) sobre a ingestão de alimentos, comportamento espontâneo e nos níveis plasmáticos de glicose e ácidos graxos livres (AGL) em pombos (*Columba Livia*). A duração, frequência e latência para o primeiro episódio dos comportamentos de comer, beber, locomoção, autolimpeza, exploração do ambiente, imobilidade alerta e sonolência foram avaliados ao longo de 1, 2, 3 e 24 horas. As injeções ICV de OxA (0,6 e 2,0 mol) aumentaram significativamente a duração e frequência, bem como reduziram a latência de comportamentos ligados a vigília. A OxA (0,6 e 2,0 mol) também diminuiu a duração e frequência, bem como aumentou a latência de comportamentos ligados ao sono. A ingestão de alimentos ao curto prazo, não foi modificada nem pela injeção de OxA ou de OxB ao final de 1, 2, 3 e 24 horas. A injeção de OxB não causou alteração dos comportamentos. O registro contínuo da ingestão de alimento e água durante 24 horas da ingestão de água e ração após a injeção de OxA (0,6 nmol), OxB (0,6 nmol) ou veículo (NaCl 0,9%) mostrou que a OxA aumentou a ingestão de ração 4 horas após a injeção e diminuiu a ingestão de ração 6 horas após a injeção. A OxB não modificou a ingestão de alimentos nesses experimentos. A avaliação das alterações dos níveis plasmáticos de glicose e AGL 0, 15 e 30 minutos após a injeção ICV de OxA (0,2 ou 0,6) ou veículo (NaCl 0,9%) mostrou que a OxA não foi capaz de induzir mudanças significativamente na concentração de glicose e AGL. Podemos concluir a partir desses experimentos que a OxA participa da regulação do estado sono/vigília nos pombos, o que indica que essa função do sistema orexinérgico é um atributo conservado em aves.

ABSTRACT

The present work describes experiments designed to assess the effects of intracerebroventricular (ICV) injections of Orexin A (OxA) or Orexin B (OxB) on food intake, spontaneous behavior and circulating glucose and free fatty acids (FFA) in the pigeon (*Columba Liviaevalu cedetin A Tmdong-tfxB*) oning gl0tinggl141c 0.7(,6 nmol),xAxB(0,6 nmo

1. INTRODUÇÃO

O hipotálamo é um centro integrativo essencial à sobrevivência de vertebrados e reprodução de suas espécies. Esse centro integrativo emergiu diferentemente nos vertebrados enquanto cada espécie se adaptou a ambientes distintos. Apesar das evidentes diferenças entre espécies de vertebrados, o hipotálamo preserva algumas características anatômicas entre os animais deste subfilo, por exemplo presença de núcleos como núcleo Ventromedial (VMN) e o núcleo Supraquiasmático (SQN) comum a todos os vertebrados (Sarnat & Netsky, 1974). Alguns aspectos funcionais do hipotálamo são comuns a todos os vertebrados, por exemplo, o controle do sistema nervoso autônomo, a regulação do apetite e a regulação da atividade endócrina através da regulação da secreção de hormônios da hipófise (Sarnat & Netsky, 1974). A presença de neurotransmissores com estrutura química e funções semelhantes no hipotálamo é outra característica comum aos vertebrados [p. ex. hormônio estimulador do melanócito (- MSH)(Cerdeira-Reverte *et al*, 2003); Neuropeptídeo Y (NPY) (Griffin *et al*, 1994)].

O balanço energético é uma atividade que é regulada por esse importante sistema de controle. Sua importância reside no fato de que os tecidos que compõem um organismo vivo requerem constante acesso à energia para desempenhar suas funções (Foster & McGarry, 1996). O controle neural da ingestão de alimentos em mamíferos envolve um complexo sistema de interações entre neurônios hipotalâmicos, que contêm neurotransmissores que aumentam ou diminuem a ingestão de alimentos, o gasto energético e os depósitos de gordura corporal com base em informações sobre o estado nutricional [Boswell, Li & Takeuchi; (2002); Hillebrand *et al* (2002); Arora & Anubhuti (2006)].

Alguns desses neurotransmissores são peptídeos que atuam diminuindo ou aumentando a ingestão de alimentos. Dentre eles está o hormônio estimulador de melanócitos α (α -MSH) (Poggioli *et al*, 1986), o peptídeo regulado por cocaína e anfetamina (CART) (Kristensen *et al*, 1998), o NPY (Levine & Morey, 1984), o Peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP) (Rossi *et al*, 1998) e de particular importância para este trabalho as orexinas (Sakurai *et al*, 1998; de Lecea *et al*, 1998). Neurotransmissores não-peptídeos também atuam aumentando ou diminuindo a ingestão de alimentos como catecolaminas, ácido γ -aminobutírico (GABA) e o glutamato (Kelly *et al*, 1977; Oligiati *et al*, 1980; Reddy *et al*, 1986; Ritter & Stone, 1987; Leibowitz *et al*, 1988). Estes neurotransmissores formam uma rede neuronal de controle da ingestão de alimentos e agem em resposta à sinais metabólicos (por exemplo glicose) (Nicolaidis & Rowland, 1976; Smith & Gibbs, 1979, Belin & Ritter, 1981), e hormonais como a Leptina (Satoh *et al*, 1997), Insulina (McGowan *et al*, 1992), e a Bombesina (Stuckey *et al*, 1995).

Em mamíferos as orexinas estão expressas em neurônios do hipotálamo lateral (LH), uma região que de longa data vem sendo relacionada ao controle da ingestão de alimentos (Elmqvist *et al*, 1999). No LH encontram-se neurônios produtores de neuropeptídeos que aumentam a ingestão de alimentos como a galanina (Kirkouli *et al*, 1986) e o hormônio concentrador de melanina (MCH) (Qu *et al*, 1996).

Após a purificação de dois peptídeos a partir de extratos de cérebro de ratos que ativaram receptores acoplados à proteína G (GPCRs), Sakurai e colaboradores (1998) obtiveram a expressão de um GPCR "órfão" humano (em células HEK293), e uma vez que a injeção intracerebroventricular (ICV) destes peptídeos estimulava agudamente a

ingestão de alimentos em ratos, estes peptídeos foram batizados como orexina A (OxA) e orexina B (OxB), nomes derivados da palavra grega "orexis", que significa apetite. OxA (com 33 aminoácidos) e OxB (com 28 aminoácidos) são produzidos pela clivagem de um único polipeptídeo precursor (prepro-orexina; Sakurai *et al*,1998). No mesmo período, De Lecea e colaboradores (1998), procuraram por ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) expresso especificamente dentro do hipotálamo e identificaram um cDNA que codifica um polipeptídeo idêntico ao prépro-orexina. Os supostos peptídeos maduros foram chamados de hipocretina-1 (orexina-A) e hipocretina-2 (orexina-B). As seqüências de aminoácidos de ambos (orexina A e B) são praticamente idênticas entre as espécies de mamíferos investigadas (De Lecea *et al*, 1998).

Dois receptores de orexinas foram identificados (Sakurai *et al*, 1998). O receptor de orexina do tipo 1 (OX1R) é o receptor previamente utilizado para a identificação e purificação de orexinas. Posteriormente foi identificado um novo receptor acoplado à proteína G, o receptor de orexina do tipo 2 (OX2R), o qual demonstra ter uma identificação de 64% com o OX1R. Em ensaios de ligação competitiva ao radioligante usando 125I-orexina-A, a orexina-A une-se ao OX1R e OX2R com afinidade similar, enquanto a orexina-B une-se ao OX2R com maior afinidade do que ao OX1R. O OX1R acopla-se à subclasse de proteínas heterotriméricas Gq/11, levando à atividade excitatória direta; o OX2R deve-se acoplar a proteínas Gi/o ou Gq/11, com atividade direta excitatória ou inibitória dependendo do neurônio alvo (Sakurai *et al*, 1998; Van den Pol, 1998).

Os receptores de orexina estão difusamente espalhados pelo SNC de ratos. Segundo Triveldi e colaboradores (1998) que estudaram a distribuição de ambos

receptores orexinérgicos por hibridização *in situ*, o padrão de expressão dos receptores OX1R e OX2R são diferentes em ratos. No hipotálamo o OX1R está abundantemente expresso no VMN, com expressões moderadas na área pré-óptica medial, núcleo hipotalâmicos dorsomedial e lateroanterior, núcleo lateromamilar e área hipotalâmica posterior. Em contraste, o OX2R é expresso predominantemente no Núcleo Paraventricular (PVN), com sinais que vão de fraco a moderado no VMN, núcleo hipotalâmico dorsomedial e áreas hipotalâmicas lateral e posterior. Além do hipotálamo o OX1R é encontrado no *taenia tecta*, núcleo septohipocampal, núcleo intersticial da stria terminalis, núcleo paraventricular talâmico, regiões CA1 e CA2 do hipocampo, área amígdalohipocampal, núcleos mediano e dorsal da rafe e locus ceruleus (LC). Por outro lado o OX2R é expresso no tubérculo olfatório, camada VI do córtex cerebral, núcleo accumbens, núcleos talâmicos medial central e paraventricular, núcleo subtalâmico, núcleo pretectal anterior e CA3 do hipocampo (Triveldi *et al*, 1998).

Neurônios que expressam orexina em roedores são localizados exclusivamente no hipotálamo lateral e posterior (área perifornical) (Sakurai *et al*, 1998, Van den Pol, 1998; Nambu, 1997). Seus axônios e terminais axonais projetam-se difusamente através do sistema nervoso central, incluindo o córtex cerebral, o sistema límbico (e.g. amígdala e hipocampo), núcleos hipotalâmicos (e.g. núcleo arqueado e núcleo tubero-mamilar [TMN]), e o tronco cerebral (e.g. substancia cinzenta central, LC, e núcleos da rafe) (Nambu *et al*, 1999; Peyron *et al*, 1998; Date *et al*, 1999; Van den Pol, 1999). Essas numerosas projeções das fibras orexinérgicas mostraram sobrepôr as localizações cerebrais que possuem RNAm dos receptores OX1R e OX2R em vários sítios no SNC. Por exemplo, núcleos que recebem aferências orexinérgicas como o LC, o núcleo

tegmental laterodorsal e o núcleo tegmental pedúnculo pontino expressam principalmente RNAm para OX1R, enquanto o TMN, o núcleo accumbens, e o núcleo septal expressam principalmente RNAm para OX2R.

Injeções ICV de orexina A em ratos aumentaram a ingestão de alimentos, por isso esse peptídeo foi inicialmente caracterizado como fator orexigênico (estimulante de apetite) (Sakurai *et al*, 1998; Edwards *et al*, 1999; Haynes *et al*, 1999; Ida *et al*, 1999; Yamanaka *et al*, 1999). Uma importante diferença nos efeitos de ingestão entre as orexinas e outros fatores orexinérgicos, como o NPY e o MCH, é que as orexinas aumentam ambos, ingestão de alimentos e gasto energético, enquanto outros peptídeos relacionados à ingestão geralmente diminuem o gasto energético (Nishino *et al*, 2001; Hara *et al*, 2001; Lubkin *et al*, 1998; Chemelli *et al*, 2001).

Várias linhas de evidência mostram que a expressão das orexinas é regulada pelo balanço energético. Em animais submetidos ao jejum a expressão de orexina é aumentada em neurônio do hipotálamo lateral (Sakurai *et al*, 1998). Além disso, neurônios orexinérgicos têm conexão densa e recíproca com outros núcleos hipotalâmicos que regulam o comportamento ingestivo (Nambu *et al*, 1999; Peyron *et al*, 1998; Date *et al*, 1999; Broberger *et al*, 1998; Elias *et al*, 1998; Horvath *et al*, 1999). Os neurônios orexinérgicos são ativados por hipoglicemia (Moriguchi *et al*, 1999; Cai *et al*, 2001). Neurônios orexinérgicos isolados reduzem sua atividade em resposta à glicose e leptina, e aumentam sua atividade em resposta a grelina, um peptídeo orexinérgico derivado do estômago (Yamanaka *et al*, 2003).

Alguns alvos das projeções das fibras orexinérgicas são núcleos relacionados ao controle de funções autonômicas e neuroendócrinas como núcleo paraventricular

talâmico e o núcleo do trato solitário, núcleo motor dorsal do vago e PVN (Date *et al*, 1999). Injeções ICV de OxA induziram expressão de c-Fos, um gene de expressão imediata indicativo de atividade celular, nesses núcleos sugerindo participação da OxA no controle de funções autonômicas (Date *et al*, 1999). Injeções ICV de orexina, além da ingestão de alimentos, aumentaram também a temperatura corporal, como demonstrado por Monda *et al*. (2005). Esses autores observaram que injeções ICV de OxA resultaram num aumento na temperatura retal e temperatura do tecido adiposo, com participação do VMN, em ratos. Injeções ICV de OxA, mas não de OxB, aumentaram a ingestão de alimentos em camundongos além de aumentar o metabolismo basal conforme demonstrado em experimentos por calorimetria (Lubkin & Stricker-Krongrad, 1998). Soma-se a essas evidências da participação das orexinas no controle do metabolismo, um experimento de determinação de projeções multissináptica pelo método de marcação viral transneuronal que mostrou neurônios orexinérgicos do LH projetando-se para gânglios simpáticos que inervam o coração e a glândula adrenal (Geerling *et al*, 2003). Combinados esses dados apontam para participação do sistema orexinérgico na regulação de funções autonômicas.

A locomoção também é um comportamento regulado pelas orexinas. Kotz *et al*. (2002), demonstraram que injeções de OxA no LH de ratos, aumentaram não somente a ingestão de alimentos como também a locomoção espontânea e o número de voltas efetuadas pelo animal na roda de corrida colocada no ambiente experimental, à qual tinha livre acesso. Experimentos subseqüentes (Kiwaki *et al*. 2004) demonstraram que injeções de OxA no PVN aumentaram dramaticamente a atividade física espontânea (medido por

sensores infravermelhos no ambiente experimental, que capta o deslocamento do animal) e aumento no consumo de oxigênio independentemente da fase do ciclo claro/escuro.

A observação de que pacientes com um tipo precoce de narcolepsia apresentaram deficiência de neurônios orexinérgicos (Peyron *et al*, 2000) foi o primeiro indício que revelaria a participação decisiva do sistema orexinérgico na narcolepsia. A partir deste dado, outros estudos foram conduzidos para verificar a participação das orexinas no controle do ciclo sono/vigília. Camundongos *knockout* para o gene que codifica o prépro-orexina, bem como camundongos e cães com mutação do gene que codifica o OX2R, apresentaram fenótipo notavelmente semelhante à narcolepsia (Willie *et al*, 2003). Injeção ICV de OxA em ratos durante a fase clara (período inativo do animal) aumentou a vigília e diminuiu os períodos de sono paradoxal (Hagan *et al*, 1999), ainda um estudo de atividade dos neurônios orexinérgicos mostrou que durante a fase escura, neurônios orexinérgicos expressam o cFos o que não acontece na fase clara (Sakurai, 2005). Outros estudos em mamíferos mostram que as orexinas participam do controle do alerta (Huang *et al*, 2001; Espana *et al*, 2001), e têm importante papel na narcolepsia (Lin *et al*, 1999; Thannickal *et al*, 2000).

Portanto, pode-se afirmar que o sistema orexinérgico tem participação na regulação do ciclo sono/vigília, estando ativo durante a fase ativa do animal e inativo durante a fase de sono. Provavelmente o controle desse sistema se dá pela excitação de neurônios noradrenérgicos do LC, histaminérgicos do TMN e serotoninérgicos do núcleo da rafe (Date *et al*, 1999; Peyron *et al*, 1998; Nambu *et al*, 1999; Brown *et al*, 2001).

Como visto, as orexinas têm papel no controle do alerta e a atividade dos neurônios orexinérgicos é sensível à condição energética. Logo, uma possível função das

orexinas será um papel de modular o estado de alerta em resposta à homeostase energética interna (Willie *et al*, 2001). Corroborando esta hipótese, quando comparados com animais controle, camundongos *knockout* para o gene prépro-orexina não reduziram o sono, e não aumentaram o alerta e a atividade locomotora sob condições de jejum (Yamanaka *et al*, 2003).

Apesar de as orexinas serem extensivamente estudadas em mamíferos, poucos dados foram produzidos com outras espécies animais. Em peixes foram encontrados duas populações de neurônios imunoreativos à orexina, uma no hipotálamo anterior, outra ao longo do terceiro ventrículo na área pré-óptica anterior e núcleo supraquiasmático (Kaslin *et al*, 2004). Injeções ICV de orexina A e B aumentaram a ingestão de alimento e quantidade ingerida na primeira hora de experimento no *Carassius auratus* (Volkoff *et al*, 1999). Isso indica participação das orexinas no controle da ingestão de alimentos e comportamento ingestivos em peixes. Além de aumentar a ingestão de alimentos, injeções ICV de OxA aumentam a locomoção em peixes, e o número de células imunoreativas à orexina é aumentada pelo jejum nesses animais (*Carassius auratus*) (Nakamachi *et al*. 2006).

Shibahara *et al* (1999) observaram a distribuição de neurônios imunoreativos a orexina no cérebro de *Xenopus*. Os pericários imunoreativos foram encontradas exclusivamente no hipotálamo e subtálamo desses animais. Por outro lado, fibras contendo orexina foram encontradas dentro e também fora do hipotálamo de maneira similar à distribuição nos roedores (citado acima). Ainda em anfíbios, Singletary *et al* (2005), observaram que os neurônios imunoreativos a orexina no sistema nervoso central da *Hyla cinerea* estão centralizados no núcleo supraquiasmático. Poderia-se atribuir as

diferenças na distribuição dos neurônios imunoreativos à orexina entre anfíbios, à diferentes especializações de cada espécie, um mais terrestre (*Xenopus*) outro mais aquático (*Hyla*), ou mesmo à diferenças técnicas como o anticorpo utilizado para a detecção da orexina (Singletary *et al*, 2005).

Neurônios imunoreativos à orexina A e B em aves são encontrados no PVN estendendo para a LH no *Carpodacus mexicanus*, um pássaro migratório comum na América do norte (Singletary *et al*. 2006). No mesmo estudo, verificou-se que as fibras desses neurônios produtores de orexina inervam mais intensamente o diencéfalo e mesencéfalo, de intensa a moderadamente o metencéfalo e de maneira esparsa o telencéfalo (Singletary *et al*. 2006). Mas a primeira evidência da presença de neurônios produtores de orexinas em aves veio com o trabalho de Ohkubo *et al* (2002), que clonaram o cDNA das orexinas e localizaram os sítios de expressão do RNAm de orexina no cérebro de galinhas, além de comparar a expressão do RNAm em galinhas com alimentação *ad libitum* e que passaram por jejum. Os dados (Ohkubo *et al*. 2002) demonstram haver semelhança entre cDNA de orexinas de mamíferos e galinhas, indicando conservação evolutiva e mostram que a expressão do RNAm de orexina no cérebro de galinhas foi também muito similar à expressão no cérebro de mamíferos, limitando-se ao núcleo periventricular do hipotálamo e hipotálamo lateral. A expressão de orexinas no hipotálamo de aves foi aumentada, porém não significativamente, pelo jejum (Ohkubo *et al*, 2002).

A verificação da distribuição do receptor de orexina em vários tecidos de galinhas foi realizada e os resultados obtidos demonstram forte presença do receptor no telencéfalo, hipotálamo e tecto óptico, nos tecidos periféricos onde se observou maior

presença do receptor no testículo (Ohkubo *et al*, 2003). Nesse trabalho o autor utilizou a linhagem Leghorn, que são animais fenotipicamente selecionados para a ovoposição.

Existem poucas evidências sobre o possível papel das orexinas no controle ingestivo e nenhuma evidência sobre uma possível ação comportamental no SNC de aves. Na única publicação em aves (Furuse *et al*, 1999), injeções centrais de OxA não alteraram a ingestão de alimentos, enquanto injeções de OxB diminuíram significativamente a ingestão depois de duas horas. Porém, foram utilizados animais jovens (2 dias), isto é, animais ainda em desenvolvimento, além disso os animais escolhidos foram da linhagem Broiler. Esta linhagem é resultado de gerações de seleção fenotípica o que pode ter modificado a circuitaria de controle de ingestão dessas galinhas. Assim galinhas que amadurecem sexualmente mais cedo são utilizadas para ovoposição e galinhas de maior anabolismo são utilizadas para o corte. Assim, o papel das orexinas no SNC de aves foi pouco explorado.

Em mamíferos as orexinas estão envolvidas no controle do ciclo sono-vigília (Nishino, 2007), da ingestão de alimentos (Edwards *et al*, 1999) e controle possivelmente de outras atividades referentes ao SNC como controle do sistema nervoso autônomo (Monda *et al*, 2007) e nos mecanismos de adição e recompensa (Borgland *et al*. 2006, Harris *et al*, 2007). O fato de que neurônios orexinérgicos possuem projeções localizadas ubiquamente no SNC revela que eles podem atuar como sistema de projeção difusa, assim como sistema serotoninérgico (Barnes e Sharp, 1999) a partir dos núcleos da rafe ou as catecolaminas a partir do LC, que modulam funções no SNC.

2.OBJETIVOS

Com o presente trabalho, pretendemos dar prosseguimento ao exame dos mecanismos de regulação de comportamentos ingestivos em aves investigando o papel das Orexinas neste domínio funcional. Os objetivos específicos do presente trabalho são:

1. Investigar os efeitos de injeções centrais (intracerebroventriculares, ICV) de orexina A (nas doses de 0,2, 0,6, 2 mol), de orexina B (0,2, 0,6, 2 mol) ou de veículo (solução de NaCl 0,9%, 5 µL) sobre comportamentos espontâneos (ingestivos e não-ingestivos).
2. Descrever os efeitos ingestivos a longo prazo (24 h) de injeções centrais (ICV) de orexina A (na dose 0,6 mol), de orexina B (na dose 0,6 mol) ou de veículo (solução de NaCl 0,9%, 5 µL).
3. Investigar os efeitos de injeções centrais (ICV) de orexina A (nas doses de 0,2, 0,6 mol) ou de veículo (solução de NaCl 0,9%, 5 µL) sobre a mobilização glicose e ácidos graxos livres no plasma.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Em todos os experimentos descritos, foram utilizados pombos de ambos os sexos com peso corporal variando entre 350-450 gramas e mantidos em gaiolas individuais de arame (50 x 50 x 50 cm, com o assoalho coberto com papel) dispendo de água e alimento granulado para aves (formulação para aves em crescimento, da SUPRA Ltda, Itajaí, SC) *ad libitum* em uma sala com temperatura controlada entre 22-24°C e um ciclo claro-escuro de 12 horas (luz das 7-19 h). Os animais são provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e antes do período de experimento foram ambientados às condições do laboratório por no mínimo 7 dias. Os protocolos de experimentos abaixo descritos foram realizados respeitando-se os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991) e foram aprovados pelo Comitê de Ética sobre o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA- UFSC, protocolo PP00038/CEUA e 23080.012886/2006-91/CEUA/UFSC)

3.2 Implantação de cânulas-guia para as injeções intracerebroventricular (ICV).

Para a cirurgia de implantação das cânulas ICV, os pombos foram anestesiados com uma mistura de xilazina e cloridrato de cetamina [0,33 e 0,66 mg/kg de peso corporal respectivamente, intraperitoneal (ip)]. Em seguida, os animais foram adaptados ao

aparelho estereotáxico tendo a cabeça fixada por intermédio de barras posicionadas no conduto auditivo e no bico, com uma distância entre os dois pontos ajustados para 16 mm e formando um ângulo de 45°. Previamente (2 minutos antes) à incisão no escalpo, e a cada 15-20 minutos durante todo o procedimento, a região onde o campo cirúrgico se encontra é infiltrada subcutaneamente com solução contendo Lidocaína (2%, sem adrenalina, anestésico local). Após a assepsia com álcool iodado ou povidine, uma incisão longitudinal foi realizada no escalpo para a exposição da calota craniana. A seguir, uma cânula guia feita a partir de um segmento de agulha hipodérmica, com 0,7 mm de diâmetro externo e 15 mm de comprimento, foi posicionada dentro do ventrículo lateral de acordo com coordenadas descritas por Karten & Hodos (1967). A cânula foi fixada à calota craniana por meio de parafusos e envolvida por acrílico auto-polimerizável, formando um conjunto sólido capaz de resistir aos eventuais choques mecânicos com a gaiola e a manipulação para injeções. Em cada cânula foi ajustado um mandril de aço inoxidável para evitar sua obstrução. As injeções das diferentes substâncias foram realizadas em animais despertos, uma semana após a implantação da cânula-guia. Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam uma injeção intramuscular (0,1 ml/Kg de peso) de Pentabiótico veterinário, à título de profilaxia para possíveis infecções decorrentes da cirurgia e uma injeção intramuscular de Ketofen (Merial, um analgésico veterinário com ação antipirética e anti-inflamatória, 1 mg/Kg).

O correto posicionamento da cânula foi avaliado durante a cirurgia. Foi utilizado um circuito de tubo de polietileno e um terminal com manômetro ligado à cânula guia e preenchido com solução salina. Quando a cânula guia atingiu a coordenada correta este

circuito foi liberado permitindo à salina que escorresse pelo tubo para o ventrículo no caso dele ser alcançado.

3.2.1 Verificação da localização da cânula ICV:

Após as cirurgias estereotáxicas e pelo menos dois dias antes dos experimentos os animais foram injetados com uma dose de 1 nmol de val-5 angiotensina-II diluída em solução salina para a verificação da posição da cânula. Experimentos realizados em nosso laboratório (Brun *et al.* 2001) demonstraram que injeções ICV de val-5 angiotensina-II aumentam drasticamente a ingestão de água em pombos (de aproximadamente 2 para 28 ml, com latência de aproximadamente 90 segundos). Portanto, animais que beberam quantidades condizentes com os efeitos dipsogênicos provocados pela val-5 angiotensina-II, após sua injeção ICV, foram considerados aptos para os experimentos.

3.3 Injeção intracerebroventricular de drogas:

As injeções ICV foram realizadas por meio de uma agulha injetora que excede em 1 mm o comprimento da cânula-guia, conectada a uma microseringa (Hamilton[®]) de 10 ul. As drogas foram injetadas em um volume de 5 ul, durante um período de 2 minutos (visando minimizar os efeitos de aumentos no volume do líquido céfalo-raquidiano).

3.4 Soluções e doses administradas:

De acordo com o pertinente a cada protocolo experimental, as seguintes drogas e doses foram utilizadas:

-Orexina A (Sigma[®]; Chemical Co. St Louis, Mo, USA), dissolvido em solução de NaCl (0.9% estéril, livre de pirogênios, pH 7,4; utilizada também nos experimentos de controle) Nesses experimentos foram utilizadas as doses de 0,2 , 0,6 e 2 nmol/animal. Optou-se por utilizar este espectro de dose baseado em dados de outros experimentos encontrados na literatura. Estes experimentos (Tachibana *et al.* 2004; Kawakami *et al.*, 2000), também conduzidos com peptídeos em injeções ICV e também com o objetivo de investigar o papel neurofisiológico, utilizaram doses semelhantes de peptídeos.

-Orexina B (Sigma[®]; Chemical Co. St Louis, Mo, USA), dissolvido em solução de NaCl (0.9% estéril, livre de pirogênios, pH 7,4; utilizada também nos experimentos de controle). Foram utilizadas as doses de 0,2; 0,6 e 2 nmol/animal.

-Val-5 angiotensina-II, (Sigma[®]; Chemical Co. St Louis, Mo, USA), dissolvido em solução de NaCl (0.9% estéril, livre de pirogênios, pH 7,4). Utilizado na dose de 1 nmol por animal para verificação da posição da cânula guia. Dose utilizada conforme justificado no item 3.2.1.

3.5 Protocolos experimentais:

3.5.1 Experimento 1: Efeitos de injeções ICV de orexina A e B sobre comportamentos ingestivos e não ingestivos:

Todos os protocolos abaixo descritos foram realizados após um mínimo de 7 dias da cirurgia de implantação das cânulas-guia e após o retorno ao peso corporal pré-cirúrgico, com os animais saciados de água e comida. Após cada injeção, os animais retornaram à sua gaiola-residência. O registro comportamental foi realizado por uma hora e a verificação do consumo de alimento e de água teve início, perdurando por três horas. Os animais receberam orexina A (0,2, 0,6 ou 2,0 nmol) ou orexina B (0,2, 0,6 ou 2,0 nmol) ou veículo.

Durante a primeira hora após a injeção da droga, registrou-se continuamente, em formulários de papel, latência para o primeiro episódio, frequência e duração de comportamentos ingestivos: água e alimento, bem como, latência, frequência e duração de comportamentos não ingestivos: autolimpeza (AL), locomoção (LO), imobilidade alerta (IA), exploração do ambiente (EA) e sonolência (SO) (VER DESCRIÇÃO ADIANTE). Após 1, 2, 3 e 24 h da injeção foram quantificados: alimento e água ingeridos. A ração perdida no chão da gaiola foi recuperada para pesagem.

Como controle adicional, registrou-se o consumo diário de água e de alimento quarenta e oito horas imediatamente anteriores ao experimento.

3.5.1.1 Registro comportamental:

imediatamente após a injeção ICV e à reapresentação da ração e água nos procedimentos acima descritos, os padrões comportamentais de ingestão (duração, frequência e latência) e outros comportamentos não-ingestivos exibidos pelo animal foram registrados durante um período 60 minutos. Os critérios de identificação destes comportamentos foram realizados de acordo com o catálogo comportamental apresentado abaixo (definidos e testados em experimentos anteriores em nosso laboratório por Steffens e cols, 1997; Hagemann e cols., 1998; Zeni e cols., 1999; Brun e cols., 2001; Silva e cols., 2004; Hackl e cols., 2005).

Os comportamentos registrados foram definidos como:

1. Comer (“CO”): Comportamento que envolve uma seqüência de diversos comportamentos, seguindo um padrão temporal específico. Primeiramente o pombo abaixa a cabeça em direção ao alimento com o bico completamente fechado e os olhos bem abertos. Imediatamente ao contato com o alimento, os olhos se fecham e o bico se abre para segurar o grão que fica preso na ponta da mandíbula e da maxila. A cabeça é retirada rapidamente com um breve chacoalhar que serve para o grão seguir da ponta do bico para dentro da cavidade bucal. Ao final da mandibulação com a cabeça parada para cima e o bico completamente fechado, o alimento é engolido;
2. Beber água (“BA”): Comportamento que se inicia quando o animal abaixa a cabeça em direção ao bebedouro com a ponta do bico ligeiramente aberta. O animal

mergulha o bico no bebedouro sugando o líquido que entra na cavidade bucal por capilaridade e por movimentos de sucção lingual. Uma vez que esta frase se inicie, a mesma não é interrompida, embora sua amplitude possa variar. A fase final acontece quando o animal ergue novamente a cabeça;

3. Imobilidade alerta (“IA”): a ave permanece imóvel, com a cabeça elevada, os olhos fixos em um determinado ponto e bem abertos, com movimentos de piscar muito rápidos e esporádicos;
4. Exploração do ambiente (“EA”): neste comportamento o animal permanece no assoalho da gaiola ou no poleiro ou realizando movimentos angulares e/ou lineares com a cabeça. Em outros momentos o animal permanece bicando (comportamento desacompanhado de deglutição) as hastes da gaiola, comedouros, bebedouros, ou qualquer outro aparato instalado na gaiola;
5. Sonolento (“SO”): a ave mantém a cabeça fletida e apoiada sobre o peito, pescoço retraído e penas do peito arrepiadas. O animal permanece com pelo menos um dos olhos fechados, com movimentos esporádicos de abertura lenta dos olhos, voltando a fechá-los em no máximo 4 segundos e poderá estar apoiado sobre as duas pernas, uma só, ou mesmo agachado no chão da gaiola;
6. Auto-limpeza (“AL”): movimento de esfregar o bico (ou bicar) nas penas de qualquer parte do corpo. Em outros momentos a ave bate as asas de forma semelhante ao movimento executado durante o vôo, estando, porém apoiado sobre uma superfície.
7. Locomoção (“LO”): qualquer deslocamento dentro da gaiola, o animal deve mover-se de um ponto ao outro dentro da gaiola ou mesmo subir ou descer o poleiro.

3.5.2 Experimento 2: Controle a longo prazo da ingestão de alimentos:

Para a realização deste experimento utilizou-se um sistema instrumentado para registro de comportamentos ingestivos desenvolvido em nosso laboratório (SIRC, Sistema Instrumentado para Registros de Comportamentos Ingestivos; Pereira e cols. 2003). Composto por duas células de carga acopladas uma no comedouro outra no bebedouro e fixadas externamente à gaiola na qual se encontra o animal (Fig. 1). O comedouro e o bebedouro foram acoplados à vasilhas circulares que serviram de reservatório para a comida e a água que extravasavam durante a ingestão (Fig. 1). O conjunto de comedouro/bebedouro e vasilha foi conectado às células de carga. Estas células por sua vez, conectadas à estação retransmissora, que enviava a um computador um registro contínuo e simultâneo (cinco amostras por segundo) do peso de cada célula. Estas informações eram analisadas sob a forma de gráfico (quantidade x tempo). Dessa forma, o início de um episódio ingestivo era caracterizado por uma oscilação positiva na linha de base do gráfico, resultante do peso de uma ou mais bicadas no comedouro ou no bebedouro que, posteriormente, exibia uma linha de base mais negativa e estável caracterizando o término do episódio ingestivo (Fig. 2). Assim, a quantidade ingerida em cada episódio foi obtida da subtração da média de dez amostras de cada linha de base (anterior e posterior ao evento).

Este equipamento permitiu a medição contínua de episódios ingestivos de maneira automática e mantendo distante o observador do ambiente de registro. Os registros obtidos permitiram a extração de atributos comportamentais importantes tais como, o momento preciso da ingestão, a quantidade total consumida, a duração do episódio

ingestivo, a frequência de comportamentos ingestivos, o acompanhamento desses fenômenos ao longo de um período de vinte e quatro horas, a exclusão da interferência do observador sobre o animal.

Então, os efeitos de injeções ICV da dose de 0,6 nmol de orexina A (n=5), orexina B (n=5) ou de veículo sobre a ingestão de alimentos a longo prazo foi avaliada. No início dos experimentos, os animais foram colocados em uma gaiola de dimensões e em ambiente semelhantes aos utilizados para sua manutenção pré-experimental (Fig 1).

Esta gaiola é dotada de comedouro e bebedouro externos à grade, aos quais o animal tem livre acesso por meio de aberturas especialmente construídas, e que estão apoiados sobre balanças (URANO 1000, precisão de 0.1 g).



Figura 1: Fotografia do ambiente experimental de registro da ingestão de alimento e água. A: comedouro; B: bebedouro; C: vasilhas de retenção de comida e água extravasada; D: células de carga.

Após a cirurgia de implantação de cânulas intracerebroventriculares (ver acima), os animais permaneceram nesta gaiola por pelo menos 7 dias antes do início dos experimentos, para recuperação e ambientação. Os animais tiveram acesso à água e comida ao longo de todo o experimento, trocados a cada 24 horas, sempre no mesmo horário (12:00 horas). Os registros foram iniciados duas horas após o ligar das luzes do

ambiente (9:00 horas). As soluções de teste foram aplicadas nos animais, a ração, a água e a cama de papel foram trocadas e o registro prosseguiu por mais 24 horas. Os experimentos foram realizados em 2 grupos de 5 animais cada (um grupo recebeu orexina A e o outro orexina B), sendo cada animal controle dele mesmo. Além das sessões com administração de droga ou veículo, o animal foi investigado também em uma sessão sem qualquer injeção, iniciada exatamente 24 horas antes da injeção da droga ou veículo.

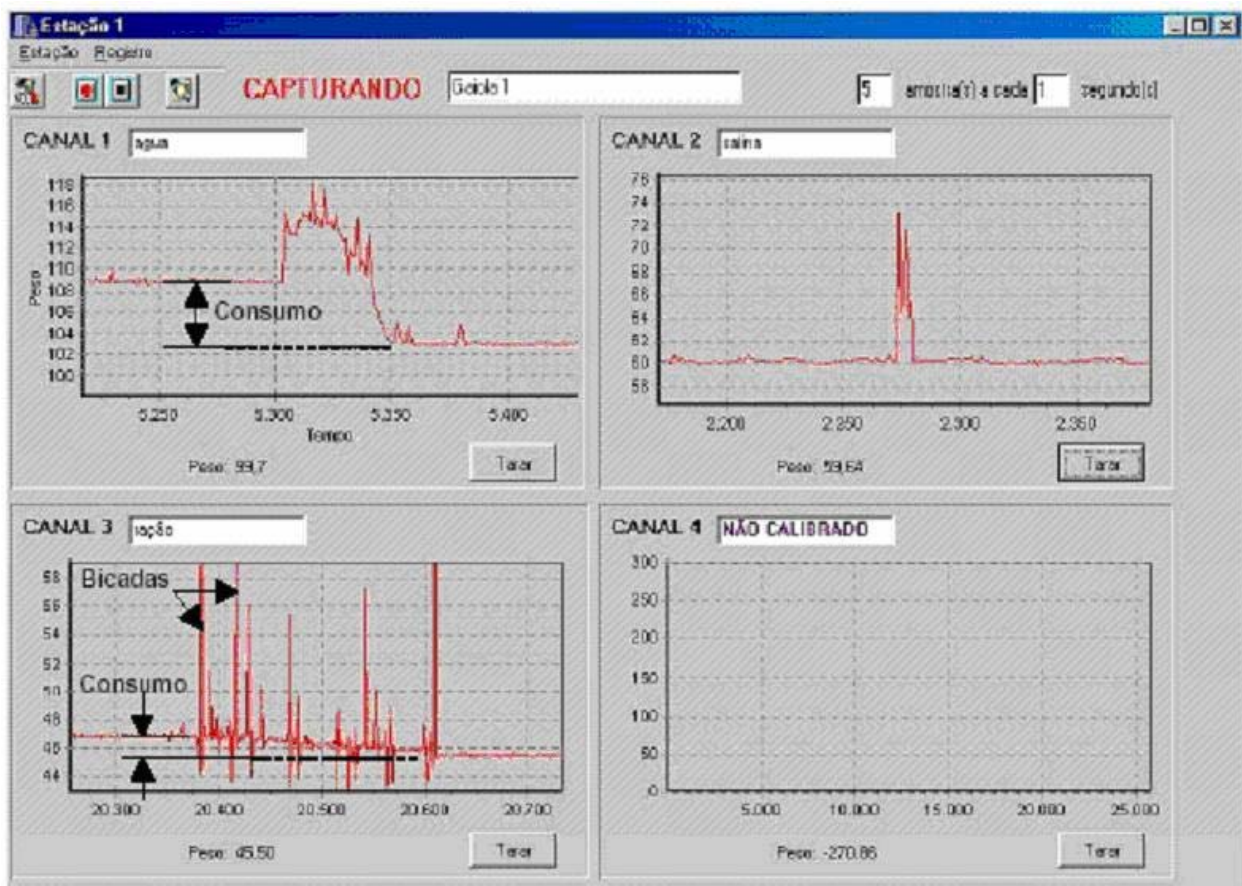


Figura 2: Modelo de gráfico gerado pelo SIRC. As bicadas são identificadas pelos picos do gráfico. O consumo equivale ao peso antes menos o peso após a(s) bicada(s).

3.5.3 Experimento 3: Canulação da artéria braquial:

Para coleta de sangue, um tubo de polietileno foi introduzido nas artérias braquiais sete dias depois da implantação das cânulas-guia ICV. Para a implantação da cânula braquial os animais foram anestesiados por via intra peritoneal (i.p.) e fixados numa mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com as asas abertas. Em seguida, as penas da asa foram retiradas e realizou-se assepsia com álcool iodado no local e feita a incisão na pele para o isolamento arterial. Após esse processo a cânula foi introduzida na artéria braquial

seguido da verificação do correto posicionamento da cânula na artéria braquial e o tubo foi preenchido com solução contendo polivinilpirrolidone (PVP), heparina (500 UI/ml), estreptomicina (2 mg/ml) e penicilina (4800 UI/ ml) para evitar coagulação sanguínea e contaminação bacteriana. As cânulas foram fixadas à artéria através de um fio de algodão e o mesmo foi utilizado na sutura da pele após o término da cirurgia.

3.5.3.1 Coleta de amostras sanguíneas:

Para avaliação das modificações metabólicas (AGL e glicemia), as amostras de aproximadamente 0,6ml de sangue foram retiradas imediatamente antes (tempo 0), 15 e 30 minutos após a injeção das drogas pela cânula guia. As amostras sanguíneas coletadas foram colocadas em tubos heparinizados e centrifugadas a 2000 rotações por minuto durante 15 minutos. Depois da separação, o plasma foi colocado em tubos e armazenados a temperatura de -4°C para posteriores dosagens plasmáticas de AGL e glicose.

3.5.3.2 Determinação de AGL e glicose plasmática:

A concentração plasmática de AGL foi determinada de acordo com o método descrito por Dole e Meinertz (1960), adaptado por Santoro (1967) para pequenos volumes de plasma e a concentração de glicose foi determinada em 20 µl de plasma, utilizando-se o método glicose oxidase.

3.6 Análise dos resultados:

Os dados de consumo de água, comida, os dados comportamentais (duração e latência), bem como os dados de metabólicos plasmáticos para cada tratamento (OxA ou OxB), em todos intervalos de tempo estudados, foram analisados estatisticamente por intermédio de uma análise de variância (ANOVA de uma ou de duas vias, de acordo com o desenho experimental), seguidas pelo teste (post hoc) de Duncan. Nos testes estatísticos dos experimentos de ingestão a longo prazo foi utilizado ANOVA de duas vias, tendo como fatores o tratamento e o tempo. Nos experimentos de determinação dos níveis de glicose e de ácidos graxos livres, os valores foram expressos como média±erro padrão da média (EPM) da diferença entre o basal e o pós-tratamento. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, tendo como fatores o tratamento e o tempo. O nível de significância adotado nesses procedimentos foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Efeitos comportamentais de injeções ICV de orexinas em pombos

4.1.1 Efeitos de injeções ICV de veículo:

Para melhor entendimento dos dados a seguir, descrevemos os resultados obtidos com injeções ICV de veículo. As injeções foram seguidas por uma seqüência de comportamentos característica. Os eventos comportamentais após a injeção ICV de veículo são apresentados pela média \pm erro padrão da média.

Nestes experimentos, cada animal foi controle dele mesmo, isto é, recebeu injeção de veículo (solução salina 0,9%), OxA ou OxB. É importante ressaltar que sempre foi respeitado o tempo de no mínimo sete dias entre as injeções. Não houve diferença significativa entre os grupos controle de OxA e OxB, tanto para os dados ingestivos quanto para os comportamentais.

Ambos os grupos controle mostraram uma seqüência de comportamentos semelhante. Logo após a injeção o animal fica desperto e explorando o ambiente (Lat EA= $3,62 \pm 2,86$ segundos), durante esse período também ingere em média $1,27 \pm 0,28$ gramas por 100 gramas de peso corporal de ração e $1,59 \pm 0,34$ gramas por 100 gramas de peso corporal de água. Durante esta fase comportamentos como LO (Lat= $525,8 \pm 315$ segundos), AL (lat= $238,2 \pm 69,3$ segundos) também são freqüentes. Gradativamente o animal deixa de explorar e locomover-se iniciando uma fase durante a qual o IA (Lat= $261,2 \pm 85,2$ segundos) é predominante. A partir de vinte minutos do início do experimento comportamental, observa-se episódios de SO (Lat= $1208,9 \pm 298,2$ segundos) intercalados com IA.

4.1.2 Efeitos ingestivos de injeções ICV de orexinas:

Os resultados a seguir são de experimentos realizados para analisar os efeitos das orexinas sobre a ingestão e o comportamento ingestivo. A ingestão de alimentos foi analisada através de ANOVA de uma via para cada intervalo de tempo (1ª hora, 2ª hora, 3ª hora, soma das 3 primeiras horas, e 24 horas). Consideramos dose como variável independente e quantidade ingerida (gramas por 100 gramas de peso corporal) como variável dependente e valor significativo $p < 0,05$.

Não houve modificações significantes da ingestão após as injeções de OxA. O mesmo aumento não significativo ocorreu na ingestão de água na primeira hora. (Tabela 1). Não houve alteração na latência, duração ou freqüência da ingestão de ração e água (Tabela 3).

As injeções de orexina B não alteraram a quantidade ingerida de ração ou água. A latência de ingestão de água foi aumentada pela OxB na dose de 0,6 nmol [$F(3,32)=4,35; p=0,05$] (Tabela 4, figura 9) o que não ocorreu com a latência de ingestão de ração. Não houve alteração na latência, duração ou freqüência dos comportamentos ingestivos nas outras doses de OxB (tabela 4).

4.1.3 Efeitos comportamentais de injeções ICV de orexinas:

As injeções ICV de orexina A provocaram o aparecimento de um comportamento esporádico, o bater de asas. O bater de asas é um comportamento caracterizado por postura ereta, pescoço alongado, extensão da cabeça e batidas repetidas e frenéticas

das asas. Esse comportamento não foi inserido no catálogo comportamental por seu caráter esporádico, contudo pode ser relevante examiná-lo uma vez que ele também expressa aumento de atividade. Quando injetado com o veículo, três animais apresentaram o bater de asas (30%), após injeção de OxA 0,6 nmol cinco animais (50%), após a injeção de OxA 2,0 nmol seis animais (60%) e após a injeção de OxB 2,0 nmol dois animais apresentaram (20%). Os animais injetados com OxA 0,2 e OxB 0,2 e 0,6 não apresentaram o comportamento. Outras alterações provocadas por injeções de OxA foram aumento no tempo e na intensidade de exploração dos animais principalmente nas duas maiores doses.

A análise estatística dos comportamentos foi realizada através de ANOVA de uma via, sendo considerado como variável independente a dose de orexina A ou B (0,2; 0,6 ou 2,0), e variável dependente a duração (tempo em segundos), a latência (em segundos) ou a frequência (número de episódios comportamentais) de cada comportamento. Este teste foi seguido de post hoc de Duncan para múltiplas comparações.

A injeção ICV de Orexina A causou alterações nos tempos que o animal emprega em comportamentos ligados ao alerta (Tabela 6). Na dose de 0,2 nmol, observamos alterações em comportamentos relacionados ao estado de alerta dos animais. Constatamos diminuição significativa da duração de SO [$F(3,28)=5,46$; $p=0,02$], aumento significativo da latência para SO [$F(3,28)= 7,03$; $p=0,01$], indicando o início mais tardio para o início deste comportamento. Observamos também diminuição significativa da frequência de IA [$F(3,28)=6,18$; $p=0,02$] e de SO [$F(3,28)=4,56$; $p=0,02$].

Durante os experimentos notamos que nas doses subseqüentes os efeitos de aumento do alerta foram intensificados. Na dose de 0,6 nmol observamos, além do aparecimento do comportamento de “bater de asas” (descrito anteriormente), o aumento do alerta caracterizou-se pelo aumento significativo da duração de EA [F(3,28)=8,43; p=0,002] e diminuição significativa de SO [F(3,28)=5,46; p=0,02]. Ainda nesta dose, a latência para SO [F(3,28)=7,03; p=0,01] e IA [F(3,28)=3,77; p=0,01] aumentaram, a frequência de IA [F(3,28)=6,18; p=0,01] diminuiu e a de EA [F(3,28)=3,46; p=0,03] aumentou (fig. 5, 6 e 8).

Na dose de 2,0 nmol de OxA um aumento muito mais vigoroso do alerta foi constatado. Novamente observamos alterações significantes, porém agora mais intensas do comportamento de exploração, sendo que a duração [F(3,28)=8,43; p=0,0001] (fig. 6) e frequência [F(3,28)=3,46; p=0,009] (fig. 8) de EA e de AL [F(3,28)=3,41; p=0,009] (Fig. 7) aumentaram significativamente. Qualitativamente, movimentos mais vigorosos e rápidos foram observados dose dependentemente após a injeção de OxA. Por exemplo, numa avaliação qualitativa baseada em nossas observações, durante a EA os movimentos de cabeça típicos desse comportamento foram acentuados em velocidade e amplitude. Além disso, estímulos sonoros que antes não despertavam a atenção dos animais, como o rápido arrulhar de outro pombo (de uma gaiola á qual não tinha acesso visual) ou um barulho fortuito vindo do ambiente extra-biotério, após as injeções (e de maneira dose dependente) faziam o animal explorar seu ambiente intensamente. Em contrapartida os comportamentos de imobilidade também diminuíram na dose de 2,0 nmol. A duração [F(3,28)=5,46; p=0,0007] (fig. 5), e frequência [F(3,28)=4,56; p=0,002] (fig. 8) de SO e a frequência de IA [F(3,28)=6,18; p=0,0004] (fig.7) diminuíram

significativamente. Ainda nesta dose as latências de SO [$F(3,28)=7,03$; $p=0,0002$] (fig. 5) e IA [$F(3,28)=3,77$; $p=0,009$] aumentaram significativamente.

Orexina B injetada ICV aumentou significativamente a latência de BA na dose de 0,6 nmol [$F(3,32)=4,35$; $p=0,01$] (tabela 5, fig. 9). A dose de 2,0 nmol diminuiu a frequência de SO [$F(3,32)=3,96$; $p=0,01$] (tabela 6, fig. 9), nesta dose os demais comportamentos não foram alterados significativamente, porém pode-se observar alterações não significantes na dose de 2,0 nmol que diminuiu a duração de SO [$F(3,32)=2,40$; $p=0,08$] (tabela 5). As demais doses não resultaram em alterações significantes no comportamento (tabela 7).

Em resumo, injeções ICV de OxA aumentaram significativamente o alerta e comportamentos ligados ao alerta e diminuíram os comportamentos ligados ao sono. Nenhum efeito ingestivo agudo foi observado nesses experimentos.

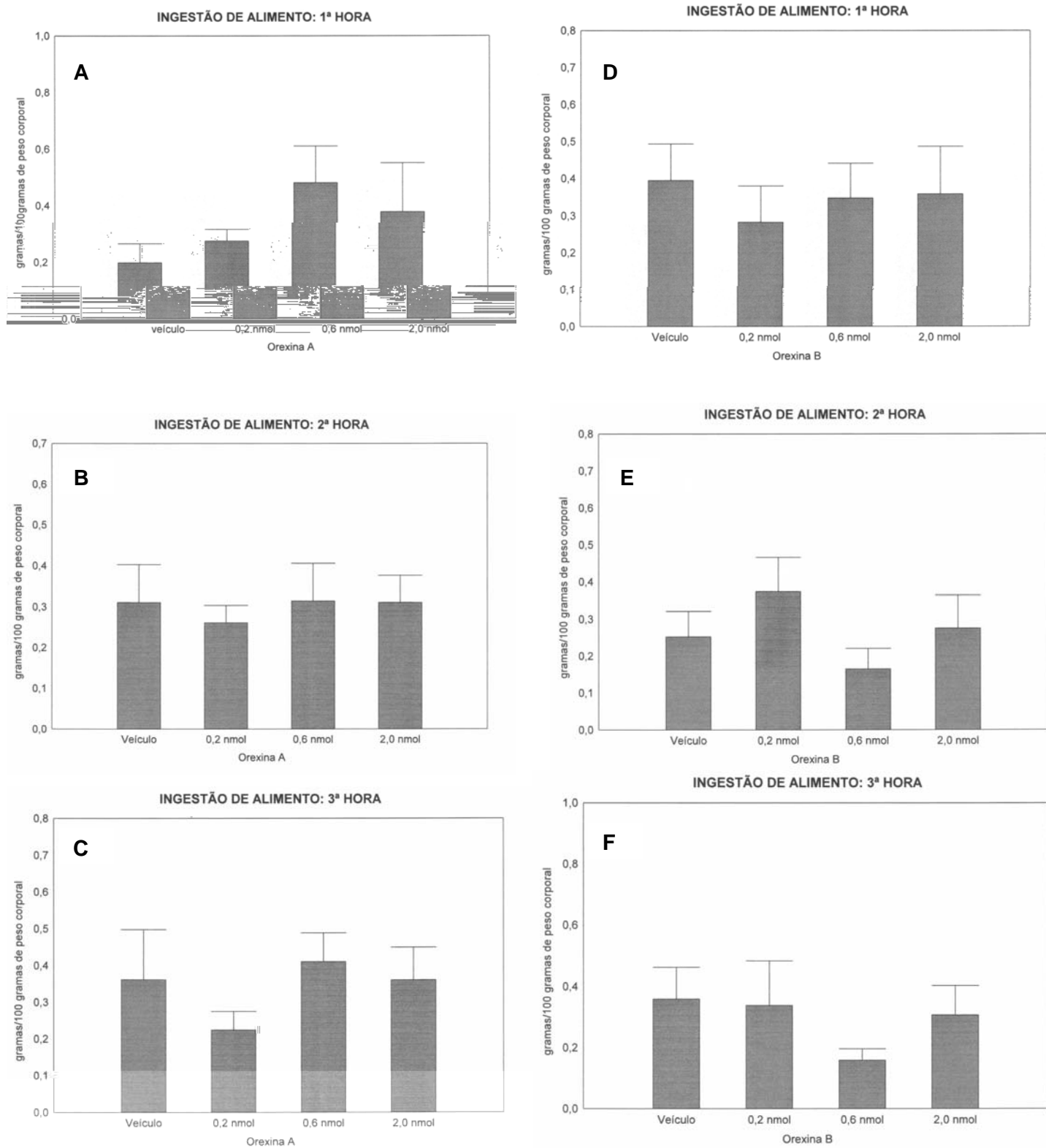


Fig. 3. Ingestão de alimentos 1, 2, 3, horas após injeção ICV de veículo (salina 0,9%) ou de A-C Orexina A (0,2; 0,6; 2,0 nmol; n= 8) e de D-F orexina B (0,2; 0,6; 2,0 nmol; n=8). A) Ingestão na primeira hora, B) Ingestão na segunda hora e C) Ingestão na terceira hora após injeção. D) Ingestão na primeira hora, E) Ingestão na segunda hora e F) Ingestão na terceira hora após injeção.

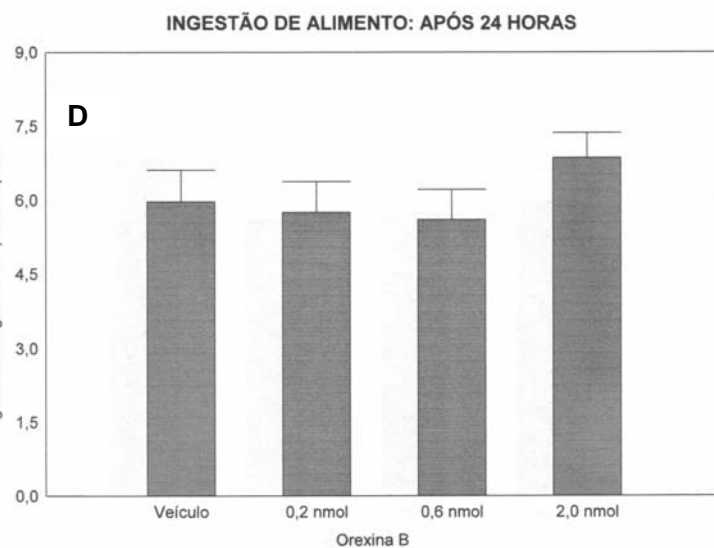
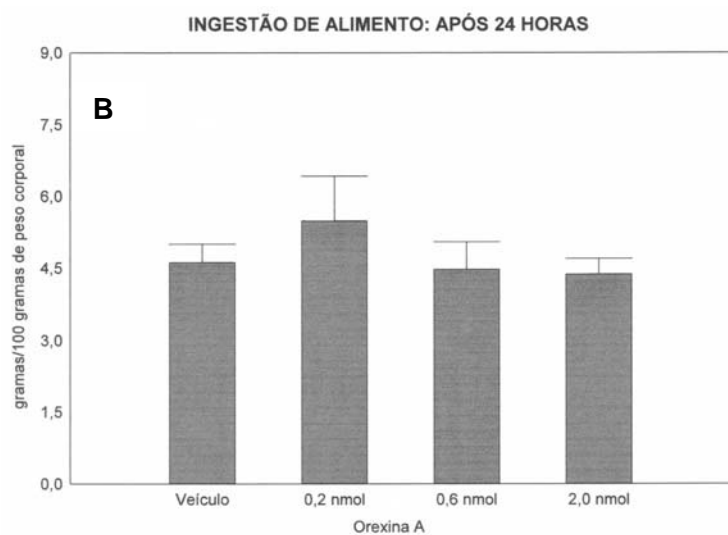
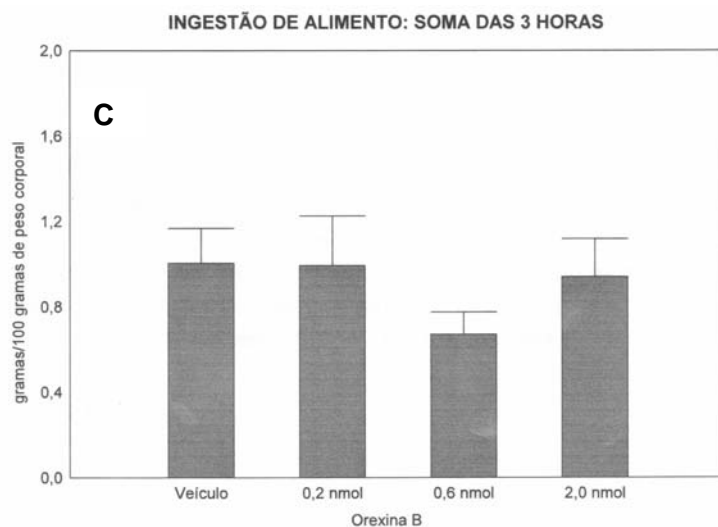
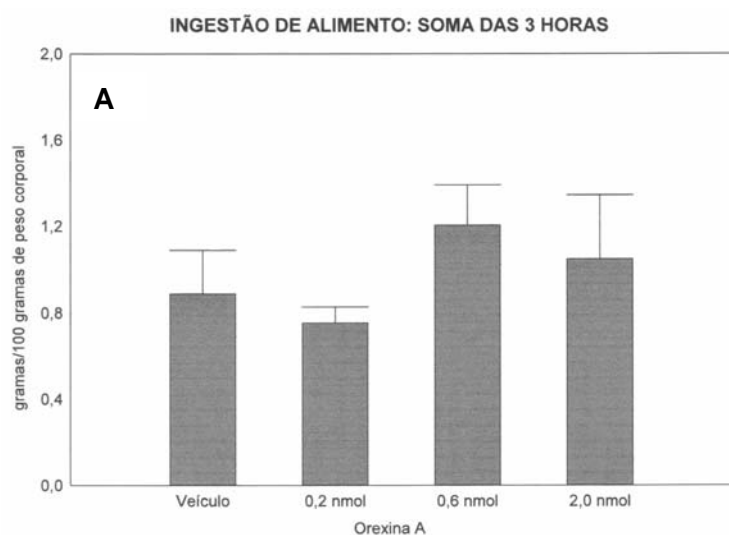


Fig. 4. Ingestão de alimentos 3h e 24 após injeção ICV de veículo (salina 0,9%) ou de A e B: orexina A (0,2; 0,6; 2,0 nmol; n=8) C e D: orexina B (0,2; 0,6; 2,0 nmol; n=8). A) Soma da ingestão nas três primeiras horas e B) Ingestão vinte e quatro horas após injeção. C) Soma da ingestão nas três primeiras horas e D) Ingestão vinte e quatro horas após injeção.

Tabela 1: Efeitos ingestivos de injeções IVC de orexina A em pombos. Quantidade de ração ou água em gramas/ 100 gramas de peso corporal. Valores expressos por média \pm epm.

OREXINA A

	Veículo (N=8)					Orexina 0,2 nmol (N=8)					Orexina 0,6 nmol (N=8)					Orexina 2,0 nmol (N=8)				
	1h	2h	3h	1+2+3	24	1h	2h	3h	1+2+3	24	1h	2h	3h	1+2+3	24	1h	2h	3h	1+2+3	24
Ração	0,1	0,3	0,3	0,3	4,6	0,2	0,2	0,2	0,7	5,5	0,5	0,3	0,4	1,2	4,4	0,3	0,3	0,3	1,0	4,3
	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,3$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,9$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,2$	$\pm 0,5$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$	$\pm 0,3$
Água	0,3	0,5	0,3	1,2	7,5	0,6	0,4	0,2	1,3	9,6	0,5	0,4	0,6	1,5	6,8	0,8	0,3	0,5	0,6	7,6
	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,7$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,8$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,3$	$\pm 0,8$	$\pm 0,2$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$	$\pm 0,6$

Tabela 2: Efeitos ingestivos de injeções ICV de orexina B em pombos, quantidade de ração ou água em gramas/ 100 gramas de peso corporal. Valores expressos por média \pm epm.

OREXINA B

	Veículo (N=6)					Orexina 0,2 nmol (N=6)					Orexina 0,6 nmol (N=6)					Orexina 2,0 nmol (N=6)				
	1h	2h	3h	1+2+3	24	1h	2h	3h	1+2+3	24	1h	2h	3h	1+2+3	24	1h	2h	3h	1+2+3	24
Ração	0,4	0,2	0,3	1,0	5,9	0,3	0,3	0,3	1,0	5,7	0,3	0,1	0,1	0,6	5,6	0,3	0,2	0,3	0,9	6,8
	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,6$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,6$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,6$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,5$
Água	0,7	0,4	0,7	1,8	9,6	0,5	0,5	0,6	1,8	12,7	0,5	0,3	0,3	1,2	11,3	0,8	0,6	0,4	1,7	17,1
	$\pm 0,2$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,4$	$\pm 1,2$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,3$	$\pm 2,4$	$\pm 0,3$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,4$	$\pm 1,6$	$\pm 0,2$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,4$	$\pm 5,3$

Tabela 3: Efeitos nos comportamentos ingestivos da injeção de Orexina A em pombos ao longo de 1 hora após injeção ICV. Duração e latência em segundos (s), frequência em número de episódios (n) dos comportamentos ingestivos, Comer (CO) e Beber Água (BA), expressos em média±epm, após injeção ICV de OxA.

OREXINA A					
	Veículo (n=8)	Orexina 0,2 nmol (n=8)	Orexina 0,6 nmol (n=8)	Orexina 2,0 nmol (n=8)	
Comer	Dur (s)	39±17,6	92,3±39,2	119±35,1	77,8±28,0
	Lat (s)	903±446,5	1109,7±391,7	773,7±368,9	1368,6±514,7
	Fre (n)	2,3±0,4	5,8±2,5	9,7±3,4	7,0±2,7
Beber	Dur (s)	4,6±1,1	28,3±11,3	13,5±5,1	27,0±7,7
	Lat (s)	1428,7±557	753,8±272,5	1118,0±412,0	1124,7±521,2
	Fre (n)	1,1±0,3	3,0±0,9	3,2±1,5	3,7±1,2

Tabela 4: Efeitos nos comportamentos ingestivos da injeção de Orexina B em pombos ao longo de 1 hora após injeção ICV. Duração e latência em segundos (s), frequência em número de episódios (n) dos comportamentos ingestivos, Comer (CO) e Beber Água (BA), expressos em média±epm, após injeção ICV de OxB. (*) p< 0,05

OREXINA B					
	Veículo (n=6)	Orexina 0,2 nmol (n=6)	Orexina 0,6 nmol (n=6)	Orexina 2,0 nmol (n=6)	
Comer	Dur (s)	43,3±12,9	28,2±8,3	47,4±17,8	42,0±6,2
	Lat (s)	525,8±315,9	1714,1±462,0	1368,8±497,7	647,3±184,9
	Fre (n)	3,8±0,7	3,6±1,0	3,0±1,0	3,8±0,6
Beber	Dur (s)	24,6±12,0	21,2±7,5	8,2±4,4	38,3±11,9
	Lat (s)	1413,5±505,8	1392,6±402,8	2711,5±448,3 *	325,6±88,2
	Fre (n)	2,7±0,8	2,4±0,8	1,6±1,0	4,8±1,7

Tabela 5: Efeitos comportamentais de injeções ICV de OxA em pombos ao longo de 1 hora após injeção ICV. Duração, latência e frequência dos comportamentos (s = segundos, n = número de episódios); valores expressos por média \pm epm. (*) $p < 0,05$

OREXINA A					
Comportamento		Veículo (n=8)	Orexina 0,2 nmol (n=8)	Orexina 0,6 nmol (n=8)	Orexina 2,0 nmol (n=8)
Imobilidade	Dur (s)	956,8 \pm 216,3	593,1 \pm 143,1	404,7 \pm 240,7	216,8 \pm 140,1
	Alerta				
	Lat (s)	375,7 \pm 225,5	1238,2 \pm 364,8	2061,1 \pm 585,5 *	2239,3 \pm 497,5 *
	Fre (n)	18,6 \pm 1,8	10,1 \pm 1,6 *	8,8 \pm 4,4 *	2,8 \pm 1,2 *
Sonolência	Dur (s)	871,6 \pm 186,8	369,5 \pm 164,9 *	329,0 \pm 180,0 *	0,7 \pm 0,7 *
	Lat (s)	891 \pm 459,3	2443,0 \pm 468,0 *	2530,1 \pm 459,6 *	3483,3 \pm 116,6 *
	Fre (n)	10,7 \pm 2,7	3,3 \pm 1,3 *	5,2 \pm 2,8	0,1 \pm 0,1 *
Exploração Ambiente	Dur (s)	965,3 \pm 138,2	1545,1 \pm 269,8	2107,6 \pm 297,2 *	2482,1 \pm 167,95 *
	Lat (s)	3,6 \pm 2,8	24,7 \pm 24,7	0,0 \pm 0,0	0,5 \pm 0,5
	Fre (n)	32,7 \pm 3,9	46,8 \pm 8,6	61,2 \pm 9,9 *	70,5 \pm 11,3 *
Locomoção	Dur (s)	26,1 \pm 7,8	74,7 \pm 25,0	75,6 \pm 32,6	150,1 \pm 67,9
	Lat (s)	523,2 \pm 283,0	409,3 \pm 177,6	213,3 \pm 64,4	128,7 \pm 40,2
	Fre (n)	9 \pm 2,4	18,8 \pm 5,2	21,3 \pm 7,9	29,1 \pm 7,6
Auto	Dur (s)	668,6 \pm 164,3	896,7 \pm 112,4	550,5 \pm 188,2	645,2 \pm 113,4
Limpeza	Lat (s)	147,5 \pm 29,0	285,6 \pm 85,6	517,6 \pm 229,2	148,3 \pm 68,1
	Fre (n)	16,6 \pm 1,3	21,0 \pm 3,8	19,8 \pm 4,0	32,85,1 *

Tabela 6: efeitos comportamentais de injeções ICV de Orexina B em pombos ao longo de 1 hora após injeção ICV. Duração, latência e frequência dos comportamentos. (s = segundos, n = número de episódios). Valores expressos por média \pm epm. (*) $p < 0,05$

OREXINA B					
Comportamento		Veículo (n=6)	Orexina 0,2 nmol (n=6)	Orexina 0,6 nmol (n=6)	Orexina 2,0 nmol (n=6)
Imobilidade	Dur (s)	1272,5 \pm 175,4	1102,5 \pm 207,5	1310,6 \pm 252,2	998,1 \pm 265,8
Alerta	Lat (s)	261,2 \pm 85,2	359,1 \pm 128,7	770,5 \pm 307,4	503,0 \pm 166,5
	Fre (n)	16,5 \pm 1,9	14,7 \pm 2,4	11,2 \pm 1,7	8,5 \pm 1,8
Sonolência	Dur (s)	602,2 \pm 180,5	611,9 \pm 183,4	330,3 \pm 115,3	44,0 \pm 16,2
	Lat (s)	1208,9 \pm 298,2	1234,2 \pm 301,8	1444,7 \pm 375,0	2011,1 \pm 564,6
	Fre (n)	7,7 \pm 1,8	7,4 \pm 1,5	3,4 \pm 1,0	1,3 \pm 0,4 *
Exploração	Dur (s)	1221,0 \pm 184,5	1168,4 \pm 258,8	1127,6 \pm 222,4	1922,1 \pm 274,8
Ambiente	Lat (s)	261,2 \pm 85,2	11,1 \pm 7,6	8,4 \pm 8,4	21,5 \pm 17,6
	Fre (n)	30,9 \pm 4,2	34,5 \pm 6,4	31,5 \pm 6,8	45,6 \pm 5,9
Locomoção	Dur (s)	74,6 \pm 5,9	97,6 \pm 46,3	75,3 \pm 27,9	113,6 \pm 40,9
	Lat (s)	260,5 \pm 43,3	366,6 \pm 151,7	377,4 \pm 165,1	703,0 \pm 579,9
	Fre (n)	14,7 \pm 3,7	16,6 \pm 5,6	13,5 \pm 5,7	26,0 \pm 6,7
Auto	Dur (s)	361,8 \pm 84,5	570,2 \pm 111,9	664,7 \pm 103,6	441,3 \pm 81,2
Limpeza	Lat (s)	238,2 \pm 69,2	339,8 \pm 150,6	311,3 \pm 76,9	151,5 \pm 23,4
	Fre (n)	11,8 \pm 2,2	13,7 \pm 2,5	14,0 \pm 2,8	15,0 \pm 1,8

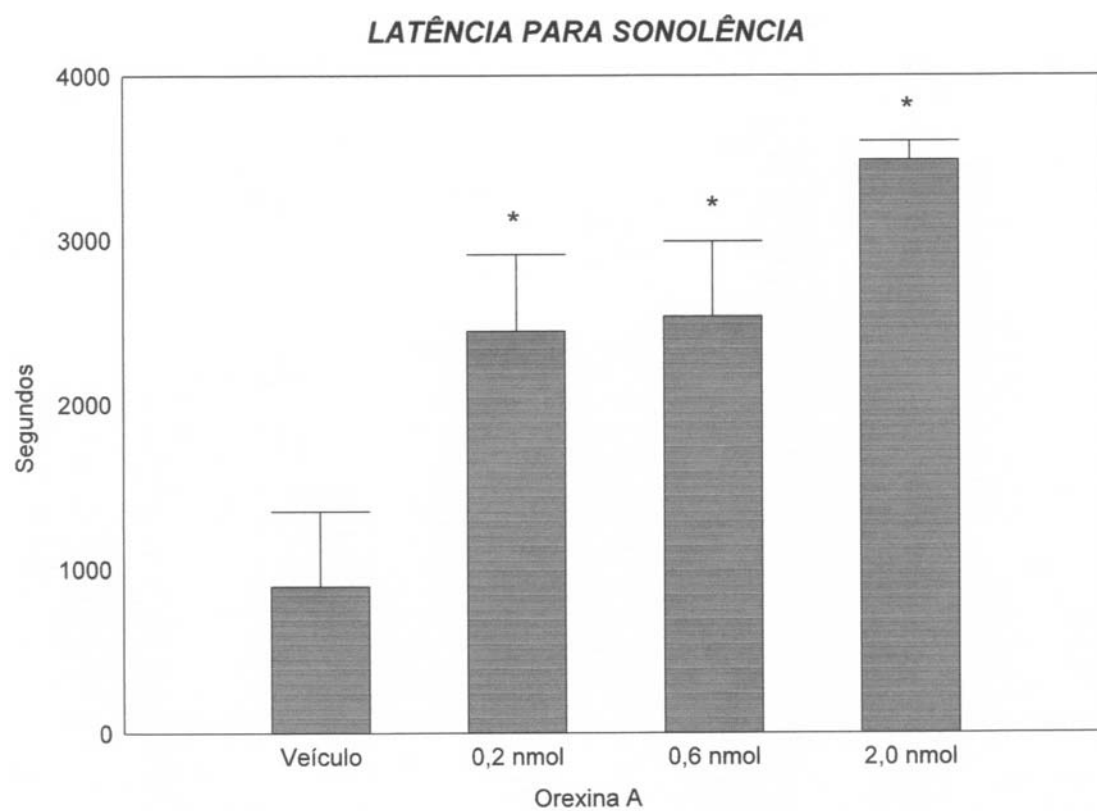
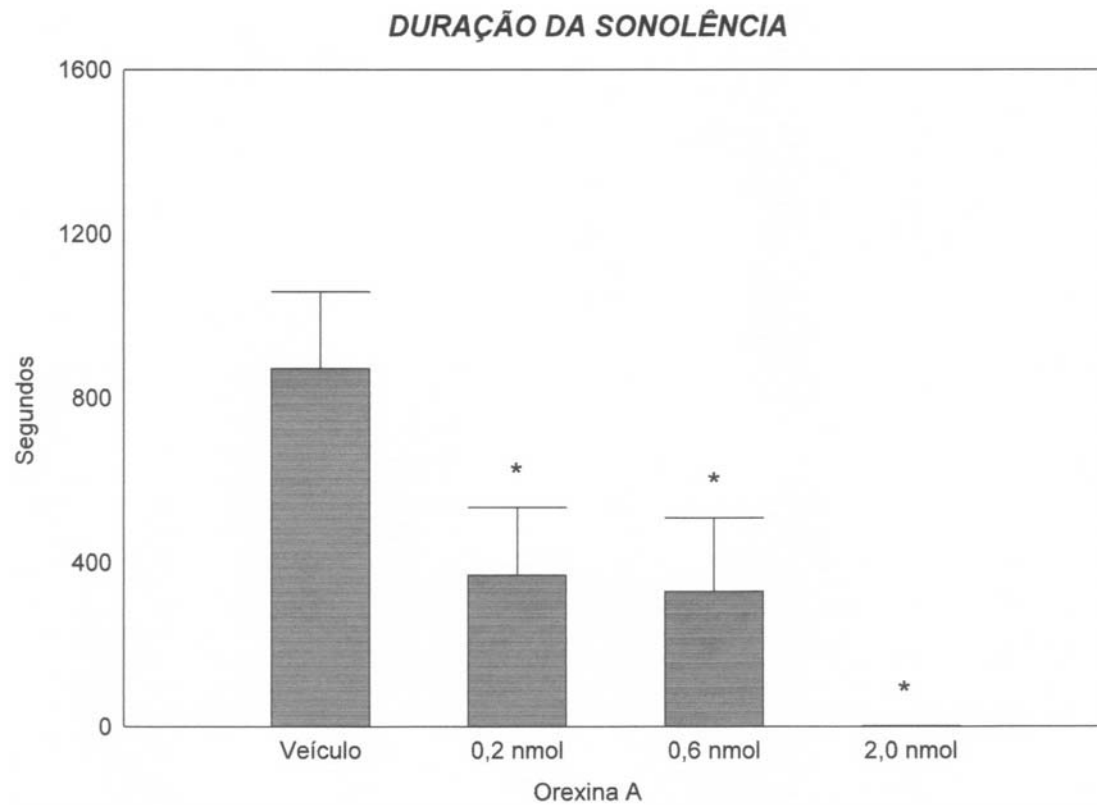


Figura 5. Duração de Sonolência (SO) e Latência para Sonolência (SO) após injeção ICV de veículo (salina 0,9%) ou de orexina A (0,2; 0,6; 2,0 nmol). (*) $p < 0,05$.

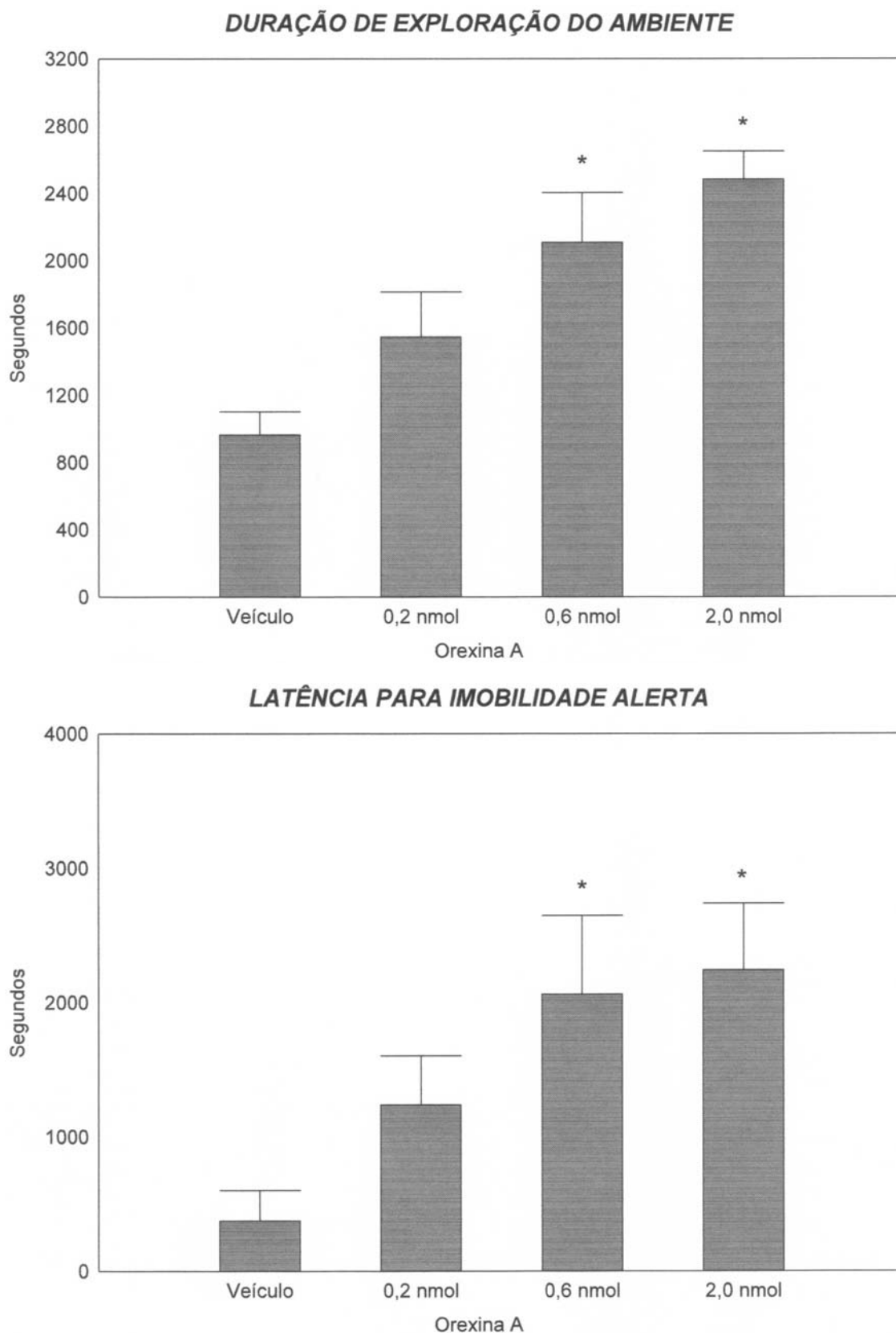


Figura 6. Duração de exploração do ambiente (EA) e Latência para Imobilidade Alerta (IA) após injeção ICV de veículo (salina 0,9%) ou de orexina A (0,2; 0,6; 2,0 nmol). (*) $p < 0,05$.

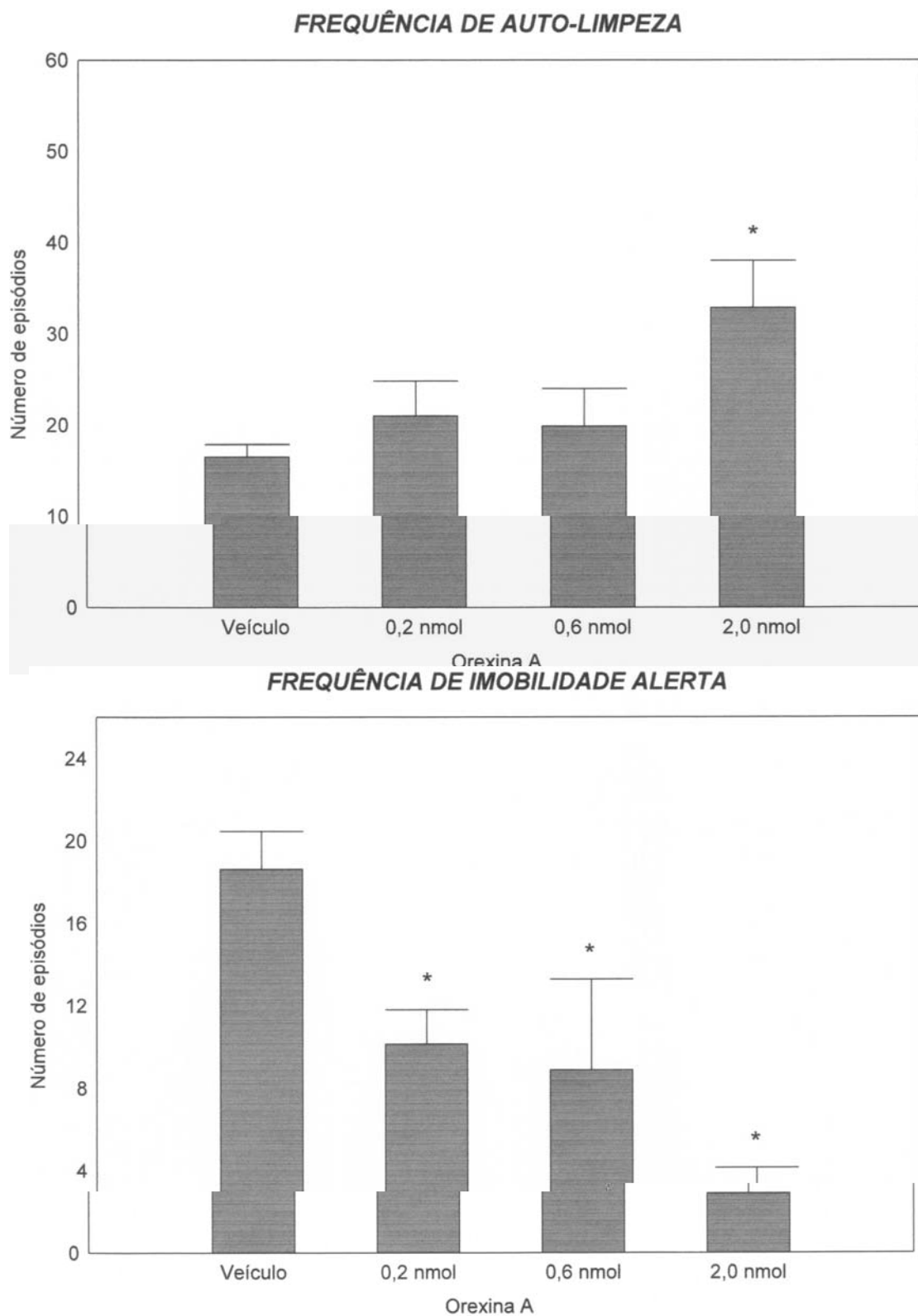


Figura 7. Frequência de Imobilidade alerta (IA) e Auto-Limpeza (AL) após injeção ICV de veículo (salina 0,9%) ou de orexina A (0,2; 0,6; 2,0 nmol). (*) $p < 0,05$.

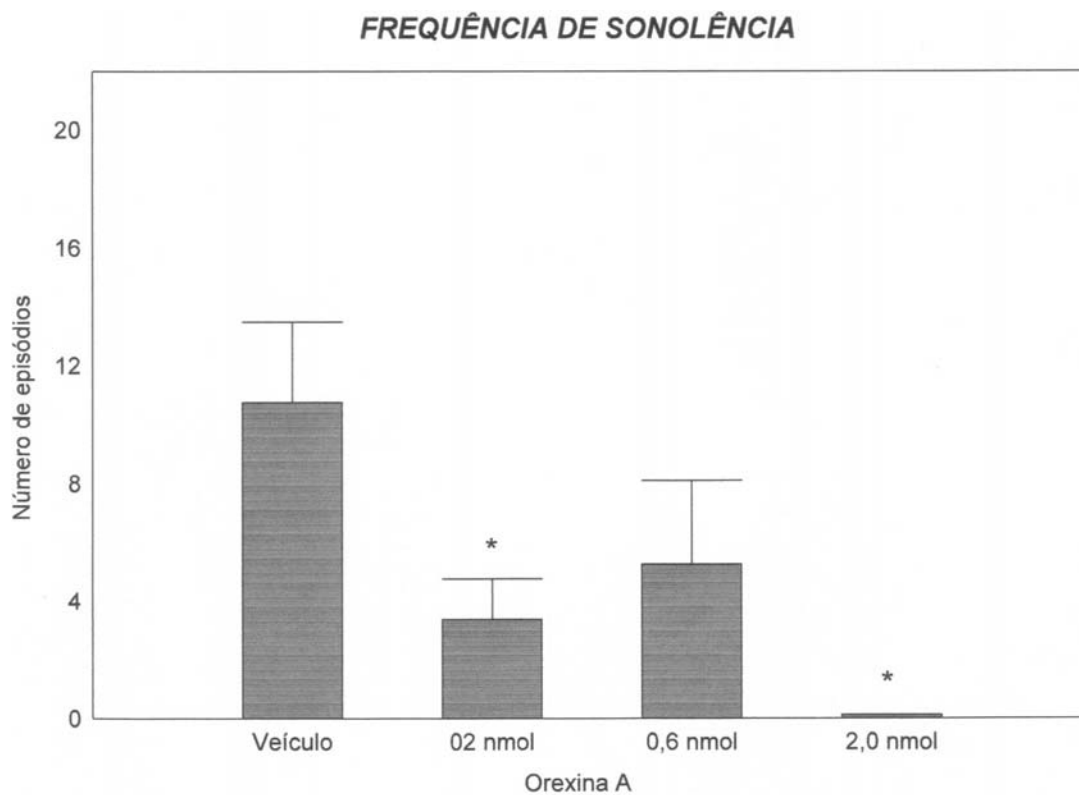
FREQUÊNCIA DE EXPLORAÇÃO DO AMBIENTE

Figura 8. Frequência de Exploração do Ambiente (EA) e sonolência (SO) após injeção ICV de veículo (salina 0,9%) ou de orexina A (0,2; 0,6; 2,0 nmol). (*) $p < 0,05$.

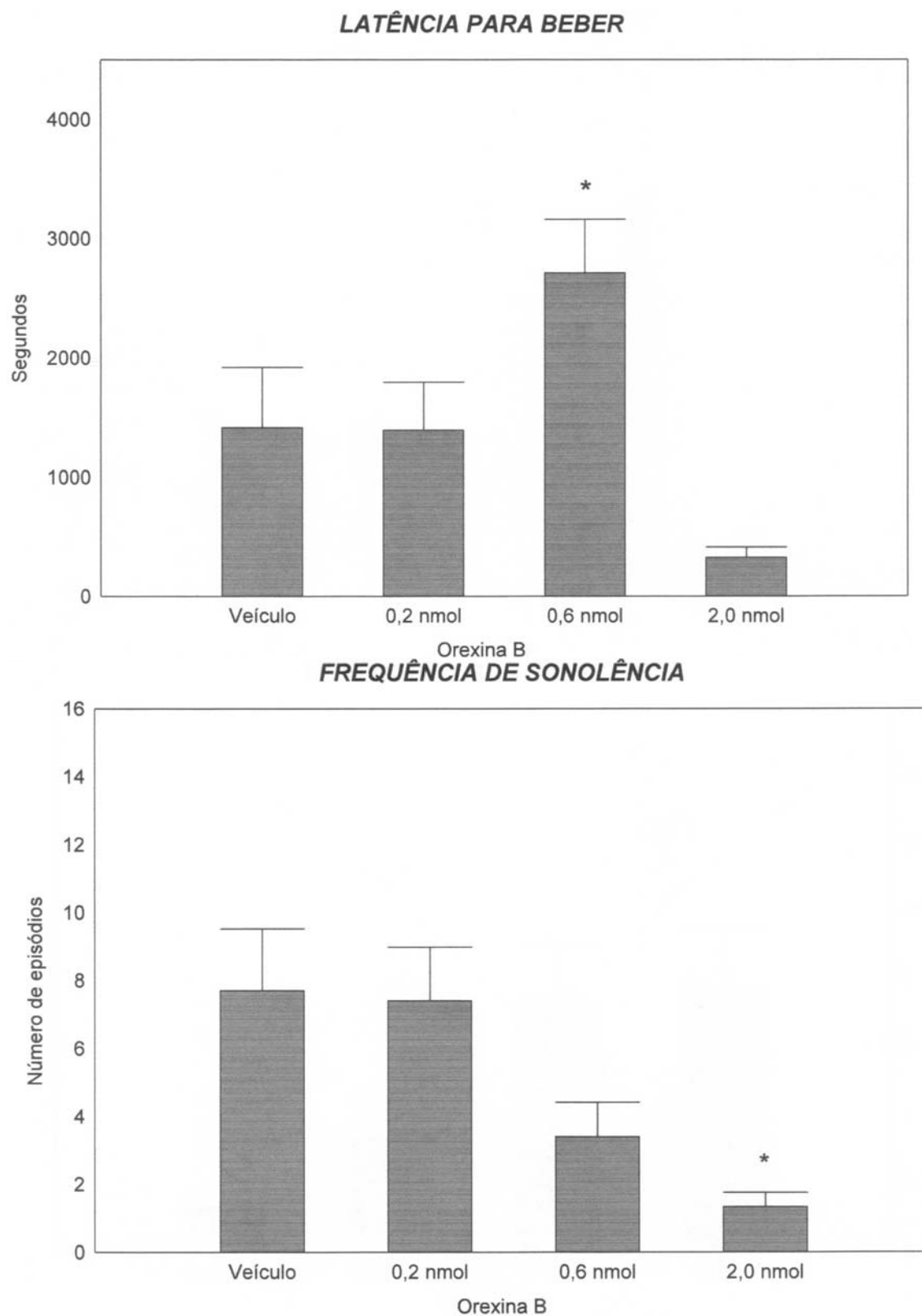


Figura 9. Latência para beber e Frequência de sonolência após injeção ICV de veículo (salina 0,9%) ou de orexina B (0,2; 0,6; 2,0 nmol). (*) $p < 0,05$.

4.2 Experimento 2: efeitos ingestivos ao longo de 24 horas de injeções ICV de orexinas:

A análise da ingestão e dos comportamentos ingestivos foi realizada por meio de ANOVA de duas vias, sendo fatores: o tratamento, as horas (variáveis independentes), e quantidade ingerida ou duração das ingestões (variáveis dependentes).

A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa na ingestão dos períodos pré-injeção entre os animais testados. Tampouco entre o período pré-injeção e após o veículo. Os animais testados apresentaram padrão predominantemente diurno de ingestão de alimento e água. Os animais apresentaram intensa ingestão de ração e água no início da manhã assim que as luzes acendem (entre 7:00 e 10:00 horas) e final da tarde (entre 15:00 e 17:00 horas). No período compreendido entre 10:00 e 15:00 horas os animais mantiveram consumo de alimentos constante, porém, em menor quantidade que os períodos anteriormente listados (Figura 10).

Observou-se aumento significativo da ingestão de alimento às 12:00 horas, 4 horas depois da injeção, quando tratados com OxA [$F(23,240)=1,81$; $p= 0,01$]. Em seguida houve diminuição significativa da ingestão de alimento às 15:00 horas, 6 horas depois da ingestão [$F(23,240)=1,81$; $p=0,0001$]. As demais horas não apresentaram alterações significantes. Tanto ingestão hídrica quanto as durações dos comportamentos ingestivos não apresentaram alterações significantes.

Quando comparadas às injeções de veículo, as injeções de OxB não provocaram alterações significantes, nem em relação à ingestão de água e ração, nem em relação às durações dos comportamentos ingestivos (Figura 10).

Para melhor avaliar a ação das orexinas sobre a ingestão de alimentos, realizamos a análise de ingestão acumulada. Nessas análises o valor da ingestão da primeira hora é somado ao valor da ingestão na segunda hora e assim consecutivamente até 24 horas. A soma dos valores ingestivos acumulados durante as 24 horas facilita a observação de diferenças de ingestão. Porém nenhuma diferença foi observada na ingestão acumulada dos animais testados após a injeção de veículo, OxA ou OxB.

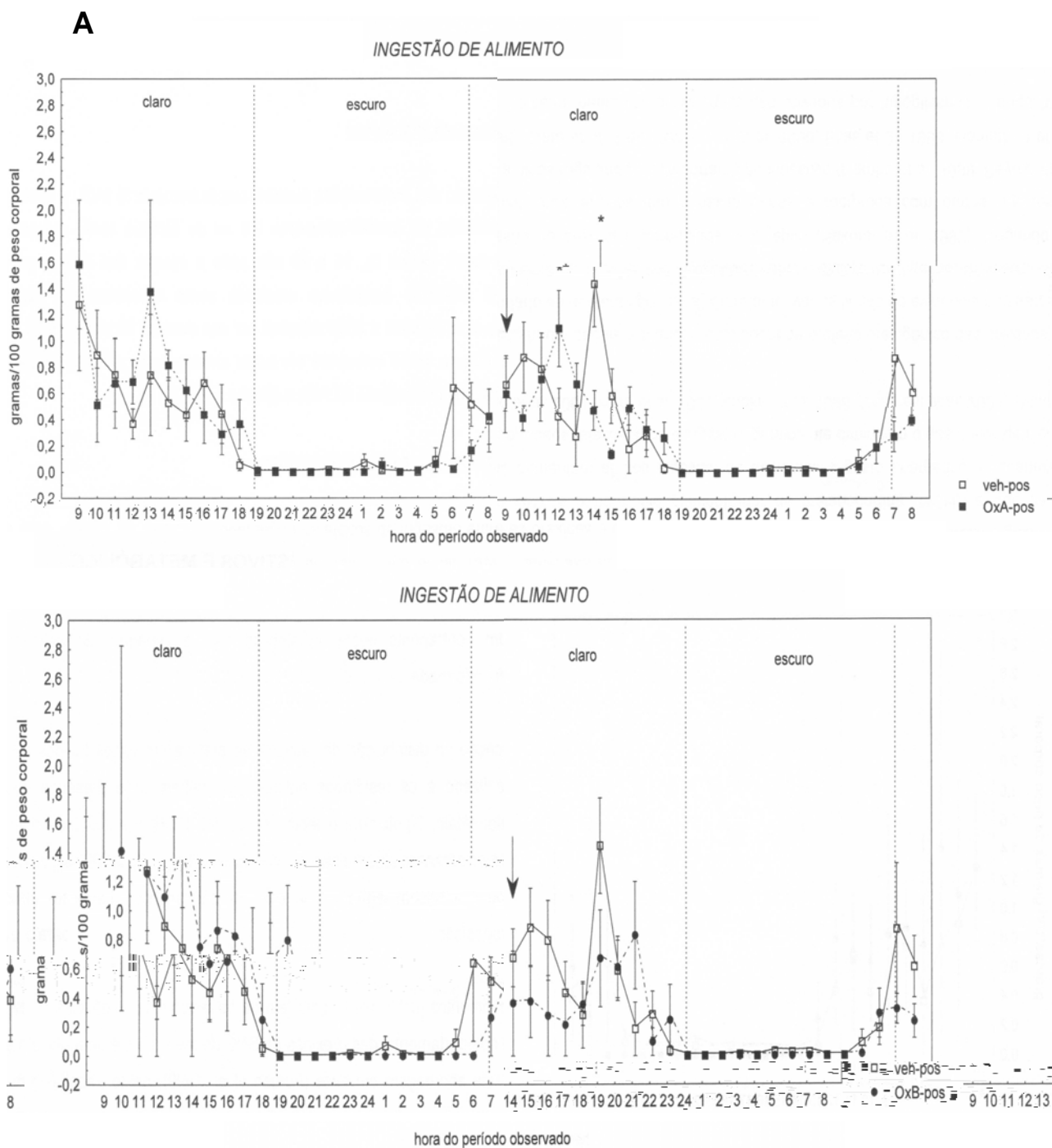


Figura 10. Ingestão de ração ao longo de 24 horas. A. Após injeção ICV de veículo (salina 0,9%) ou de orexina A (0,6 nmol). B. Após injeção ICV de veículo (salina 0,9%) ou de orexina B (0,6 nmol) (*) $p < 0,05$. A seta indica o momento da injeção.

4.3. Experimento 3: Efeitos metabólicos de injeções ICV de orexinas:

Nossa análise estatística não detectou nenhum efeito significativo. Apesar de não haver alterações significantes, pequena modificação das injeções de OxA sobre as concentrações de glicose e AGL pode ser observado (FIGURA 11). A OxA diminuiu a glicose plasmática após 30 minutos da injeção. As concentrações de AGL também foram modificadas, sendo que a dose de 0,2 aumentou a concentração em 15 minutos e a dose de 0,6 diminuiu a concentração 15 e 30 minutos após a injeção.

OREXINA A			
	Veículo (n=7)	OxA (0,2 nmol) (n=6)	OxA (0,6 nmol) (n=5)
Glicose mg/100ml	296±6	293±5	301±21
AGL µmol/ml	1,25±0,10	0,93±0,06	1,88±0,38

Tabela 7. Valores de linha de base para as concentrações de glicose (mg/dl) e ácidos graxos livres (AGL) (µmol/ml) no plasma de pombos.

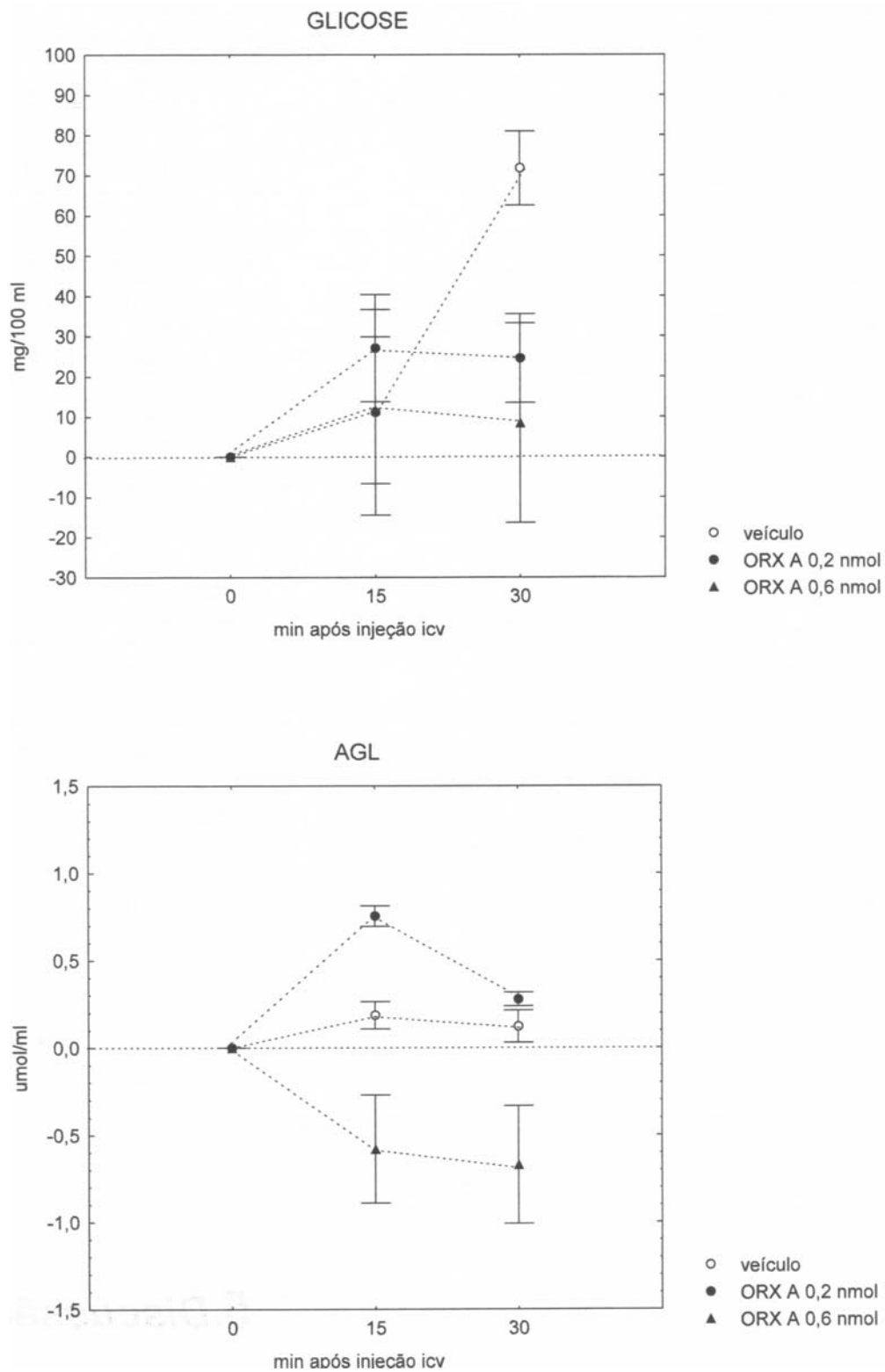


Figura 11. Concentração plasmática de glicose e AGL após injeção ICV de veículo (salina 0,9%) ou de orexina A (0,2; 0,6 nmol). Dados referentes à diferença entre o basal e após o tratamento.

5. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro trabalho realizado para investigar os efeitos das orexinas no sistema nervoso central de aves adultas e o primeiro a estudar os efeitos comportamentais das orexinas em aves. Neste trabalho estudamos os efeitos de injeções ICV de orexina no comportamento espontâneo ingestivo e não ingestivo e sobre o metabolismo da glicose e ácidos graxos.

Nossos resultados indicam que o efeito comportamental mais notável de injeções ICV de OXA em pombos foi o aumento intenso no tempo dedicado em atividades locomotoras e exploratórias, evidente entre 10 e 20 minutos após as injeções deste peptídeo. Os dados que corroboram os efeitos da OxA em aumentar o alerta foram o aumento na duração e frequência do comportamento de exploração do ambiente e o aumento da frequência de auto-limpeza. É importante ressaltar o aumento na frequência do comportamento esporádico de bater asas, o que em conjunto com os dados anteriores evidencia o aumento do alerta. Colaborando com essas observações, de forma antagônica ao aumento do alerta, observamos que o comportamento de sonolência iniciava-se mais tarde e a duração e frequência deste comportamento diminuíram.

Nossos dados sugerem também que injeções ICV de OXA, em doses que provocam respostas hiperfágicas em roedores e peixes (Sakurai *et al*, 1998; Volkoff *et al*, 1999), não modificam significativamente a ingestão de alimentos ou de água nos pombos. Não ocorreram mudanças nos tempos dedicados à ingestão de água ou ração. Também não houve diferença significativa nas latências e frequências dos comportamentos ingestivos, indicando não haver participação das orexinas na modulação desses comportamentos. Pudemos notar uma tendência (não significativa pelo exame estatístico

que empregamos) de aumento nas quantidades de alimento ingerido nas primeiras 3 horas após injeções das doses de 0,6 e 2,0 nmol de OXA. É possível que este modesto incremento ingestivo deva-se mais ao notável aumento na atividade exploratória observada nos registros comportamentais, levando o animal a elevar a ingestão como consequência de uma maior exploração de todo o ambiente, inclusive o pote de ração. A hipótese do aumento da ingestão de alimento como resultado do aumento da exploração é corroborado pelo aumento não significativo (pelos testes estatísticos empregados) da ingestão de água.

Os resultados dos experimentos de ingestão a longo prazo indicam que a OxA aumentou a ingestão de alimentos após 4 horas da injeção. O aumento da ingestão poderia ser indício de uma atuação tardia na ingestão de alimento pelo peptídeo. No entanto, uma observação mais minuciosa dos dados brutos dos animais não mostra aumentos consistentes na ingestão de ração por todos os animais da amostra. A análise dos dados brutos mostrou o aumento de ingestão por um dos animais da amostra o que resultou na diferença estatística. Outra hipótese é a de que o aumento na atividade exploratória observada nos registros comportamentais tenha perdurado, e levado o animal a aumentar a ingestão como consequência. Isto é, aumenta a probabilidade de o pombo injetado com OxA, mais ativo, explorar todo o ambiente, inclusive o pote de ração. As durações dos comportamentos de ingestão também foram avaliados e não observamos modificações significantes. A análise de ingestão acumulada revelou haver diminuição na ingestão de alimentos após 6 horas da injeção de OxB. Não foram

observadas outras alterações na ingestão de água ou ração. Nenhuma alteração foi detectada na duração dos comportamentos ingestivos.

Em parte nossos dados confirmam os resultados de Furuse *et al.* (1999), no qual pintos de 2 dias receberam injeção ICV de OxA ou OxB nas doses de 0,3 e 3,0 nmol. Furuse *et al.* (1999) não observaram alterações na ingestão de alimentos após injeções de OxA nas 2 horas avaliadas. Da mesma forma, nossos resultados também não apontam na direção da participação do controle a curto prazo da ingestão de alimentos pela OxA.

As dosagens de substrato energético não foram significativamente modificadas pela injeção de OxA. Por outro lado, modificações não significantes ocorreram, o que indica fraco efeito sobre a mobilização de substrato energético por este peptídeo. Porém não podemos descartar que em doses maiores e com uma amostra maior, possíveis efeitos possam ser detectados.

Em resumo, nossos dados sugerem que em aves, os efeitos da OxA sejam de aumentar a atividade exploratória e a vigília.

Os resultados obtidos após injeções ICV de OxB mostram que não houve alterações agudas na ingestão de alimentos e nos comportamentos ingestivos. Injeções de OxB (0,3 e 3,0 nmol) realizadas por Furuse *et al.* (1999) diminuiram a ingestão de alimentos após 2 horas. Furuse *et al.* (1999) descartaram a atuação da OxB como peptídeo hipofágico após experimento de privação de alimento. Nesses experimentos a OxB não reverteu a hiperfagia causada pelo jejum. Em nossos experimentos não observamos alterações agudas na ingestão de alimentos após injeções de OxB. O que é

curioso, porque tanto a OxA quanto a OxB mantêm relevante conservação filogenética de suas sequências de DNA em diferentes classes de vertebrados incluindo galinha (Sakurai *et al* 1998; Shibahara *et al*, 1999; Ohkubo *et al*, 2002). Além disso, o cDNA clonado para o receptor de orexina em galinhas apresenta 80% de similaridade com o OX2R de mamíferos (Ohkubo *et al*, 2003). As orexinas A e B se unem com afinidade similar ao OX2R, enquanto a OxA tem afinidade 10 vezes maior pelo OX1R (Sakurai *et al*, 1998) o que nos permitiria esperar atividade qualitativamente similar dos dois peptídeos. Embora não possamos explicar a ausência de efeitos da OxB no pombo, nossos dados indicam que a OxA interage com o receptor de orexinas de aves provocando intenso aumento do alerta.

Foram em ratos, as primeiras observações que constataram que injeções ICV de OxA aumentam a ingestão de alimentos (Sakurai *et al*, 1998; de Lecea *et al*, 1999). Sakurai *et al*. (1998), foi o primeiro a demonstrar os efeitos orexigênicos das orexinas, medindo o consumo acumulado observou aumento da ingestão na primeira, segunda e quarta hora de experimento tanto para injeções de OxA quanto para OxB. No entanto, não observamos alterações desse tipo em nossos experimentos. Experimentos realizados em peixes também demonstram o aumento no consumo de alimentos e nos comportamentos ingestivos após injeção ICV de OxA (Volkoff *et al*, 1999).

Não há registros de experimentos de ingestão de alimentos em anfíbios e répteis. Entretanto existem dados na literatura mostrando existir neurônios orexinérgicos e sua localização no hipotálamo de répteis e anfíbios (Singletary *et al*, 2005; Shibahara *et al*, 1999).

Nos experimentos comportamentais, injeções de OxA principalmente nas doses de 0,6 e 2,0 nmol provocaram modificações no comportamento. Os comportamentos ligados ao alerta e exploração (EA, IA) tiveram sua duração aumentada.

Em roedores, algumas observações indicam a importante participação das orexinas no controle do alerta. Quando injetado ICV em ratos durante o período claro, a OxA aumenta a vigília e diminui a duração do sono paradoxal e não-paradoxal (Hagan *et al.* 1999). Além disso os neurônios orexinérgicos do LH têm expressão de c-Fos diminuída durante o sono induzido por injeção de agonista adenosinérgico (A_2) (Sato *et al.* 2006). Outro estudo mostra que a expressão de C-Fos em neurônios orexinérgicos é aumentada durante a fase escura (período ativo) (Estabrooke *et al.* 2001). Experimentos similares foram também realizados em roedores diurnos, que tiveram c-Fos aumentado no período ativo (Kodama *et al.* 2005). Dosagens dos níveis de orexina no líquido cefalorraquidiano durante o período claro e o período escuro evidenciam aumento dos níveis no período escuro, e diminuição no período claro (período inativo do animal) (Yoshida *et al.* 2001).

Existe semelhança entre a atividade dos neurônios orexinérgicos e a de outros grupos de neurônios: os noradrenérgicos do LoC, os serotoninérgicos da Rafe Dorsal, e os histaminérgicos do TMN. Esses neurônios estão ativos durante a vigília, menos ativos durante o sono de ondas lentas, e inativos durante o sono paradoxal. Nambu *et al.* (1999), Peyron *et al.* (1998) e Date *et al.* 1999, demonstraram que existem projeções em ratos dos neurônios orexinérgicos para esses sítios do tronco encefálico. Marcus e colaboradores (2001) verificaram a presença de receptores OXR1 e OXR2 nos mesmos

núcleos. As projeções das fibras orexinérgicas e a co-localização dos receptores nesses núcleos sugerem a participação orexinérgica na ativação do sistema reticular de ativação ascendente. Em aves a distribuição de fibras orexinérgicas é semelhante à distribuição em mamíferos, sendo que no tronco encefálico do *Carpodacus Mexicanus* observou-se inervação do LoC (Singletary *et al.* 2006). Este padrão de inervação orexinérgica de núcleos monoaminérgicos do tronco cerebral pode representar um substrato neuroanatômico importante pelo quais circuitos orexinérgicos participam do controle da atividade cerebral e dos estados de alerta.

A locomoção também é um comportamento alterado por injeções de OxA em mamíferos. Injeções de OxA no LH e no Núcleo Acumbens de ratos aumentou a ingestão de alimentos e a locomoção (Kotz *et al.* 2002; Thorpe e Kotz, 2005). A atividade forçada aumenta a concentração de OxA no líquido cefalorraquidiano de ratos (Martins *et al.* 2004). Outro dado mostra que injeção de OxA, mas não de OxB aumenta a duração dos comportamentos ingestivos e da duração da locomoção em peixes (Nakamachi *et al.* 2006). Apesar de não observarmos aumentos significantes no comportamento de LO, é importante ressaltar que o pombo é um animal que explora seu ambiente mais visualmente, portanto o explora com movimentos de cabeça típicos do que chamamos de EA. Os ratos são animais mais olfativos e para explorar seu ambiente necessitam locomover-se por ele como observado por Kotz *et al.* (2002). De modo semelhante os peixes se utilizam desse artifício Nakamachi *et al.* (2006).

Outra observação digna de nota é o aumento na freqüência do comportamento do “Bater de Asas”. Esse comportamento é caracterizado por postura ereta, alongamento

cervical e bater intenso das asas. Na literatura esse comportamento foi relacionado ao estresse (Debut *et al*, 2005) e como índice de locomoção em galinhas (Abbasnejad *et al*, 2005). Foi observado o aparecimento deste comportamento após injeções ICV de ACTH(1-24) em pombos (Devich & Delius, 1981) e galinhas (Panksepp & Normansell, 1990) sugerindo um estado de alerta semelhante ao de medo/ansiedade. Portanto é possível que os circuitos orexinérgicos em aves estejam ligados também à comportamentos de estresse/medo, além da sua ligação com a vigília.

O receptor de orexina nas aves é mais semelhante ao receptor OXR2 do mamífero, também expresso ubiquamente no SNC desses animais (Ohkubo e cols. 2003). Os OXR2 em mamíferos têm sido relacionado com a narcolepsia (Lin e cols. 1999; Chemeli e cols. 1999; Hara e cols. 2001; Willie e cols 2003). Estes trabalhos descrevem a mutação ou Knock-out do gene que transcreve o OXR2 como causa da doença. Portanto a falta do receptor para orexina do tipo 2 (OXR2) em mamíferos leva a episódios esporádicos de sono. Conseqüentemente, a presença de receptores de estrutura química semelhante em aves sugere que os efeitos de aumento de vigília e diminuição da sonolência após injeção de OxA encontrados neste trabalho sejam devidos à ação equivalente do receptor nesses animais.

A partir do exposto, podemos concluir que injeções de OxA causam modificações comportamentais em pombos, causando aumento intenso da vigília e exploração. Todavia, injeções ICV de orexinas não alteraram a ingestão de alimentos e os comportamentos ingestivos nesses animais. Sendo assim, nos vertebrados o sistema orexinérgico tem papel diferente entre as espécies (Fig. 12). Em roedores o sistema

orexinérgico participa do controle da vigília, locomoção e ingestão de alimentos. Em peixes o sistema orexinérgico participa do controle da locomoção e ingestão de alimentos. Como demonstramos, em aves, o sistema orexinérgico participa do controle da vigília e locomoção. Sendo assim as funções relacionadas ao alerta são as mais disseminadas entre as espécies de vertebrados estudadas até agora, do que função relacionada à ingestão de alimentos. Portanto o papel na vigilância parece ser o atributo funcional conservado nos vertebrados.

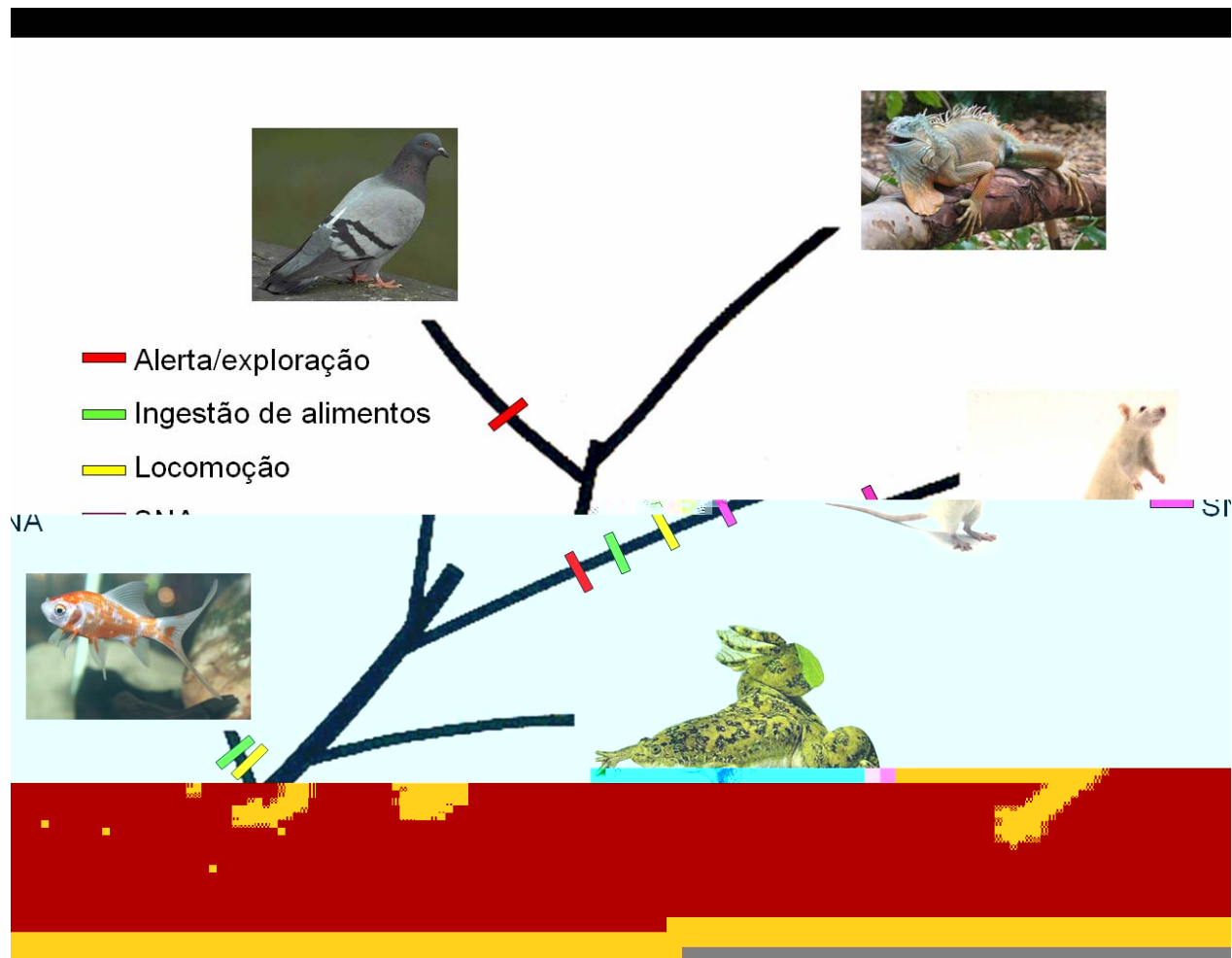


Figura 12. Cladograma referente às funções conhecidas das orexinas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasnejad M, Jonaidi H, Denbow DM, Pour Rahimi AM. **Feeding and locomotion responses to centrally injected nociceptin/orphanin FQ in chicks.** *Physiol Behav*, 2005;85: 383-386.
- Arora S, Anubhuti, **Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity – A review.** *Neuropeptides* (2006), 40:375-401.
- Barnes N, Sharp T: **A review of central 5-HT receptors and their functions.** *Neuropharmacology* (1999), 38:1083-1152.
- Bellin SI, Ritter S, **Disparate effects of infused nutrients on delayed glucoprivic feeding and hypothalamic norepinephrine turnover.** *Journal of Neuroscience* (1981) 1: 1347-1351.
- Borgland SL, Sharif TA, Sarti F, Fields HL, Bonci A: **Orexin A in the VTA Is Critical for the Induction of Synaptic Plasticity and Behavioral Sensitization to Cocaine.** *Neuron*. (2006) 49(4):589 – 601.
- Boswell T, Li Q, Takeuchi S, **Neurons expressing neuropeptide Y mRNA in the infundibular hypothalamus of Japanese quail are activated by fasting and co-express agouti-related protein mRNA.** *Molecular Brain Research*.(2002) 100:31-42
- Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T: **Hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems.** *J Comp Neurol* (1998), 402:460-474
- Brown RE, Sergeeva O, Eriksson KS, Haas HL: **Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat.** *Neuropharmacology* (2001) 40 457–459
- Brun SRM, Luz V, Fernandez M, Paschoalini MA, Marino-Neto J. **Atypical angiotensin receptors may mediate water intake induced by central injections of angiotensin II and of serotonin in pigeons.** *Regulatory Peptides* (2001), 98:127-135
- Cai XJ, Evans ML, Lister CA, Leslie RA, Arch JR, Wilson S, Williams G: **Hypoglycemia activates orexin neurons and selectively increases hypothalamic orexin-B levels: responses inhibited by feeding and possibly mediated by the nucleus of the solitary tract.** *Diabetes* 2001, 50:105-112.
- Card JP *et al*, **The hypothalamus: an overview of regulatory systems**, Chapter 37; In Zigmond *et al*, *Fundamental Neurosciences*, Academic Press, 1999.

- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elamquist JK, Scammell TE, Lee C, et al. **Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation.** *Cell* 1999;98:437–51.
- Chemelli RM, Willie JT, Xiong Y, Yanagisawa M: **Metabolic characterization of orexin knockout mice.** *Sleep* 2001, 24:A21-22.
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M: **Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999,96:748-753.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS II *et al.*: **The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:322-327.
- Debut M, Berri C, Arnould C, Guemene D, Sante-Lhoutellier V, Sellier N, Baeza E, Jehl N, Jégo Y, Beaumont C, Le Bihan-Duval E. **Behavioural and physiological responses of three chicken breeds to pre-slaughter shackling and acute heat stress.** *Br Poult Sci*, 2005;46: 527–535.
- Devich P, Delius JD. **Short-term modulation of domestic pigeon (*Columba livia* L.) behavior induced by intraventricular administration of ACTH.** *Z Tierpsychol*, 1981;55: 335-342.
- Dole P, Meinert H, **Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues.** *J Biol Chem*, v. 235, p. 2595-2599, 1960.
- Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR: **The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin.** *J Endocrinol* 1999, 160:R7-12.
- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS *et al.*: **Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area.** *J Comp Neurol* 1998, 402:442-459.
- Espana RA, Baldo BA, Kelley AE, Berridge CW: **Wake-promoting and sleep-suppressing actions of hypocretin (orexin): basal forebrain sites of action.** *Neuroscience* 2001, **106**:699-715.
- Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, et al. **Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state.** *Journal of Neuroscience* 2001;21:1656–62.

- Foster DW, McGarry JD. **Glucose, lipid and protein metabolism.** In: Griffin JJE, Ojeba SR (Eds). *Textbook of endocrine physiology.* USA, p. 349-374,1996.
- Furuse M, Ando R, Bungo T, Ao R, Shimojo M, Masuda Y, **Intracerebroventricular injection of orexins does not stimulate food intake in neonatal chicks.** *Br Poult Sci.* 1999; 40(5):698-700
- Geerling JC, Mettenleiter TC, Loewy AD, **Orexin neurons project to diverse sympathetic outflow systems.** *Neuroscience.* (2003) 122(2):541-550.
- Hagemann LF, Costa CV, Zeni LZR, Freitas CG, Marino-Neto J, Paschoalini MA, **Food intake after adrenaline and noradrenaline injections into the hypothalamic paraventricular nucleus in pigeons.** *Physiol. Behav.,* (1998), 64: 645-652.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P *et al.*: **Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:10911-10916.
- Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M *et al.*: **Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity.** *Neuron* 2001, 30:345-354.
- Harris GC, Wimmer M, Randall-Thompson JF, Aston-Jones G: **Lateral hypothalamic orexin neurons are critically involved in learning to associate an environment with morphine reward.** *Behavioural Brain Research.* (2007), 183(1):43-51.
- Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR: **Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat.** *Peptides* 1999, 20:1099-1105.
- Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA, **Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus.** *Peptides,* (2002). 23(12):2283-2306.
- Horvath TL, Diano S, van den Pol AN: **Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations.** *J Neurosci* (1999), 19:1072-1087.
- Huang ZL, Qu WM, Li WD, Mochizuki T, Eguchi N, Watanabe T, Urade Y, Hayaishi O: **Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:9965-9970.
- Ida T, Nakahara K, Katayama T, Murakami N, Nakazato M: **Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and**

- neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats.** *Brain Res* 1999, 821:526-529.
- Karten HJ, Hodos WA (1967) **A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*)**, Baltimore: Johns Hopkins Press.
- Kawakami S, Bungo T, Ando R, Ohgushi A, Shimojo M, Masuda Y, Furuse M. **Central administration of α -melanocyte stimulating hormone inhibits fasting- and neuropeptide Y-induced feeding in neonatal chicks.** *European Journal of Pharmacology* (2000), 398:361-364.
- Kirkouli SE, Stanley BG, Leybowitz SF, **Galanin: stimulation of feeding induced by medial hypothalamic injection of this novel peptide.** *European Journal of Pharmacology.* 1986, 122(1):159-60.
- Kelly J, Alheid GF, Newberg L, Grossman SP, **GABA stimulation and blockade in the hypothalamus and midbrain: effects on feeding and locomotor activity.** *Pharmacol Biochem Behav.*(1996) 7: 537-541.
- Kiwaki K, Kotz CM, Wang C, Lanningham-Foster L, Levine JA, **Orexin A (hypocretin 1) injected into hypothalamic paraventricular nucleus and spontaneous physical activity in rats.** *American Journal Physiology Endocrinology Metabolism.*(2004). 286(4):551-559.
- Kodama T, Usui S, Honda Y, Kimura M. **High Fos expression during the active phase in orexin neurons of a diurnal rodent, *Tamias sibiricus barberi*.** *Peptides* (2005) 26:631–638
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KM, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. **Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin.** *Nature* 1998, 393(6680):72-6.
- Leibowitz SF, Weiss G, Shor-Posner G, **Hypothalamic serotonin: Pharmacological, biochemical and behavioral analyses of its feeding suppressive.** *Clini Pharmacol* (1988), 11 suppl 1: S51-71.
- Levine AS, Morey JE, **Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats.***Peptides* 1984, 5(6):1025-9.
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E: **The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene.***Cell* 1999, **98**:365-376.
- Lubkin M, Stricker-Krongrad A: **Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 253:241-245.

- Martins PJF, D'Almeida V, Pedrazzoli M, Lin L, Mignot E, Tufik S; **Increased hypocretin-1 (orexin-a) levels in cerebrospinalfluid of rats after short-term forced activity.** *Regulatory Peptides*. 2004, 117:155-158.
- McGowan MK, Andrews KM, Grossman SP, **Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat.** *Physiology Behavior* (1992), 51: 753-766.
- Mieda M, Yanagisawa M **Sleep, feeding, and neuropeptides: roles of orexins and orexin receptors** *Current Opinion in Neurobiology* 2002, 12:339–345
- Monda M., Viggiano An., Viggiano Al., Viggiano E., Messina G., Tafuri D. De Luca V: **Sympathetic and hyperthermic reactions by orexin A: Role of cerebral catecholaminergic neurons.** *Regulatory Peptides*. (2007), 139:39-44.
- Monda M, Viggiano An, Viggiano Al, Viggiano E, Lanza A, De Luca V: **Hyperthermic reactions induced by orexin A: role of the ventromedial hypothalamus** *European Journal of Neurosciences* 2005, 22: 1169–1175.
- Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K: **Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia.** *Neurosci Lett* 1999, 264:101-104.
- Nakamachi T, Matsuda K, Maruyama K, Miura T, Uchiyama M, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, **Regulation by Orexin of Feeding Behaviour and Locomotor Activity in the Goldfish,** *Journal of Neuroendocrinology*, 2006, 18: 290–297
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K: **Distribution of orexin neurons in the adult rat brain.** *Brain Res* 1999, 827:243-260.
- Nicolaidis S, Rowland NE, **Metering of intravenous versus oral nutrients and regulation of energy balance.** *American Journal of Physiology* (1976), 231:661-668.
- Nishino S: **The hypothalamic peptidergic system, hypocretin/orexin and vigilance control.** *Neuropep*, 2007, 41(3): 117-133.
- Nishino S, Ripley B, Overeem S, Nevsimalova S, Lammers GJ, Vankova J, Okun M, Rogers W, Brooks S, Mignot E: **Lowcerebrospinal fluid hypocretin (Orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy.** *Ann Neurol* 2001, 50:381-388.
- Ohkubo T, Boswell T, Lumineau S. **Molecular cloning of chicken prepro-orexin cDNA and preferential expression on chicken hypothalamus.** *Biochimica et Biophysica Acta*, (2002); 1577:476-480.

- Ohkubo T, Tsukada AT, Shamoto K. **cDNA cloning of chicken orexin receptor and tissue distribution: sexually dimorphic expression in chicken gonads.** *J. Mol. Endocri.* (2003); 31: 499-508
- Oligiati VR, Netti C, Guidobono F, Pecile B, **The central GABAergic system and control of food intake under different experimental conditions** *Psychopharmacology* (1980), 68:163-167.
- Panksepp J, Normansell L. **Effects of ACTH(1 – 24) and ACTH/MSH(4– 10) on isolation-induced distress vocalization in domestic chicks.** *Peptides*, 1990;11: 915-919.
- Pereira GV, Bose RC, Marino Neto J, **Sistema instrumentado para o registro de comportamentos ingestivos,** *Metrologia* (2003).
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS: **Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems.** *J Neurosci* 1998;18:9996-10015.
- Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, et al. **A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains.** *Nat Med* 2000;9:991–997.
- Poggioli L, Vergoni AV, Bertolini A, **ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists.** *Peptides* 1986, 7(5):843-8.
- Reddy VM, Meharg SS, Ritter S, **Dose related stimulation of feeding by systemic injection of monosodium glutamate.** *Physiology Behavior*, (1986). 38: 465-469.
- Ritter S, Stone SL, **Area postrema lesions block feeding induced by systemic injections of monosodium glutamate.** *Physiology Behavior*, (1987), 41: 21-24.
- Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russel SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Gathe MA, Bloom SR. **A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo.** *Endocrinology* 1998, 139(10):4428-31.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S *et al.*: **Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G-protein-coupled receptors that regulate feeding behavior.** *Cell* 1998, 92:573-585
- Samson WK, Resch ZT: **The hypocretin/orexin story.** *Trends Endocrinol Metab* 2000, 11:257-262.

- Santoro, J.R. **Tireóide e metabolismo de ácidos graxos no rato. Estudos in vivo e com tecido in vitro.** São Paulo, 1967. tese (Doutorado) – faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Tsuiji T, Masuzaki H, Hiroaka J, Kasaki T, Tamoki M, Hyashi M, Yoshimasa Y, Nishi S, Nosoda K, Nakao K, **Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats.** *Endocrinology*, (1997), 138:947-954.
- Satoh S, Matsumura H, Kanbayashi T, Yoshida Y, Urakami T, Nakajima T, Kimura N, Nishino S, Yoneda H **Expression pattern of FOS in orexin neurons during sleep induced by an adenosine A2A receptor agonist.** *Behavioural Brain Research*. 2006. 170:277-286.
- Shibahara M, Sakurai T, Nambu T, Takenouchi T, Iwaasa H, Egashira SI, Ihara M, Goto K. **Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins** *Peptides*, 1999, 20:1169-1176.
- Singletary KGT, Delville Y, Farrell WJ, Wilczynski W. **Distribution of orexin/hypocretin immunoreactivity in the nervous system of the green Treefrog, *Hyla cinerea*** *Brain Research*, 2005. 1041:231-236
- Singletary KG, Deviche P, Strand C, Delville Y, **Distribution of orexin/hypocretin immunoreactivity in the brain of a male songbird, the house finch, *Carpodacus mexicanus*,** *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2006, 32:81-9.
- Smith GP, Gibbs J, **Postprandial satiety.** In: Sprague JM, Epstein AN, *Progress Physiological Psychobiology*. New York: Academic Press, p. 179-242. 1979.
- Stuckey JA, Gibbs J, Smith GP, **Neural disconnection of gut from brain blocks bombesin-induced satiety.** *Peptides* (1995), 6:1249-1255.
- Székely M, Pétervári E, Balaskó M, Hernádi I, Uzsoski B, **Effects of orexins on energy balance and thermoregulation,** *Reg Pep* 2002, 104: 47-53.
- Tachibana T, Saito S, Tomonaga S, Takagi T, Saito E-S, Nakanishi T, Koutoku T, Tsukada A, Ohkubo T, Boswell T, Furuse M. **Effect of central administration of prolactin-releasing peptide on feeding in chicks.** *Physiology and Behaviour* (2004), 80:713-719.

- Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM: **Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy.** *Neuron* 2000, **27**:469-474.
- Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van den Ploeg LHT, Guan XM. **Distribution of orexin receptor RNAm in the rat brain.** *FEBS Letters* 1998 438: 71-75.
- Van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, Belousov AB: **Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin.** *J Neurosci* 1998, **18**:7962-7971.
- Van den Pol AN: **Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord.** *J Neurosci* 1999, **19**:3171-3182.
- Volkoff H, Bjorklund JM, Peter RE, **Stimulation of feeding behavior and food consumption in the goldfish, *Carassius auratus*, by orexin-A and orexin-B** *Brain Reserch*, 1999. 846:204-209.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M: **To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness.** *Annu Rev Neurosci* 2001, **24**:429-458.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita S, Williams SC, Kisanuki YY, et al. **Distinct narcolepsy syndromes in orexin receptor-2 and orexin null mice: molecular genetic dissection of non-REM and REM sleep regulatory processes.** *Neuron* 2003;**38**:715–30.
- Yamanaka A, Sakurai T, Katsumoto T, Yanagisawa M, Goto K: **Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight.** *Brain Res* 1999, **849**:248-252
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Torninaga M, Yagami KI, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T.: **Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice.** *Neuron* 2003, **38**: 701-713.
- Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, et al. **Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep–wake activities.** *European Journal of Neurosciences* 2001;**14**:1075–81.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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