

MILENE DE OLIVEIRA LARA GALVÃO

**EFEITOS DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL
SOBRE A ATIVAÇÃO DE NÚCLEOS
HIPOTALÂMICOS ENVOLVIDOS NA INGESTÃO
ALIMENTAR**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2007

Galvão, Milene de Oliveira Lara

Efeito da Privação de Sono Paradoxal sobre a ativação de núcleos hipotalâmicos envolvidos na ingestão alimentar / Milene de Oliveira Lara Galvão. -- São Paulo, 2007.

xi, 46 f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Paradoxical Sleep Deprivation-Induced Effects on the Activation of Hypothalamic Nuclei related to Food Intake

1.Hipotálamo 2.Privação de sono 3.Consumo de Alimentos 4.Estresse 5.Neuropeptídeos

MILENE DE OLIVEIRA LARA GALVÃO

**EFEITO DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL
SOBRE A ATIVAÇÃO DE NÚCLEOS
HIPOTALÂMICOS ENVOLVIDOS NO CONTROLE
DA INGESTÃO ALIMENTAR**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Deborah Suchecki
Co-orientador: Profa. Dra. Rita de Cássia Sinigaglia-Coimbra

São Paulo
2007

Esta tese foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com o apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Resumo.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	11
3. Metodologia.....	12
3.1. Sujeitos.....	12
3.2. Grupos.....	12
3.3. Privação de Sono Paradoxal.....	12
3.4. Medidas.....	15
3.4.1. Variação de Peso.....	15
3.4.2. Consumo Alimentar.....	15
3.4.3. Coleta de Resíduos.....	15
3.4.4. Coleta de Sangue.....	15
3.4.5. Dosagens Hormonais.....	16
3.5. Perfusão.....	16
3.6. Anticorpos Primários.....	17
3.7. Imunohistoquímica.....	17
4. Análise Estatística.....	19
5. Resultados.....	20
5.1. Metabolismo.....	20
5.1.1. Variação de Peso.....	20
5.1.2. Consumo Alimentar.....	21
5.1.3. Resíduos.....	21
5.1.4. ACTH.....	23
5.1.5. CORT.....	25
5.2. Imunohistoquímica.....	26

5.2.1. Controles.....	26
5.2.2. Expressão de Fos.....	27
5.2.3. Expressão de ORX, CRH e NPY.....	29
6. Discussão.....	31
7. Conclusão.....	38
8. Referências Bibliográficas.....	39
Abstract.....	46

MILENE DE OLIVEIRA LARA GALVÃO

**EFEITOS DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL SOBRE A
ATIVAÇÃO DE NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS ENVOLVIDOS NA
INGESTÃO ALIMENTAR**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Newton Canteras

Profa. Dra. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia

Gloria E. Hoffman, Ph.D.

Aprovada em: ____ / ____ / 2007

*Com todo o meu amor e gratidão, dedico
este trabalho aos meus queridos pais.*

Agradecimentos

Agradeço profundamente a todas as pessoas que fazem parte da minha vida e participaram, de alguma forma, dessa etapa da minha formação.

Por partilharem com generosidade sua sabedoria, amizade e dedicação, sou muito grata às minhas mentoras e companheiras de trabalho:

Dra. Deborah Suchecki

Dra. Rita de Cássia Sinigaglia-Coimbra

Também expresso minha gratidão às seguintes pessoas pelo enorme apoio e contribuições à minha jornada:

Dr. Sergio Tufik e grupo do sono

Marilde Aires, Selminha, Solange, Nereide, Julio, Márcio, Andréia, Valéria

Professores e funcionários do Departamento de Psicobiologia

Alunos e estagiários do Departamento de Psicobiologia (as 'psicopessoas')

Grupo de estudo do estresse:

Suzi Emiko Kawakami, Paula Ayako Tiba, Claudia Faturi, Jair Neto, Elizabete Borsonelo, Beatriz Duarte Palma Xylaras, Mara Raboni, Ricardo Machado, Tatiana Lima, Vanessa Rossi, Eric Kawamoto, Karin di Monteiro Moreira, Vinícius Bunscheit.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Tecidual, pelo profissionalismo, companheirismo e pela amizade durante o período que passei por lá.

Profa. Dra. Rita Coimbra

Dr. Cícero Coimbra

Alunos e estagiários (Cristian, Janise, Andrea, Lília, Aline, Phillipe)

À Banca Examinadora, pelo profissionalismo, competência e por todas as dicas e valiosas contribuições.

Ao Prof. Dr. Newton Canteras, pela gentileza e solicitude de contribuir com o nosso estudo, fornecendo-nos uma alíquota do anticorpo Fos.

À minha querida amiga e primeira orientadora Cássia Thaïs Bussamra Vieira Zaia, por ter me introduzido o hipotálamo neuroendócrino e me contagiado com seu entusiasmo e paixão por este mundo fascinante da Ciência e pela amizade e carinho de sempre.

À minha adorável e brilhante amiga Gloria Hoffman, meus mais sinceros agradecimentos por toda a ajuda, pelas dicas e por ter me proporcionado momentos muito agradáveis durante minha visita a Baltimore.

Aos meus preciosos amigos por seu amor e apoio incondicional que comprovadamente, superam a saudade, o tempo e a distância. Vocês fazem qualquer jornada muito mais divertida!

Marilanda Ferreira Bellini, Jozélia Gomes Ferreira, Sérgio Paulo Dejato da Rocha, Narjara do Carmo de Oliveira, Daniel Ferreira de Lima Neto, Artur Fernandes, Águida Takahagi e Perla Romanus.

Ao meu querido irmão Paulo Lara, pelo carinho, companheirismo, talento e por todas as alegrias que me traz. Dentre estas, meu maior tesouro e objeto do meu mais puro amor, meu sobrinho adorado, Rael Schwelm Lara.

Ao meu pai Paulo Lara Galvão por todas as boas lembranças da minha infância e por contribuir para a minha formação como ser humano.

À minha adorada mãe Marilene Baptista de Oliveira, por toda a força de vontade, pelo amor infinito e, por toda a sua luz. Obrigada pelo exemplo, carinho, amizade e companheirismo em todos os momentos da minha vida!

Ao Bryan por todo carinho, pelo caminho futuro a trilharmos juntos e, por achar que ser um neurocientista é tão legal quanto ser astronauta!

Ao apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e FAPESP (Programa CEPID 98/14303-3).

Lista de Tabelas

Tabela 1. Número de células positivas para Fos em diferentes núcleos hipotalâmicos. Valores representados como média \pm e.p.m., (n). * diferente do grupo controle.....27

Tabela 2. Número de células positivas nos núcleos hipotalâmicos específicos. Valores representados como média \pm e.p.m., (n). * diferente do grupo CTL.....29

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental utilizado neste estudo. Ratos foram privados de sono paradoxal, ou mantidos nos recipientes contendo maravalha, por um período de 96h. No final desse período (às 8h00 do Dia 5), foram perfundidos para obtenção dos cérebros para avaliação imunohistoquímica de Fos e neuropeptídeos hipotalâmicos.....14

Figura 2. Variação de peso durante o período de PSP. Valores representados como porcentagem de variação de peso [(peso atual-peso anterior)/peso anterior] x 100. * diferente do respectivo grupo controle ($p < 0,05$).....20

Figura 3. (A) O consumo alimentar de animais submetidos à PSP e grupo CTL foi medido duas vezes ao dia as 8h00 (estimativa de consumo noturno) e as 17h00 (estimativa de consumo diurno) e subtraindo-se os valores de resíduos coletados da água no fundo do recipiente de privação. (B) Consumo total diário. (C) Consumo total por período. Valores representados como média \pm e.p.m.; $n = 20$ /grupo. * diferente do respectivo grupo controle; ¥ diferente da manhã/noite 1 ($p < 0,05$).....22

Figura 4. Percentual de resíduos em relação ao consumo real. Valores representados como média \pm e.p.m.; $n = 20$. * diferente de D2 e N2 ($p < 0,05$)....23

Figura 5. Variação da concentração plasmática de ACTH (pg/ml) durante o período de PSP. Valores expressos como média \pm e.p.m.; $n = 10$ /grupo. As amostras de sangue foram coletadas diariamente as 08h00 durante o período de PSP. *diferente do basal; \dagger diferente do CTL no mesmo dia ($p < 0,05$).....24

Figura 6. Variação nas concentrações plasmáticas de corticosterona (ng/ml) durante o período de PSP. Valores expressos como média \pm e.p.m.; $n = 10$ /grupo. As amostras de sangue foram coletadas diariamente as 08h00 durante o período

de PSP. † diferente do CTL no mesmo dia; ¥ diferente de todos os outros dias ($p < 0,05$).....25

Figura 7. Fotomicrografias de cortes incubados com GFAP em aumento de 20x (A) e controle negativo (B) em aumento de 10x.....26

Figura 8. Fotomicrografia representativa de imunorreatividade (IR) do Fos no LHA de animais CTL (A-B) e PSP (C-D), e no PVN de animais CTL (E-F) e PSP (G-H). Representação gráfica da distribuição dos valores médios de células imunorreativas para FOS na LHA (I) e PVN (J) de ambos os grupos. Barras de escala representam 250 μm em A, C, E e G; 25 μm em B e D; e 50 μm em F e H.....28

Figura 9. Fotomicrografia representativa da imunorreatividade para CRH no PVN de animais CTL (A-B) e PSP (C-D), e para ORX na LHA de animais CTL (E-F) e PSP (G-H). Representação gráfica da distribuição dos valores médios de células imunorreativas para FOS na LHA (I) e PVN (J) de ambos os grupos. Barras de escala representam 250 μm em A, C, E e G; e 25 μm em B, D, F e H.....30

Figura 10. Distribuição das médias do número de células imunorreativas para Fos (A) e NPY (B) no ARC de animais dos grupos CTL ou PSP por 96h.....31

RESUMO

Ingestão alimentar e sono são controlados por diversos mecanismos regulatórios comuns, incluindo fatores metabólicos, autonômicos, endócrinos e ambientais, integrados pelo hipotálamo. A privação de sono paradoxal (SP) resulta em alterações metabólicas, tais como: aumento de consumo de ração, perda de peso e diminuição das concentrações plasmáticas de leptina e de hormônios anabólicos, sugerindo aumento de gasto energético e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), favorecendo catabolismo. O aumento de ingestão é evidenciado pela expressão aumentada de neuropeptídeo Y (NPY), um potente sinal orexígeno hipotalâmico, juntamente com achados de aumento da concentração de grelina, hormônio gástrico que induz a ingestão. Dados recentes mostraram uma grande quantidade de resíduos encontrada no fundo da lata de PSP, sugerindo que os animais privados poderiam estar roendo, mas não necessariamente ingerindo mais ração. A orexina (ORX) ou hipocretina participa tanto do controle do metabolismo energético como do sono, suas maiores concentrações são encontradas na vigília e altos níveis de ORX são encontrados no líquor de ratos durante a PSP. No entanto, tem sido proposto que este peptídeo promove atividade motora preferencialmente à vigília. Baseado nestes dados, o objetivo deste estudo foi analisar a ativação de neurônios hipotalâmicos nos núcleos ARC, PVN e LHA, em animais privados de sono paradoxal, por meio da medida de imunorreatividade para a proteína Fos, um marcador de ativação precoce de genes, e de neuropeptídeos relacionados (NPY, ORX e CRH); estudar alterações no eixo HPA, acompanhando a evolução temporal dos hormônios ACTH e CORT e, determinar a quantidade de ração ingerida durante os 4 dias de privação de SP. A privação de SP promoveu perda de peso, além de promover o achatamento do

padrão circadiano de ingestão, devido ao aumento de consumo durante o período diurno; o consumo total diário, no grupo experimental, apresentou-se aumentado apenas no Dia 4. A porcentagem de resíduos em relação ao consumo permaneceu constante durante todo o período experimental, com exceção da Noite 3. Foi observado aumento da atividade do eixo HPA, pela expressão aumentada de Fos e CRH no PVN, além de maiores concentrações plasmáticas de ACTH e CORT nos animais privados de SP. Foi encontrado aumento na expressão de ORX e Fos na LHA ao final do período experimental. Não foram encontradas diferenças na expressão de Fos ou NPY no núcleo ARC. Baseado nos resultados observados sugere-se que a privação de SP promoveu alterações significativas no metabolismo periférico e a ativação de núcleos hipotalâmicos envolvidos no comportamento alimentar e na resposta de estresse.

1. INTRODUÇÃO

Comer e dormir são duas das funções homeostáticas mais primitivas do ser humano e ambas são controladas por núcleos específicos do hipotálamo (Saper, 2006). Os mecanismos neurais que controlam sono e apetite apresentam-se, muitas vezes, sobrepostos (Willie et al, 2001).

Interações recíprocas entre hormônios e sono são algumas das relações pouco compreendidas no momento. Sabe-se, no entanto, que noites mal dormidas tendem a ocorrer juntamente com disfunções alimentares ou sobrepeso (Flier & Elmquist, 2004). Um dos possíveis motivos para tal achado é simplesmente o fato de que devido ao maior tempo acordado, tem-se maior acesso aos alimentos.

Entretanto, essa alteração no padrão alimentar pode ter uma explicação biológica. Spiegel e colaboradores (2004) mostraram que indivíduos que dormiram por 4 horas, em duas noites consecutivas, apresentaram aumento de medida subjetiva de fome e, preferencialmente por alimentos ricos em carboidratos e gorduras (*comfort foods*). Este resultado confirma a hipótese de que alimentos palatáveis possam reduzir o estresse por meio da participação no mecanismo de feedback do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA, da sigla em inglês, *Hypothalamus-Pituitary-Adrenal*, Laugero, 2001; Dallman et al, 2003).

Ratos estressados cronicamente exibem aumento do consumo de alimentos palatáveis que, por sua vez, reduzem as concentrações plasmáticas de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona (CORT) (Pecoraro et al, 2004). A privação de sono paradoxal (SP) por períodos prolongados promove o aumento das concentrações basais (Sucheki & Tufik, 2000; Suchecki et al, 1998;

Martinez-Gonzalez et al, 2004) e induzidas por estresse (Suchecki et al, 2002) de ACTH e CORT e a atividade simpática (Koban & Swinson, 2005; Kushida et al, 1989). Recentemente, nosso grupo (Suchecki et al, 2003) demonstrou que animais privados de SP e que recebem soluções de sacarina ou sacarose durante o período de privação, apresentaram concentrações reduzidas de ACTH e CORT quando comparados aos ratos privados de SP que recebem água. Os autores sugerem que o aumento do consumo destas soluções possa ser uma resposta adaptativa para lidar com o estresse.

Soluções de sabor adocicado diminuem a ativação do eixo HPA induzida pela privação de sono, mas não evitam a perda de peso. Apesar de os carboidratos atenuarem a atividade do eixo HPA, observa-se que ratos privados de sono paradoxal e que ingerem soluções de sacarose ou sacarina, também exibem aumento de gasto energético. Com isso, tem-se que estas soluções não previnem a hiperfagia e perda de peso associadas ao quadro de privação de sono paradoxal (Suchecki et al, 2003).

Em humanos, a privação ou restrição de sono promove alterações significativas e consistentes no metabolismo periférico, pois alteram fatores periféricos que regulam o comportamento alimentar (Everson et al, 2004; Spiegel et al, 2004; Taheri et al, 2004; Saper et al, 2006). Dentre os hormônios periféricos que participam destas alterações, destacam-se a leptina e grelina (Klok et al, 2007). Estes hormônios são fatores presentes na circulação sanguínea que participam do controle do metabolismo energético, ingestão alimentar e composição corporal por meio de suas ações regulatórias no hipotálamo (Woods et al, 1998).

A leptina é uma proteína sintetizada e secretada pelo tecido adiposo. É considerada um marcador plasmático de saciedade, responsável pela redução da ingestão alimentar e conseqüente perda de peso corporal. Receptores para leptina podem ser encontrados em regiões do sistema nervoso central (SNC) relacionadas ao controle do apetite, do balanço energético e da reprodução, como por exemplo, os núcleos hipotalâmicos ARC, PVN e VMN (Buchanan et al, 1998). O aumento do gasto energético acarreta perda de tecido adiposo, responsável pela síntese de leptina (Ahima et al, 2004).

A grelina, um peptídeo com 28 resíduos de aminoácidos isolado do estômago, é um hormônio secretado em situações de balanço energético negativo (Kojima et al, 2001). É um importante fator orexigênico, portanto, capaz de promover ganho de peso e aumento de adiposidade (Ueno et al, 2005). Estudos imunohistoquímicos mostram que neurônios responsivos à grelina apresentam-se limitados ao ARC (Kojima et al, 1999).

Spiegel e colaboradores (2004) e Taheri e colegas (2004) encontraram, respectivamente, queda de 18% nas concentrações de leptina e aumento de 28% na concentração de grelina, em humanos submetidos à restrição de sono por 4 horas. Em ratos, a privação de sono total ou de SP também acarreta redução da concentração plasmática de leptina (Everson et al, 2004; Koban & Swinson, 2005). Esta redução pode ser explicada pela perda de tecido adiposo observada após 96h de privação de SP (Hipólido et al, 2006).

Independentemente do método utilizado para promover privação de SP, alterações metabólicas como redução dos hormônios anabólicos (Everson et al, 2004), ativação do eixo HPA e exposição prolongada a glicocorticóides, além de

hiperfagia e perda de peso corporal (Kushida et al, 1989; Suchecki & Tufik, 2000; Koban et al, 2005) são constantemente relatados. Animais privados de SP apresentam indícios de estresse, como perda de peso, atrofia do timo e o aumento no peso das glândulas adrenais (Coenen & Luijtelaar, 1985).

As respostas de estresse são constituídas pela ativação de sistemas neurobiológicos que ajudam a preservar o organismo durante as mais diversas situações. Os mais estudados sistemas fisiológicos de resposta de estresse são o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema nervoso autônomo (SNA). Estes sistemas respondem diariamente aos eventos estressantes, assim como ao ciclo de atividade e repouso. Comportamentalmente, a resposta de estresse constitui-se das reações de luta-ou-fuga, porém pode incluir outros comportamentos, como o aumento do alerta, acompanhado por um aumento da ansiedade e preocupação, especialmente quando a ameaça não é bem definida e quando não há nenhuma resposta comportamental clara que poderia levar ao fim da ameaça.

O estresse agudo, seja físico ou psicológico, elicia a liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelos neurônios responsáveis por sua produção nas áreas córtico-límbicas do cérebro. Esses neurônios, cuja principal localização é o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), secretam o CRH no sistema porta-hipofisário. O CRH atua sobre a adenohipófise, promovendo a liberação de ACTH que, pela circulação sistêmica, atinge o córtex das glândulas adrenais, estimulando a secreção de glicocorticóides (GC). O principal GC nos seres humanos é o cortisol, e nos roedores é a CORT. Os GC também promovem feedback negativo sobre o eixo HPA, especialmente no hipocampo, córtex pré-frontal, hipotálamo e hipófise, reduzindo a liberação de CRH e ACTH. Os GC

promovem mudanças fisiológicas de apoio à resposta de luta-ou-fuga, como aumento da taxa de glicose sanguínea por estimular a gliconeogênese e no fígado, lipólise e catabolismo protéico (em casos crônicos) (Pecoraro et al, 2006; Sapolsky et al, 2000).

Portanto, como mencionado anteriormente, a resposta de estresse, incluindo o sistema nervoso simpático (dados não publicados), e mais especificamente a ativação do eixo HPA induzida pela privação de SP é verificada pelo aumento das concentrações plasmáticas de CORT e de ACTH (Suchecki & Tufik, 2000; Suchecki et al, 2002).

O aumento de taxa metabólica e do gasto energético induzidos pela privação de SP podem ser evidenciados pelo aumento da frequência cardíaca durante sono de alta amplitude e vigília, em comparação com valores basais (Kushida et al 1989). O envolvimento do SNA pode ser observado pelo aumento das concentrações de noradrenalina, responsável pela involução do tecido adiposo marrom e pelo aumento da taxa metabólica (Hipólido et al, 2006; Everson & Crowley, 2004; Koban & Swinson, 2005). No entanto, a maior ativação autonômica em ratos privados de sono total (Everson et al, 1989), acontece mais tardiamente em relação ao aumento de gasto energético, ou seja, não pode ser mediador desta resposta. Após o sacrifício, foi demonstrado que animais privados de SP apresentam ausência quase total de gordura corporal, diminuição de tecido conjuntivo e aumento das glândulas adrenais (Kushida et al, 1989; Bergmann et al, 1989).

O hipotálamo exerce papel fundamental na integração de diversas funções metabólicas, tais como controle do apetite e balanço energético. Age por meio de

uma grande variedade de sistemas que integram funções nervosas e endócrinas. Alterações neste complexo neuroquímico-neuroendócrino podem estar associadas a padrões anormais de alimentação, tais como, anorexia nervosa e bulimia, ou compulsão alimentar, levando à obesidade (Leibowitz, 1992).

Alguns peptídeos hipotalâmicos estão envolvidos tanto no controle da ingestão alimentar como nos mecanismos de controle do ciclo sono/vigília, como por exemplo, orexina (ORX) (Bernardis & Bellinger, 1996) e o hormônio liberador de corticotropina (CRH) (Chang & Opp, 2001). Neurônios que sintetizam ORX estão presentes exclusivamente na área hipotalâmica lateral (LHA), que contém também o hormônio concentrador de melanina (MCH, do inglês *melanin concentrating hormone*) (Bernardis & Bellinger, 1996), e participam no controle da ingestão e do metabolismo energético (de Lecea et al, 1998).

Além de ser o principal estímulo para a ativação do eixo HPA (Pecoraro et al, 2006), o CRH participa de vias metabólicas que promovem aumento do gasto energético e diminuição da ingestão alimentar (Woods et al, 1998). Participa, também, do controle neuroendócrino do eixo HPA e atua na manutenção da vigília (Chang & Opp, 2001).

O neuropeptídeo Y (NPY) pertence à família dos polipeptídeos pancreáticos, apresentando 36 resíduos de aminoácidos. Está presente em elevada concentração no núcleo paraventricular (PVN), no núcleo arqueado (ARC) e no núcleo supraquiasmático (SCN) (Jhanwar-Uniyal et al, 1990). Constatou-se que este peptídeo é um potente estimulador da ingestão alimentar, quando injetado no PVN (Stanley et al, 1989).

Neurônios que sintetizam NPY são ativados durante períodos de balanço energético negativo. A expressão de neurônios responsáveis pela síntese e secreção de NPY, no ARC, depende de diversos sinais metabólicos e hormonais. Podem ser ativados em casos de hipoglicemia, como também em animais que apresentam perda de peso corporal e gordura, resultantes de condições de desbalanço energético, como fome, lactação e diabetes tipo 1 (insulino-dependente) (Akabayashi et al, 1993; Jhanwar-Uniyal et al, 1993; Williams et al, 2004). Estes neurônios podem ser estimulados pela diminuição nas concentrações plasmáticas de insulina e/ou leptina, pois ambas inibem a expressão do gene para NPY no ARC (Williams et al, 2004; Jhanwar-Uniyal et al, 1993, Woods et al, 1998).

Em quadros de fome e diabetes, estes neurônios também podem ser estimulados pelo aumento das concentrações circulantes de corticosterona que ocorre nestas situações (Williams et al, 2004).

Orexina ou hipocretina é um neuropeptídeo orexígeno recentemente descoberto, presente na LHA, possui dois subtipos ORX-A e -B (de Lecea et al, 1998; Sakurai et al, 1998). A ORX-A, com 33 resíduos de aminoácidos, é altamente conservada em entre diferentes espécies: humanos, ratos, camundongos, vaca e suínos. A ORX-B, com 28 resíduos de aminoácidos, apresenta 46% homologia com a ORX-A e é semelhante entre ratos e camundongos, porém a humana apresenta substituição de dois aminoácidos, comparada com a seqüência de roedores (Sakurai e cols, 1998).

Sakurai et al (1998), identificaram dois tipos de receptores para ORX, denominados tipo 1 (ORX₁R) e tipo 2 (ORX₂R). Ambos são receptores acoplados à proteína G e apresentam afinidades diferentes para ORX-A ou -B. O receptor do

tipo 1 é moderadamente seletivo à ORX-A, enquanto o receptor do tipo 2 é não seletivo, ligando-se a ambos os subtipos com a mesma afinidade.

Bernardis & Bellinger (1996) ressaltaram o envolvimento da LHA no controle do comportamento alimentar e do metabolismo energético. Neste aspecto, diversos estudos mostraram a participação da ORX nestas funções fisiológicas. Camundongos knockout para ORX são hipofágicos (Willie et al, 2001) e a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de ORX aumenta o comportamento de ingestão (Mullet et al, 1999) e a vigília (Hagan et al, 1999; Terao et al, 2000).

Briski & Sylvester (2001) mostraram a ocorrência de ativação de neurônios orexinérgicos após a diminuição da disponibilidade de glicose. Este dado corrobora resultados previamente demonstrados de que a hipoglicemia induzida por insulina ativa o RNA mensageiro (RNAm) em neurônios que contêm ORX (Mullet et al, 1999), mostrando a ação deste peptídeo no controle da glicemia e sua participação em situações de balanço energético negativo.

Uma das maneiras efetivas de se observar ativação recente de neurônios é por meio de estudos de genes de ativação precoce (IEG, do inglês *immediate early genes*). Estes genes promovem a expressão de proteínas específicas logo após um estímulo. Um dos exemplos de genes de ativação precoce é o c-fos e seu produto de expressão é a proteína Fos. A medida da imunoreatividade à proteína Fos pode ser relacionada à recente ativação neuronal (Morgan & Curran, 1991). No entanto, diversos genes compõem a família de IEG, sendo que a ausência de ativação de Fos não necessariamente significa ausência de atividade celular (Hoffman & Lyo, 2002).

Demonstrou-se que a ORX estimula a expressão de Fos em neurônios que secretam NPY no ARC (Mullet et al, 1999) e potencializa seu efeito orexigênico. A administração prévia de antagonista do receptor NPY inibe este efeito, sugerindo que o NPY possa ser responsável pela ingestão induzida por ORX, participando, também na ativação destes neurônios. Estas interações parecem ser importantes para a integração das respostas de alimentação a uma variedade de sinais (Yamanaka et al, 2000; Williams et al, 2004).

Concentrações reduzidas de leptina e de glicose aumentam a expressão de RNAm para ORX. Estudos neuroanatômicos mostram inervação recíproca entre as vias sensíveis à leptina no ARC e neurônios orexinérgicos na LHA (Sahu et al, 2002; Yamanaka, 2000).

Em ratos, as concentrações de ORX no líquido cefalorraquidiano seguem uma variação circadiana. As mais altas concentrações ocorrem durante o período noturno e as mais baixas, aproximadamente 8h após as luzes serem acesas (Fujiki et al, 2001). O mais bem conhecido fator inibidor da ORX é a leptina, inibindo a ingestão por sua ação direta sobre neurônios que sintetizam NPY, no ARC, e neurônios orexinérgicos, na LHA (Fujiki et al, 2001).

Na ponte, neurônios de ORX inervam o núcleo do trato solitário, importante estrutura para a integração de aferências sensoriais, transmitindo estes sinais para o hipotálamo. Outras projeções importantes dirigem-se ao locus coeruleus, núcleo dorsal da rafe e núcleo tuberomamilar (Williams et al, 2004). Estas áreas estão envolvidas com o despertar e com a vigília, e as orexinas são conhecidas por serem cruciais no controle do sono. Disfunções, em cães, no sistema de receptores para ORX resultam em narcolepsia (Mignot, 2001; Willie et al, 2001).

O aumento do consumo de ração durante a privação de sono parece ser um resultado controverso. Apesar de parecer que os animais ingerem mais, resultados obtidos no nosso laboratório (Martins et al, 2006) mostram que ratos privados, na verdade ingerem menos ração que os animais controle, sendo encontradas grandes quantidades de resíduos na água do recipiente em que o animal se encontra.

Neste aspecto, Torterolo et al (2003) propuseram que a orexina promove atividade motora preferencialmente à vigília. Foi observada imunorreatividade para Fos em gatos, durante a vigília ativa, mas não durante a vigília quieta. Um efeito da privação de SP recentemente relatado é o aumento das concentrações de ORX no CSF, em ratos (Pedrazzoli et al, 2004). Portanto, é possível que essas concentrações sejam mantidas aumentadas durante a privação de SP como um mecanismo adaptativo à vigília forçada.

Estudos anteriores não controlaram o desperdício de ração, mantendo os animais em tanques com fluxo constante de água, desconsiderando eventuais resíduos que possam cair na água do fundo do tanque de privação. O aumento de consumo de ração em comparação aos animais não privados poderia ser devido ao fato de estes animais roerem mais, mas não por ingerirem mais ração, como sugerido por Martins e colaboradores (2006).

2. OBJETIVOS

Com base nestas evidências, os objetivos deste estudo foram:

- 1) estudar a ativação de neurônios hipotalâmicos nos núcleos ARC, PVN e LHA, por meio da medida de imunorreatividade para a proteína Fos, um marcador de ativação precoce de genes, e de neuropeptídeos relacionados (NPY, ORX e CRH), após 4 dias de PSP.
- 2) estudar a evolução temporal da secreção dos hormônios ACTH e CORT induzida pela PSP durante os 4 dias manipulação.
- 3) determinar, com a maior precisão possível, a quantidade de ração ingerida durante o período de privação.

3. METODOLOGIA

3.1. Sujeitos: Quarenta ratos Wistar, 3 a 4 meses de idade, provenientes do biotério do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo, permaneceram em suas gaiolas moradias em grupos de 4, com água e ração *ad libitum*. Os animais foram transportados e habituados ao biotério do laboratório de Neuropatologia e Neuroproteção, por um período de duas semanas e manipulados todos os dias, por uma semana antes do início dos experimentos. O laboratório é mantido com iluminação de 12h claro - 12h escuro (luzes acesas às 08h00) e temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) controladas. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo 0638/05).

3.2. Grupos: Os animais foram distribuídos, com base no peso corporal inicial, em: 1) Privação de sono paradoxal (PSP) e 2) Controle (CTL), n=20/grupo.

3.3. Privação de Sono Paradoxal: O método utilizado para privar os animais de sono paradoxal (SP) foi o da plataforma única (MPU) baseado no relaxamento muscular presente durante esta fase do sono. Baseado neste princípio, Jouvét et al (1964) estabeleceram um método de privação de sono em gatos, que consiste em uma plataforma cilíndrica estreita imersa em água até aproximadamente 1 cm da borda superior da plataforma, na qual o animal é obrigado a se apoiar para não se molhar. Ao iniciar o SP e, conseqüentemente, apresentar atonia muscular, o animal acaba por cair na água e, portanto, desperta. Esta técnica foi

posteriormente adaptada para ratos (Cohen & Dement, 1965), por serem animais comumente utilizados em estudos experimentais.

Os ratos foram alojados em recipientes (22,0 cm de comprimento x 22,0 cm de largura x 35,0 cm de altura), sobre uma plataforma de 7,0 cm de diâmetro, imersa em água até 1 cm de sua superfície superior. Os animais controle foram alojados nos mesmos recipientes, contendo serragem ao invés de água. Todos os animais foram previamente habituados a seus ambientes experimentais por 1h/dia durante 2 dias antes do início do experimento. O procedimento experimental apresenta-se esquematizado na Figura 1.

Privação de Sono Paradoxal / Controle

2 semanas		BASAL		DIA 1		DIA 2		DIA 3		DIA 4		DIA 5
Habituação	Habituação	↑ 8:00 Sangue	↑ 17:00	↑ 8:00 Peso Ração Sangue	↑ 17:00 Peso Ração	↑ 8:00 Peso Ração Sangue	↑ 17:00 Peso Ração	↑ 8:00 Peso Ração Sangue	↑ 17:00 Peso Ração	↑ 8:00 Peso Ração Sangue	↑ 17:00 Peso Ração	↑ 8:00 Perfusão

Figura 1 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado neste estudo. Ratos foram privados de sono paradoxal, ou mantidos nos recipientes contendo maravalha, por um período de 96h. No final desse período (às 8h00 do Dia 5), foram perfundidos para obtenção dos cérebros para avaliação imunohistoquímica de Fos e neuropeptídeos hipotalâmicos.

3.4. Medidas:

3.4.1. Variação de Peso: os animais foram pesados antes de serem alojados nos respectivos ambientes (CTL ou PSP) e, diariamente às 08h00, até o último dia de privação. A porcentagem variação de peso foi calculada pela seguinte equação: $[(\text{peso atual} - \text{peso anterior}) / \text{peso anterior}] \times 100$.

3.4.2. Consumo Alimentar: No primeiro dia de experimento, foi ofertada quantidade conhecida de ração (150 g) para cada animal sendo que, a partir de então, a ração foi pesada duas vezes ao dia durante o período de privação, às 08h00 e 17h00. O peso da ração obtido às 08h00 representou o consumo noturno, enquanto que aquele obtido às 17h00 correspondeu ao consumo diurno, obtendo-se o valor de ração consumida pela subtração dos valores pesados.

3.4.3. Coleta de resíduos: No mesmo momento em que foi estimada a quantidade de ração retirada dos comedouros, foi coletado todo o resíduo no fundo dos recipientes, separado das fezes e seco em estufa, por 24h a 50°C, sendo o valor obtido, descontado do valor de ração consumida. Dessa forma, obtivemos o valor real de consumo de ração, mais próximo possível da realidade. A porcentagem de resíduos em relação ao consumo real foi calculada pela seguinte equação: $[(\text{resíduo} / \text{consumo real}) \times 100]$.

3.4.4. Coleta de Sangue: A partir de uma semana antes do início do período de PS, os animais foram diariamente manipulados, para habituarem-se ao procedimento de coleta de sangue. A coleta foi efetuada diariamente às 08h00 por meio de um pequeno corte na extremidade da cauda dos animais, seguindo-se de ordenha das veias e artérias da cauda, coletando-se a quantidade média de 300µl por animal/dia. O sangue foi coletado em tubos Eppendorf contendo EDTA

(60mg/ml; 0,1ml/tubo), resfriados em isopor contendo gelo, e centrifugados a 2300 rpm a 4°C por 20 minutos, para a obtenção do plasma, que foi armazenado em freezer -20°C para posteriores dosagens hormonais.

3.4.5. Dosagens Hormonais: As concentrações plasmáticas de ACTH foram determinadas pelo método imunoenzimático de quimiluminescência, utilizando-se um anticorpo monoclonal específico para ACTH (DPC Immulite, Los Angeles, CA, USA). A sensibilidade do método é de 9,0 pg/ml e variações intra- e entre-ensaios são de 9,6% e 9,4%, respectivamente. As concentrações plasmáticas de corticosterona foram determinadas pelo método de radioimunoensaio, utilizando-se um kit comercial específico para ratos e camundongos (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA), com uma modificação do método original, em que o volume da amostra é reduzido para 5 µl (Thrivikraman et al, 1997). A sensibilidade do método é de 0,25 ng/ml e variações intra- e entre-ensaios são de 10,3% e 7,1%, respectivamente.

3.5. Perfusão: Ao final dos 4 dias de PSP, os animais foram sacrificados por perfusão transcardíaca. Para tanto, os animais foram anestesiados com halotano, entubados (via oro-traqueal), e mantidos sob ventilação mecânica. Após a abertura do tórax e clampeamento da aorta abdominal, os animais receberam 0,03ml de heparina sódica intraventricular (diluída em salina 0,9%, na concentração de 1:10). Em seguida, solução salina 0,9% foi bombeada sob pressão devidamente ajustada durante 30 segundos (tempo suficiente para a lavagem do encéfalo do animal). Subseqüentemente, foram introduzidos 150 ml

de solução fixadora (paraformaldeído 4% tamponado). Todas as soluções utilizadas na perfusão estavam em temperatura ambiente (20-25°C). Os animais foram, então, decapitados e a cabeça inteira permaneceu mergulhada no fixador por 18-24h sob temperatura ambiente. Após esse tempo de finalização do processo de fixação, os encéfalos foram removidos do crânio e mantidos em solução fixadora (paraformaldeído 1%) a 4°C até o processamento do material

3.6. Anticorpos primários: Os seguintes anticorpos primários foram utilizados para determinação da expressão dos respectivos peptídeos hipotalâmicos:

GFAP: (*glial fibrillary acidic protein*, DAKO; 1: 3000): anticorpo polyclonal; origem: coelho. Este anticorpo, direcionado contra astrócitos, foi utilizado como controle interno do procedimento de imunohistoquímica.

Fos: (Oncogene, anticorpo gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Newton Canteras; 1: 5000), origem: coelho.

NPY: (Chemicon International; 1: 3000), origem: coelho.

ORX: (Chemicon International; 1:3000), origem: coelho.

CRH: (Advanced Targeting Systems; 1:20 000), origem: coelho.

3.7. Imunohistoquímica: A região de interesse foi isolada em uma peça de corte coronal (entre -1.80 e -3,60 bregma) e processada, com o auxílio de um vibrátomo em cortes de 35µm, em séries de 1 a cada 5 cortes. Os cortes contendo as regiões de interesse foram separados e mantidos em poços preenchidos com

solução tampão Tris 0,1M (pH 7,6) para a realização da técnica de imunohistoquímica por *free-floating*. Esta técnica consiste em utilizar cortes não montados em lâminas, e colocados em solução em pocinhos, facilitando a penetração dos anticorpos no tecido de maneira mais homogênea.

Como medidas de controle do procedimento, fez-se a incubação com o anticorpo anti-GFAP (controle interno, marcação de astrócitos) e, também omitiu-se o anticorpo primário, incubando algumas fatias apenas com a solução diluidora dos anticorpos (controle negativo). O protocolo apresentado a seguir foi testado e padronizado de acordo com a sensibilidade do método e titulação do anticorpo primário.

01. Lavagem em tampão Tris (0.1M, pH 7.6), 2 x 5 min
02. Incubação em peróxido de hidrogênio 1% por 30 min
03. Lavagem em tampão Tris, 5 min
04. Incubação em tampão Tris + Triton 0,1% por 20 min
05. Lavagem em tampão Tris, 5 min
06. Incubação em BSA 1% por 30 min
07. Lavagem em tampão Tris, 5 min
08. Incubação em anticorpo primário (diluído em Tris + BSA 0,1%) por 24h a 4 °C
09. Lavagem em tampão Tris, 5 min
10. Incubação com anticorpo secundário polivalente (Kit LSAB Rato, DAKO) por 30 min
11. Lavagem em tampão Tris, 5 min
12. Incubação com sistema visualização por peroxidase (Kit LSAB Rato, DAKO) por 30 min

13. Lavagem em tampão Tris, 5 min
14. Revelação com DAB líquido (DAKO)
15. Lavagem em água destilada
16. Montagem dos cortes em lâminas e secagem durante a noite
17. Desidratação em álcool
18. Diafanização em xileno
19. Montagem com Entellan (Merck)

A imunorreatividade dos núcleos estudados foi quantificada, contando-se o número de núcleos positivos para o anticorpo em estudo. Cada núcleo de interesse foi analisado em ambos os hemisférios para a contagem total de células positivas, determinando-se a média como o valor representativo da expressão do peptídeo em cada grupo.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão representados como média \pm e.p.m. Alterações na quantidade de ração ingerida foram analisadas por MANOVA, com Grupo (CTL e PSP), Dias (Dia 1, Dia 2, Dia 3 e Dia 4) e Período (manhã e noite) como fatores principais. Os dados de variação de peso, porcentagem de rejeitos e concentrações hormonais foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas repetidas, com fatores principal Grupo (CTL e PSP) e Dias como medida repetida. Os resultados de imunohistoquímica, contagem de células e densidade óptica das células imunopositivas, foram analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. A análise a posteriori, quando necessária, foi realizada pelo teste de Newman-Keuls, com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. METABOLISMO

5.1.1. *Variação de Peso*

Ambos os grupos iniciaram os experimentos com valores basais de peso corporal semelhantes ($382,9 \pm 43,9$ X $389,2 \pm 40,5$; $t = 0,5$; $p = 0,72$). A ANOVA mostrou interação entre Grupo e Dia [$F(3,135) = 2,62$; $p = 0,05$] e a análise *post hoc* revelou que os animais PSP apresentaram peso menor do que os animais CTL durante todo o período de privação ($p < 0,05$). O peso dos animais CTL permaneceu estável, enquanto que o peso dos ratos PSP no Dia 4 de privação foi maior do que nos Dias 1 e 2 ($p < 0,005$).

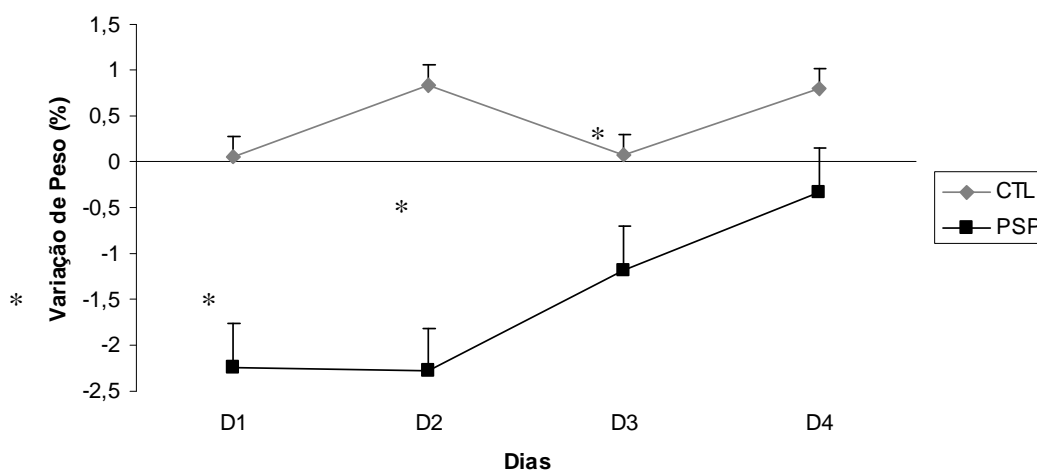


Figura 2. Variação de peso durante o período de PSP. Valores representados como porcentagem de variação de peso $[(\text{peso atual} - \text{peso anterior}) / \text{peso anterior}] \times 100$. * diferente do respectivo grupo controle ($p < 0,05$).

5.1.2. Consumo Alimentar

MANOVA revelou o efeito principal do Período [$F(1,14) = 650,26$; $p < 0,00$], Figura 3A. O consumo alimentar, no grupo experimental, foi maior durante o período da manhã, comparado ao grupo CTL ($p < 0,001$). Interações entre Grupo e Dia [$F(3,42) = 7,234$; $p < 0,001$] e entre Dia e Período [$F(3,42) = 3,056$; $p < 0,05$] foram encontradas. A análise destas interações mostrou que os animais controle consumiram mais ração nos Dias 3 e 4 do que nos Dias 1 e 2 ($p < 0,01$). O consumo total diário foi maior no grupo PSP do que no grupo CTL no Dia 4 ($p < 0,05$), Figura 3B). O consumo total apresentou-se aumentado durante o período da manhã no grupo privado de sono comparado ao grupo controle (CTL: $15,88 \pm 5,1$ X PSP: $26,51 \pm 9,9$; $t = 2,69$; $p < 0,05$), enquanto que o consumo total no período da noite foi igual entre os grupos (CTL: $82,12 \pm 12,2$ X PSP: $86,49 \pm 15,5$) Figura 3C.

5.1.3. Resíduos:

A ANOVA mostrou efeito principal do Período [$F(7,189)=3,17$; $p < 0,01$] e a análise a posteriori mostrou que a quantidade de resíduos encontrada em relação ao consumo total de ração foi constante durante o período de privação, exceto por um aumento na noite 3, quando comparado ao dia 2 ($p < 0,01$) e à noite 2 ($p < 0,05$), Figura 4.

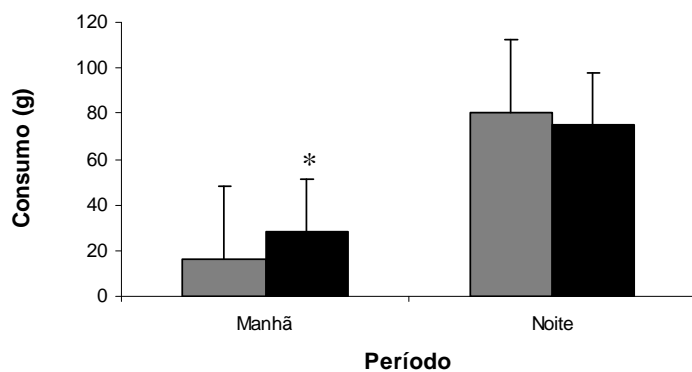
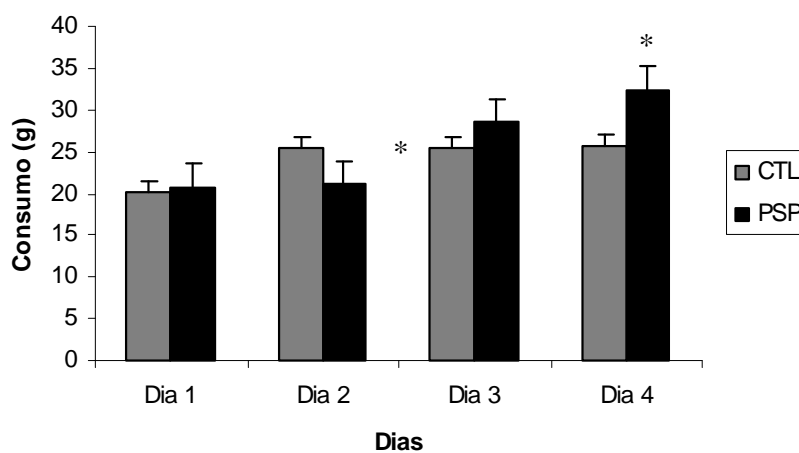
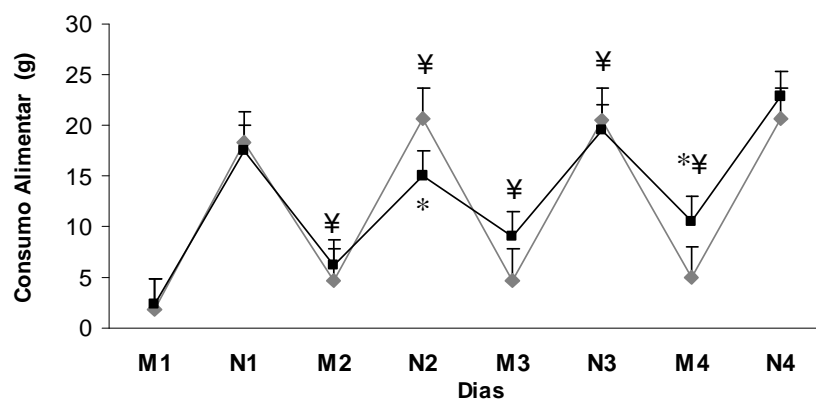


Figura 3. (A) O consumo alimentar de animais submetidos à PSP e grupo CTL foi medido duas vezes ao dia as 8h00 (estimativa de consumo noturno) e as 17h00 (estimativa de consumo diurno) e subtraído-se os valores de resíduos coletados da água no fundo do recipiente de privação. (B) Consumo total diário. (C) Consumo total por período. Valores representados como média \pm e.p.m.; $n = 20$ /grupo. * diferente do respectivo grupo controle; \neq diferente da manhã/noite 1 ($p < 0,05$).

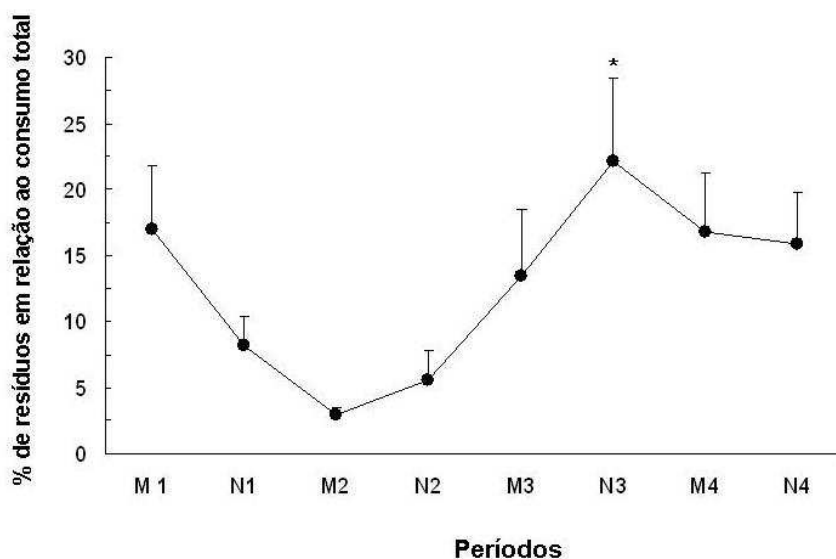


Figura 4. Percentual de resíduos em relação ao consumo real. Valores representados como média \pm e.p.m.; n = 20. * diferente de D2 e N2 ($p < 0,05$).

5.1.4. ACTH:

Todos os animais apresentaram valores basais de ACTH semelhantes (CTL: $64,0 \pm 5,8$; n=8 X PSP: $80,5 \pm 10,6$; n=8). Foram observados efeitos principais do Grupo [$F(1,14)= 15,0$; $p < 0,001$], Dia [$F(4,56)=6,6$; $p < 0,001$] e Interação Grupo x Dia [$F(4,56)=3,8$; $p < 0,01$]. Os animais que foram submetidos à PSP apresentaram concentrações significativamente maiores de ACTH do que os animais CTL nos Dias 1 e 2 de privação ($p < 0,05$), Figura 5.

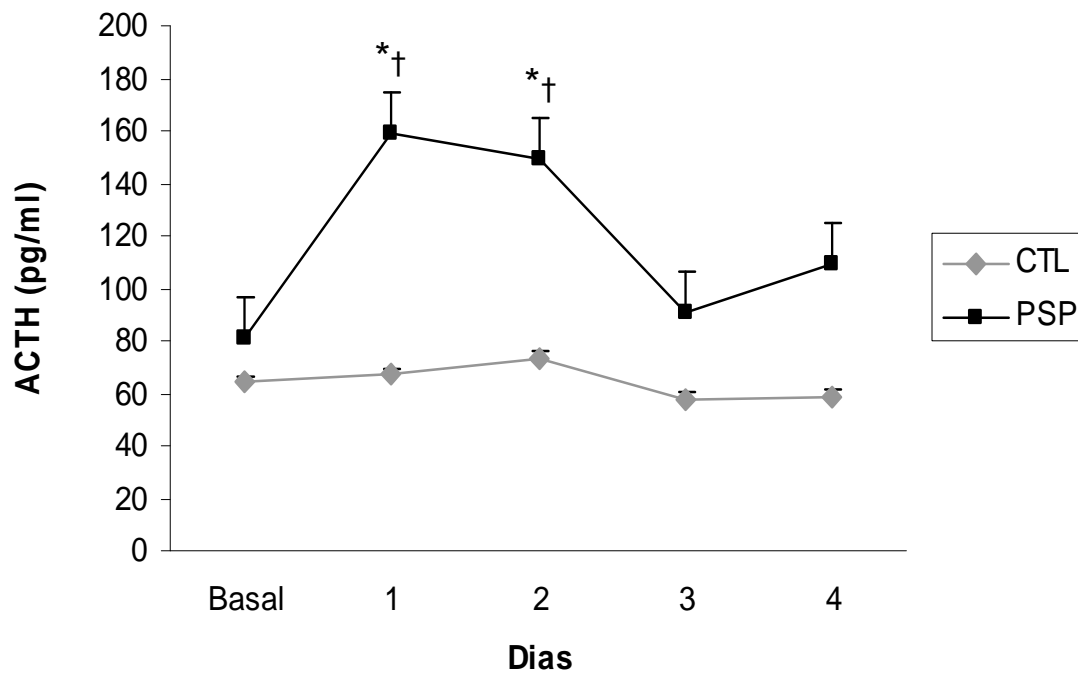


Figura 5. Variação da concentração plasmática de ACTH (pg/ml) durante o período de PSP. Valores expressos como média \pm e.p.m.; n = 10/grupo. As amostras de sangue foram coletadas diariamente as 08h00 durante o período de PSP. *diferente do basal; † diferente do CTL no mesmo dia ($p < 0,05$).

5.1.5. CORTICOSTERONA:

Todos os animais apresentaram valores basais de CORT semelhantes (CTL: $41,1 \pm 14,12$; $n=8$ X PSP: $57,0 \pm 11,0$; $n=8$). A ANOVA revelou efeitos principais de Grupo [$F(1,14) = 10,48$; $p < 0,005$] e Dia [$F(4,56) = 4,05$; $p < 0,005$]. A análise desse efeito mostrou que os animais do grupo PSP apresentaram concentrações significativamente aumentadas de CORT em comparação ao grupo CTL, durante todo o período experimental ($p < 0,01$) e um pico no Dia 1 de privação em relação aos outros dias ($p < 0,05$).

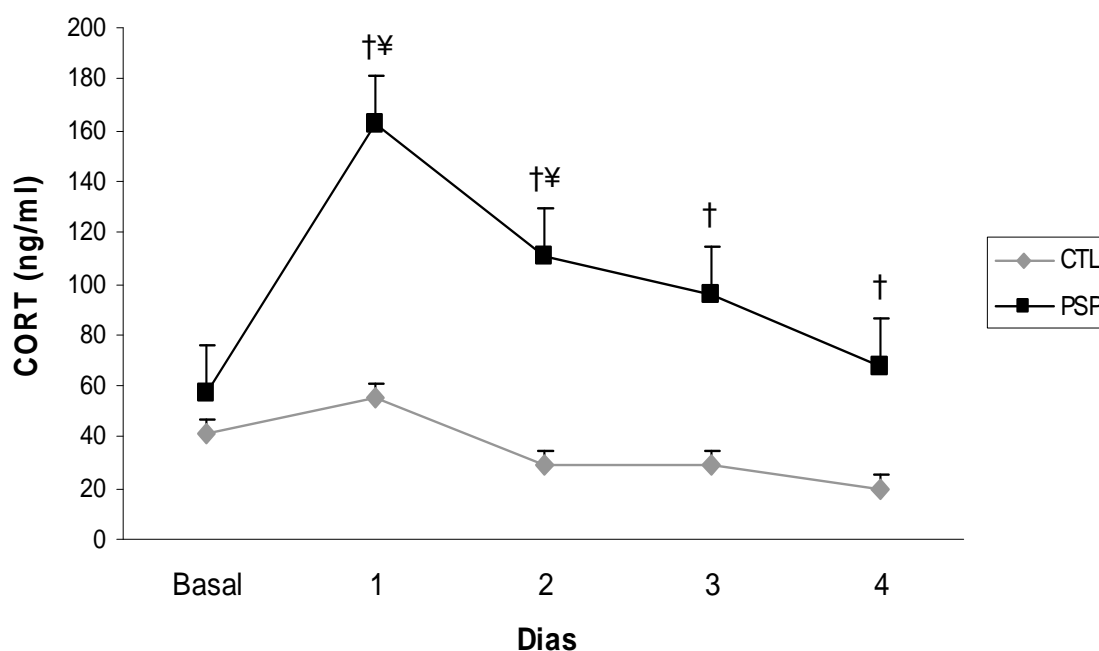


Figura 6. Variação nas concentrações plasmáticas de corticosterona (ng/ml) durante o período de PSP. Valores expressos como média \pm e.p.m.; $n = 10$ /grupo. As amostras de sangue foram coletadas diariamente as 08h00 durante o período de PSP. † diferente do CTL no mesmo dia; ¥ diferente de todos os outros dias ($p < 0,05$)

5.2. IMUNOHISTOQUÍMICA

5.2.1. Controles:

O controle da técnica foi realizado por meio de incubação com GFAP e omissão de anticorpos, incubando-se fatias contendo os núcleos estudados com apenas a solução diluidora dos anticorpos. Observou-se a marcação específica de astrócitos com a incubação de GFAP e a ausência de marcação nos cortes incubados apenas com a solução diluidora, comprovando a ausência de marcação inespecífica, o que pode ser verificado na Figura 7.

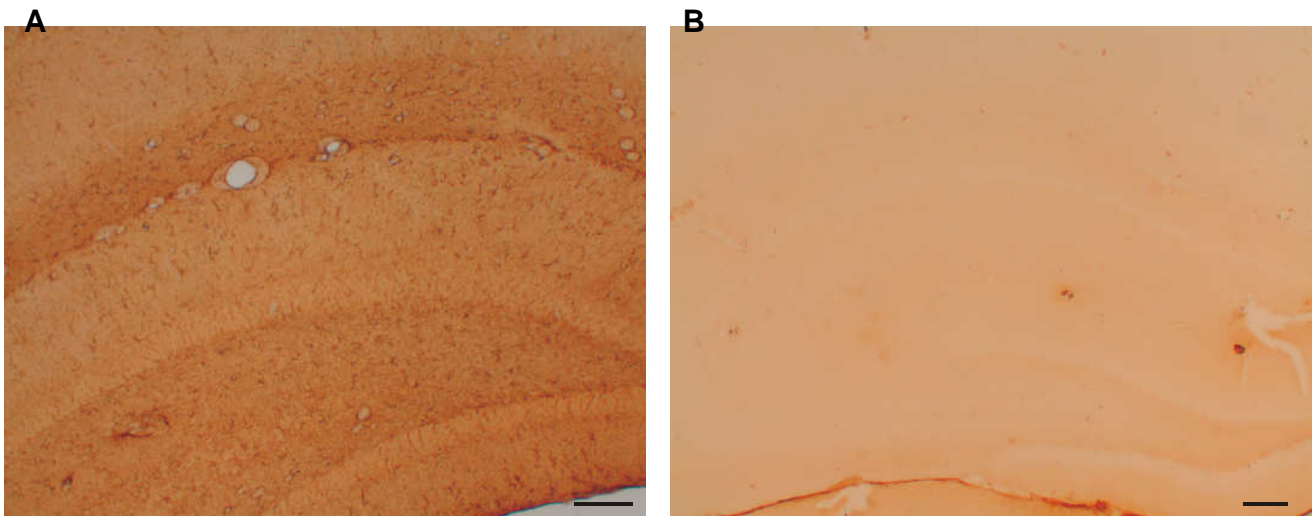


Figura 7. Fotomicrografias de cortes incubados com GFAP em aumento de 20x (A) e controle negativo (B) em aumento de 10x.

As médias do número de células imunoreativas para a expressão de Fos nas áreas hipotalâmicas estudadas encontram-se na Tabela 1, a seguir:

Tabela 1. Número de células positivas para Fos em diferentes núcleos hipotalâmicos

GRUPOS	FOS		
	ARC	LHA	PVN
CTL	172,6 ± 22,2 (8)	418,0 ± 17,5 (8)	384,0 ± 44,4 (7)
PSP	151,8 ± 26,6 (7)	615,5 ± 49,7 (7)*	537,5 ± 48,7 (5)*

Valores representados como média ± erro padrão da média, (n). * diferente do grupo controle.

5.2.2. Expressão de Fos:

O número de células que expressaram a proteína Fos foi maior no grupo PSP na área hipotalâmica lateral [LHA: PSP: 615,6 ± 49,7 (n = 7) x CTL: 418,0 ± 17,5 (n=8); U = 3,5; z = -2,83; p < 0,004 e PVN: PSP: 537,5 ± 48,7 (n=5) x CTL: 384,0 ± 44,4 (n=7); U = 6,0; z = -1,86; p < 0,06], Figura 8.

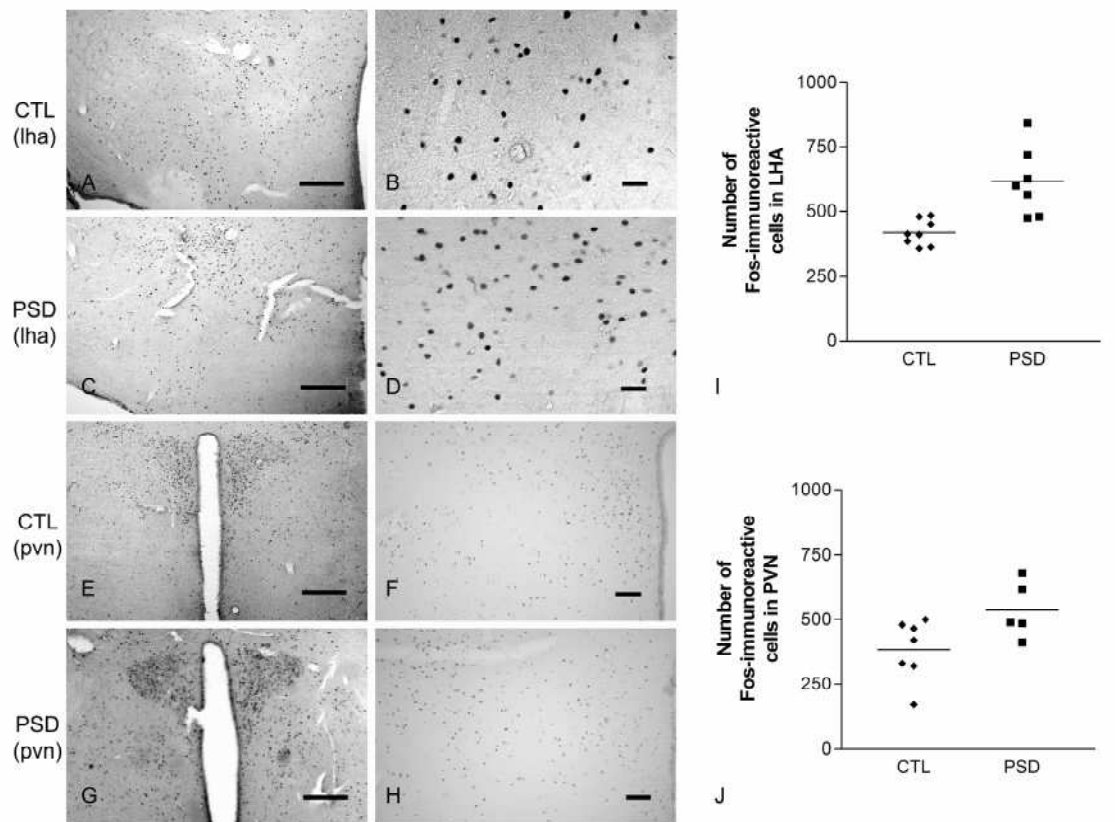


Figura 8. Fotomicrografia representativa de imunorreatividade (IR) do Fos no LHA de animais CTL (A-B) e PSP (C-D), e no PVN de animais CTL (E-F) e PSP (G-H). Representação gráfica da distribuição dos valores médios de células imunorreativas para FOS na LHA (I) e PVN (J) de ambos os grupos. Barras de escala representam 250 μm em A, C, E e G; 25 μm em B e D; e 50 μm em F e H.

5.2.3. Expressão de ORX, CRH e NPY:

As médias do número de células imunoreativas para os neuropeptídeos hipotalâmicos estudados encontram-se na Figura 9, Tabela 2, a seguir:

Tabela 2. Número de células positivas nos núcleos hipotalâmicos específicos

GRUPOS	PEPTÍDEOS		
	NPY	ORX	CRH
CTL	22,7 ± 2,8 (7)	85,9 ± 11,0 (8)	88,9 ± 15,6 (8)
PSP	26,3 ± 3,0 (7)	128,0 ± 7,1 (6)*	186,5 ± 14,3 (6)*

Valores representados como média ± erro padrão da média, (n). * diferente do grupo CTL.

O número de células expressando ORX e CRH foi significativamente maior para o grupo PSP, comparado ao CTL [LHA: PSP: 128,0 ± 7,1 (n=6) x CTL: 85,9 ± 11,1 (n = 8); U = 7,0; z = -2,2; p < 0,02; e PVN: PSP: 186,5 ± 14,3 (n = 6) x CTL: 88,9 ± 15,6 (n= 8); U = 6,0; z = -2,3; p < 0,001], Figura 9.

Não foram encontradas diferenças entre os grupos na expressão de Fos ou de NPY no ARC [Fos: PSP: 151,8 ± 26,63 (n= 7) x CTL: 172,6 ± 22,23 (n= 8); U = 20,0; z = 0,92; p = 0,35 e NPY: PSP: 26,3 ± 3,0 (n = 7) x CTL: 22,7 ± 2,8 (n = 7); U = 19,0; z = -0,70; p = 0,48], Figura 10.

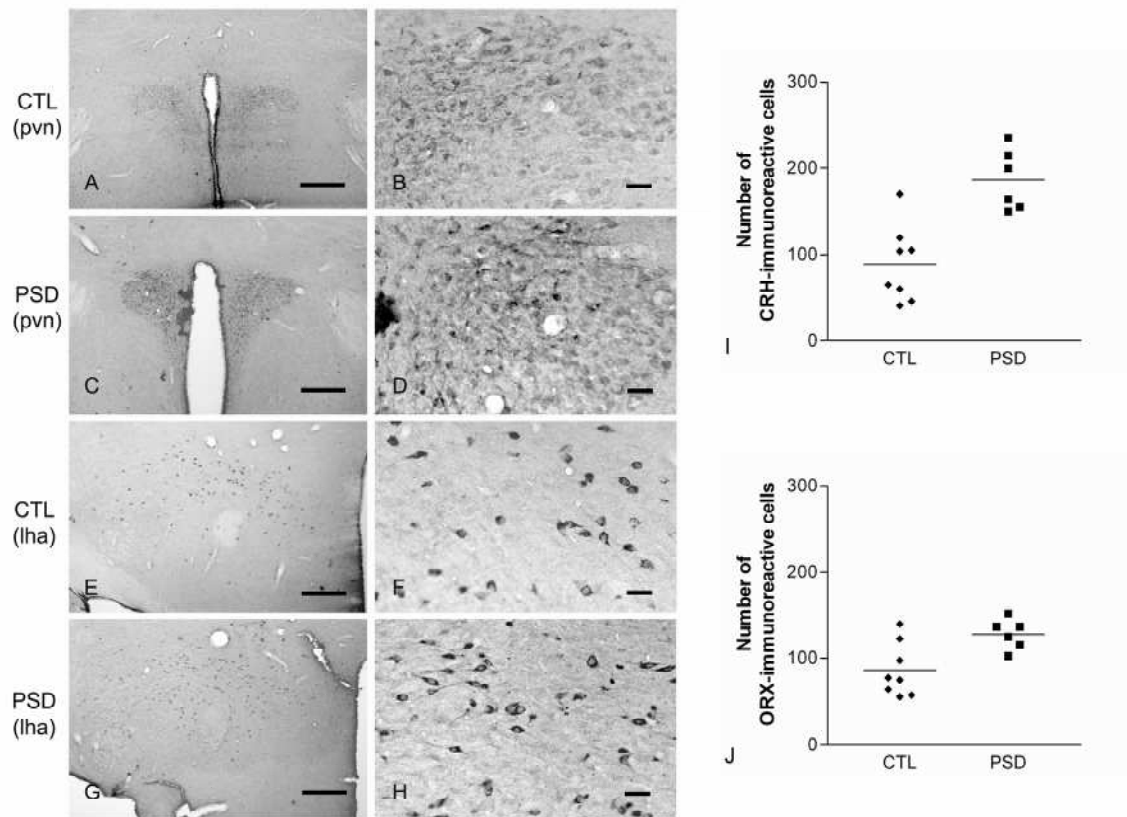


Figura 9. Fotomicrografia representativa da imunorreatividade para CRH no PVN de animais CTL (A-B) e PSP (C-D), e para ORX na LHA de animais CTL (E-F) e PSP (G-H). Representação gráfica da distribuição dos valores médios de células imunorreativas para FOS na LHA (I) e PVN (J) de ambos os grupos. Barras de escala representam 250 μm em A, C, E e G; e 25 μm em B, D, F e H.

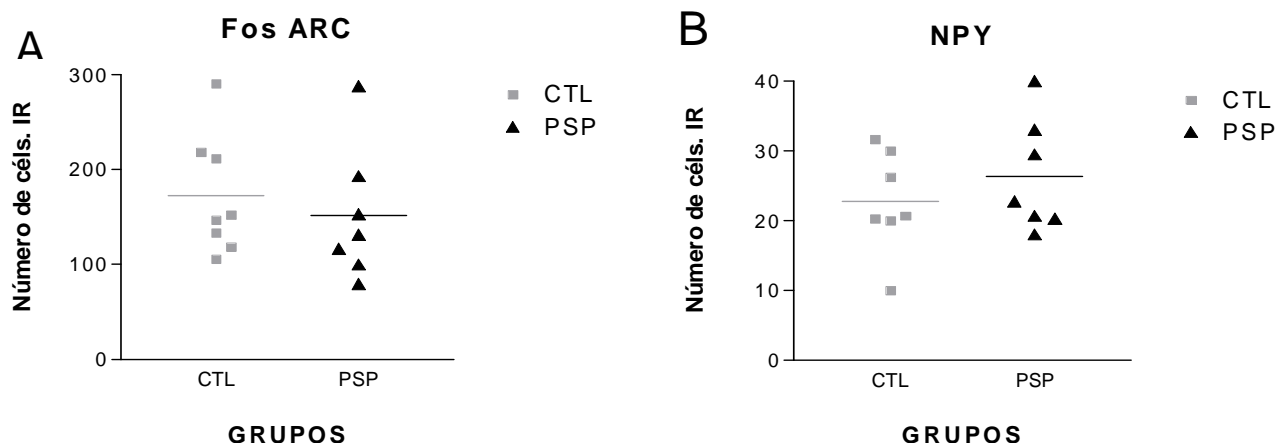


Figura 10. Distribuição das médias do número de células imunorreativas para Fos (A) e NPY (B) no ARC de animais do grupo CTL ou submetidos à PSP por 96h.

6. DISCUSSÃO

Os principais achados deste trabalho foram que: 1) a PSP resultou em perda significativa de peso corporal, sem maiores alterações no consumo alimentar, exceto pelo aumento do consumo no período da manhã; 2) as concentrações plasmáticas de ACTH e CORT apresentaram-se aumentadas no grupo experimental durante todo o período de privação, comparado ao grupo controle; 3) a PSP induziu o aumento da expressão de Fos na LHA e no PVN; 4) a PSP induziu o aumento na expressão de ORX e CRH na LHA e no PVN, respectivamente.

A PSP resultou em alterações de peso corporal, o que corrobora resultados previamente descritos na literatura, independente do método ou duração utilizados

para promover a privação de sono paradoxal (Suchecki & Tufik, 2000; Suchecki et al, 1998; Kushida et al, 1989; Everson & Crowley, 2004; Hipólide et a, 2006; Koban et al, 2006; Martins et al, 2006). O aumento de gasto energético como resultado da privação de sono é baseado em evidências consistentes, em que ocorre perda de peso corporal mesmo que o padrão de consumo alimentar seja normal (Martins et al, 2006; Everson & Wehr, 1993), aumentado (Koban & Swinson, 2005; Everson & Crowley, 2004; Hanlon et al, 2005) ou quando ocorre aumento do consumo de carboidratos (Suchecki et al, 2003; Bhanot et al, 1989).

Além disso, animais privados de sono apresentam aumento do consumo de oxigênio e da expressão da proteína desacopladora UCP-1 no tecido adiposo marrom, enzima esta envolvida no processo de termogênese e fornecimento de energia. O aumento da expressão dessa proteína acompanha o aumento da duração da privação (Koban & Swinson, 2005).

Dados recentes do nosso grupo (Martins et al, 2006), mostram ausência de aumento no consumo alimentar em ratos PSP pelo método da plataforma única. Grandes quantidades de resíduos de ração são encontradas na água coletada do fundo da lata de privação. Estes resíduos podem representar o que estudos anteriores inferem como consumo, superestimando os valores reais de ingestão de ração. No presente estudo, a avaliação do consumo diurno e noturno, descontando-se os resíduos coletados, mostrou que enquanto os animais do grupo CTL apresentaram uma diferença bastante estável entre o consumo no período da manhã e no período da noite, o mesmo padrão não foi observado nos animais PSP, que apresentaram um achatamento no perfil circadiano de alimentação. A soma do consumo em ambos os períodos, representando o

consumo total diário dos grupos, resultou em maior ingestão de ração no grupo PSP somente no Dia 4. O achatamento do padrão alimentar em animais PSP poderia ser explicado por achados recentes de que a administração de ORX abole a ritmicidade circadiana de alimentação sem afetar o consumo diário total (Haynes et al, 1999; Yamanaka et al, 1999). Esse achado, somado ao presente resultado de aumento de expressão de ORX no LHA, substanciam o achatamento no padrão de ingestão alimentar observado neste estudo.

De acordo com Martins e colaboradores (2006), o grande quantidade de resíduos poderia ser explicado pelo aumento do comportamento de roer. De fato, estudos clássicos de nosso grupo mostram que animais privados de sono paradoxal apresentam aumento de comportamentos estereotipados induzidos por drogas dopaminérgicas (Tufik et al, 1978). Porém, é importante considerar que no grupo CTL, quando as migalhas caem na maravalha, podem ser resgatadas, o que não acontece com o grupo PSP, que provavelmente rói mais para obter alimento. A quantidade de resíduos coletada foi constante durante todo o período de privação, com exceção de um aumento na noite 3 quando comparado com o dia e a noite 2. No segundo dia foram obtidas quantidades de resíduos ligeiramente menores do que nos outros dias, porém estes valores só foram estatisticamente significativos quando comparados à noite 3.

A redução das concentrações plasmáticas de leptina previamente descritas (Koban & Swinson, 2005; Everson & Crowley, 2004), estão de acordo com a diminuição do tecido adiposo observada nestes animais (Hipólide et al, 2006). A diminuição do tecido adiposo poderia ser consequência do aumento da atividade do eixo HPA, como demonstrado neste estudo, pela coleta diária de sangue dos

animais. Apesar de termos observado uma habituação ao método de coleta, a liberação de ACTH e CORT permaneceu elevada no grupo PSP. Resultados anteriores, obtidos em nosso laboratório, em que animais foram sacrificados diariamente para a obtenção de plasma (Andersen et al, 2005), mostram concentrações plasmáticas de ACTH e CORT maiores do que as observadas neste estudo. Esta diferença pode ser devida ao aumento da reatividade dos animais à manipulação para o procedimento de decapitação. Nossos animais foram manipulados diariamente e habituados ao procedimento de coleta de sangue pela cauda, possivelmente, resultando em menor reatividade ao processo de obtenção das amostras. Porém, o fato de que a expressão de Fos e CRH apresentaram-se aumentadas no PVN dos animais PSP, em comparação ao grupo CTL, é um indício de que o eixo HPA manteve-se ativado como um todo nestes animais. O aumento da imunoreatividade para CRH e da expressão do seu RNAm no PVN já haviam sido descritos anteriormente, a partir do 5º dia de privação de sono paradoxal. No estudo de Fadda e Fratta (1997), animais submetidos a 72h de privação de sono pelo método da plataforma única apresentam aumento no conteúdo de CRH no estriado (+224%), áreas límbicas (+144%) e hipófise (+42%), enquanto que no hipotálamo, ocorre uma redução desse conteúdo (-57%). Além disso, observa-se redução do *binding* de receptores para CRH no estriado (-33%) e hipófise (-38%). Entretanto ao que sabemos, esta foi a primeira vez em que o funcionamento de todo o eixo foi testado nos mesmos animais durante todo o período experimental.

A atividade da LHA apresentou-se aumentada visto que foram encontrados aumentos na expressão tanto de Fos como de ORX nesta área após 96h de PSP.

No entanto, a interpretação do aumento da expressão de Fos deve ser feita com cautela. O aumento da atividade na LHA pode não ser atribuído necessariamente à maior expressão de células orexinérgicas, já que outros neurônios presentes nesta região poderiam também ter sua atividade aumentada. Neste caso, a marcação dupla para a expressão de ambas as proteínas Fos e ORX elucidaria esta questão.

A ORX está envolvida no controle da vigília ativa, porém não participa na vigília quieta, sem atividade motora (Tortero et al, 2003; Estabrooke et al, 2001). Este peptídeo também participa da ativação do eixo HPA, contribuindo para a ativação do metabolismo e gasto energético (Kuru et al, 2000).

O envolvimento da ORX com os comportamentos de ingestão e sono já está bem estabelecido. A administração aguda de ORX aumenta, de modo dose-dependente, o alerta associado a processos fisiológicos e comportamentais incluindo consumo alimentar, tempo de despertar, atividade motora, taxa metabólica, pressão sanguínea (Willie et al, 2001). Microinjeções de ORX-A ou -B diretamente no núcleo ARC aumentam a ingestão de ração, sem efeitos na atividade motora ou estereotipia (Muroya et al, 2004; Yamanaka et al; 2000) que são comumente associados à administração i.c.v. deste peptídeo (Ida et al, 1999; Nakamura et al, 2000). Estes resultados sugerem que a ingestão alimentar induzida pela ORX não é apenas devida ao aumento do alerta ou vigília prolongada. A ORX apenas aumenta exclusivamente o comportamento alimentar quando injetada no núcleo ARC. Porém, quando administrado i.c.v, este peptídeo também aumenta atividade motora e estereotipia (Muroya et al, 2004; Yamanaka et al, 2000). Estes dados podem sugerir que a ORX esteja envolvida na atividade

motora dos animais privados de sono paradoxal Estes comportamentos são mediados pelo sistema dopaminérgico e esta via pode estar envolvida na expressão de respostas emocionais induzidas pela ORX (Nakamura et al, 2000), uma vez que a ORX tem uma participação importante em comportamentos motivados, compulsão e busca por recompensas (Borgland et al, 2006).

Tortorelo e colaboradores (2003) sugerem que a ORX seja responsável pela atividade motora observada durante a vigília ativa, pois a expressão da proteína Fos apresenta-se aumentada na LHA de gatos durante a vigília ativa, porém não durante a vigília quieta. Além disso, observa-se aumento da concentração de ORX no líquido cefalorraquidiano após 6 e 96 horas de privação de sono paradoxal em ratos (Pedrazzoli et al, 2004), sugerindo um mecanismo compensatório para a vigília forçada imposta a estes animais.

O aumento das concentrações plasmáticas de CORT no grupo PSP pode ser responsável pelo aumento do consumo alimentar observado nos Dias 3 e 4, pois o efeito orexigênico da ORX é drasticamente reduzido pela adrenalectomia (ADX) e é restabelecido pela administração de altas (125 mg/l) concentrações de CORT. A expressão do precursor pre-pro-ORX não é reduzida pela ADX, porém é elevada com a reposição de CORT, tanto no grupo sham como no ADX, mas somente no período da manhã. Portanto, os glicocorticóides parecem regular a atividade de neurônios orexinérgicos (Ford et al, 2005).

A importância da CORT na ingestão alimentar induzida por NPY foi demonstrada há bastante tempo, com a abolição do efeito orexigênico do NPY, injetado no PVN, após a ADX, sendo que o efeito é revertido e a ingestão é normalizada pela reposição com CORT (Stanley et al, 1989). No entanto,

surpreendentemente não encontramos aumento na expressão de Fos ou NPY no ARC. Além disso, com a redução da concentração de leptina nos animais privados de sono paradoxal (Koban e Swinson, 2005), imagina-se que o principal sinal inibitório para a síntese de ORX e NPY esteja reduzido, promovendo, portanto, o aumento da atividade de neurônios orexinérgicos na LHA e de NPY no ARC (Klok et al, 2007).

Estudos recentes mostram um aumento na expressão do RNAm para o NPY no núcleo ARC após 5 dias de PSP (Koban et al, 2006). É possível que estes neurônios apresentem uma resposta tardia, o que justificaria o aumento tardio do consumo alimentar, verificado no presente estudo apenas no 4º dia de PSP. Outra possível explicação é a de que a observação e quantificação de neurônios que contêm NPY sejam difíceis devido à sua presença em axônios. Talvez a melhor maneira de visualizá-los teria sido com a técnica de hibridização *in situ* (Hoffman & Lyo, 2002).

Os resultados apresentados sugerem uma seqüência temporal de eventos, na qual a PSP induz a ativação do eixo HPA, com aumento das concentrações plasmáticas de ACTH e CORT no primeiro dia de privação. O aumento de CORT promoveria intenso catabolismo periférico, com lipólise e, conseqüente perda de tecido adiposo, o que, por sua vez, resultaria em concentrações reduzidas de leptina produzindo maior expressão de orexina na LHA. Por fim, a expressão aumentada de orexina promoveria o aumento de comportamento alimentar e, possivelmente, do comportamento de roer, o que pode ser verificado pelo aumento da ingestão juntamente com o aumento do desperdício de ração, como foi observado a partir do 3º dia de privação.

7. CONCLUSÃO:

A PSP promoveu:

1. Perda de peso corporal desde o primeiro dia, enquanto o aumento do consumo de ração só foi evidenciado no último dia.
2. Achatamento no padrão circadiano de consumo alimentar, sendo que o grupo PSP ingeriu mais ração durante o dia, quando comparado ao grupo CTL.
3. Aumento da atividade do eixo HPA, observada em nível central, pelo aumento da expressão de Fos e CRH, e periférico, pelo aumento das concentrações plasmáticas de ACTH e CORT.
4. Aumento da expressão de Fos e ORX na LHA.

Portanto, a PSP promoveu alterações significativas no metabolismo periférico e a ativação de núcleos hipotalâmicos envolvidos no comportamento alimentar e na resposta de estresse.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol Behav* 2004; 81: 223-241.
- Akabayashi A, Zaia CTBV, Silva I, Chae HJ, Leibowitz SF. Neuropeptide Y in the arcuate nucleus is modulated by alterations in glucose utilization. *Brain Res* 1993; 621: 343-348.
- Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J. Sleep Res* 2005; 14: 83-90.
- Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Fang VS, Leitch CA, Schoeller DA, Refetoff S, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat: V. Energy use and mediation. *Sleep* 1989; 12: 31-41.
- Bernardis LL, Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 1996; 20: 189-287.
- Bhanot JL, Chhina GS, Singh B, Sachdeva U, Kumar VM. REM Sleep Deprivation and Food Intake. *Indian J Physiol Pharmacol* 1989; 33: 139-145.
- Borgland SL, Taha SA, 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: 589-601.
- Briski KP, Sylvester PW. Hypothalamic orexin-A immunopositive neurons express fos in response to central glucopenia. *Neuroreport* 2001; 12 (3): 531-534.
- Buchanan C, Mahesh V, Zamorano P, Brann D. Central Nervous System Effects of Leptin. *Trends in Endocrinol Metab* 1998; 9: 146-150.
- Chang F, Opp MR. Corticotropin-releasing hormone (CRH) as a regulator of waking. *Neurosci Behav Rev* 2001; 25: 445-453.

- Coenen AML, Van Luijtelaar ELJM. Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. *Physiol Behav* 1985; 35: 501-504.
- Cohen HB, Dement WC. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shocks in rats after derivation of "paradoxical" phase. *Science* 1965; 150: 1318-1319.
- Dallman MD, Pecoraro N, Akana SF, la Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD, Manalo S. Chronic stress and obesity: A new view of "comfort food". *PNAS* 2003; 11696-11701.
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, et al. The Hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 322-327.
- Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, et al. Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci* 2001; 21: 1656-1662.
- Everson CA, Crowley WR. Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286: E1060-E1070.
- Everson CA, Wehr TA. Nutritional and metabolic adaptations to prolonged sleep deprivation in the rat. *Am J Physiol Endocrinol* 1993; 264: R376-387.
- Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep* 1989; 12: 13-21.
- Fadda P, Fratta W. Stress-induced sleep deprivation modifies corticotropin releasing factor (CRF) levels and CRF binding in rat brain and pituitary. *Pharmacol Res* 1997; 35: 443-446.
- Flier J, Elmquist JK. A good night's sleep. *Ann Intern Med* 2004; 141: 885-886.

- Ford GK, Al-Barazanji KA, Wilson S, Jones DN, Harbuz MS, Jessop DS. Orexin expression and function: glucocorticoid manipulation, stress, and feeding studies. *Endocrinol* 2005; 146:3724-3731.
- Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, Honda K, Mignot E, Nishino S. Changes in CSF hypocretin-I (orexin A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. *Neuroreport* 2001; 12: 1-5.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, et al. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad of Sci* 1999; 96: 10911-10916.
- Hanlon EC, Andrzejewski ME, Harder BK, Kelley AE, Benca RM. The effect of REM sleep deprivation on motivation for food reward. *Behav Brain Res* 2005; 163:58-69.
- Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, et al. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 1999; 20: 1099-1105.
- Hipólido DC, Suchecki D, Pimentel de Carvalho Pinto A, Chiconelli Faria E, Tufik S, Luz J. Paradoxical Sleep Deprivation and Sleep Recovery: Effects on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 231-238.
- Hoffman GE, Lyo D. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: Are we all 'Fos-ed-out'? *J Neuroendocrinol* 2002; 14: 259-268.
- 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.
- Jhanwar-Uniyal M, Beck B, Jhanwar YS, Bulet C, Leibowitz S. Neuropeptide Y projection from arcuate nucleus to parvocellular division of paraventricular nucleus: specific relation to the ingestion of carbohydrate. *Brain Res* 1993; 631: 97-106.
- Jhanwar-Uniyal M, Beck B, Bulet C, Leibowitz SF. Diurnal rhythm of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the suprachiasmatic, arcuate and paraventricular nuclei and other hypothalamic sites. *Brain Res* 1990; 536: 331-334.
- Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* 2007; 8: 21-34.
- Koban M, Le WW, Hoffman GE. Changes in hypothalamic CRH, NPY, and POMC gene expression during chronic REM sleep deprivation of rats. *Endocrinol* 2006; 147: 421-431.
- Koban M, Swinson K. Chronic REM-sleep deprivation of rats elevates metabolic rate and increases UCP1 gene expression in brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E68-74.
- Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12:118-122
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.

- Kuru M, Ueta Y, Serino R, Nakazato M, Yamamoto Y, Shibuya I, et al. Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport* 2000; 11: 1977-1980.
- Kushida CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat: IV. Paradoxical sleep deprivation. *Sleep* 1989; 12: 22-30.
- Laugero KD. A New Perspective on glucocorticoid feedback: relation to stress, carbohydrate feeding and feeling better. *J Neuroendocrinol* 2001; 13: 827-835.
- Leibowitz S. Neurochemical-neuroendocrine systems in the brain controlling macronutrient intake and metabolism. *Trends in Neuroscience* 1992; 15: 491-497.
- Martinez-Gonzalez D, Obermeyer W, Fahy JL, Riboh M, Kalin NH, Benca RM. REM sleep deprivation induces changes in coping responses that are not reversed by amphetamine. *Sleep* 2004; 27:609-617.
- Martins PJ, D'Almeida V, Nobrega JN, Tufik S. A reassessment of the hyperphagia/weight-loss paradox during sleep deprivation. *Sleep* 2006; 29:1233-1238.
- Mignot E. A Commentary on the Neurobiology of the Hypocretin/Orexin System. *Neuropsychopharmacol* 2001; 25: 5-12.
- Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu Rev Neurosci* 1991; 14:421-451.
- Mullet MA, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM. Hypocretin I in the lateral hypothalamus activates key feeding-regulatory brain sites. *Neuroreport* 1999; 11:103-107.

- Muroya S, Funahashi H, Yamanaka A, Kohno D, Uramura K, Nambu T, et al. Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 1524-1534.
- Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, et al. Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res* 2000; 873: 181-187.
- Pecoraro N, Dallman MF, Warne JP, Ginsberg AB, Laugero KD, la Fleur SE et al. From Malthus to motive: How the HPA axis engineers the phenotype, yoking needs to wants. *Prog Neurobiol* 2006; 79: 247-340.
- Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinol* 2004; 145: 3754-3762.
- Pedrazzoli M, D'Almeida V, Martins PJF, Machado RB, Ling L, Nishino S, Tufik S, Mignot E. Increased hypocretin-1 levels in cerebrospinal fluid after REM sleep deprivation. *Brain Res* 2004; 995: 1-6.
- Sahu A. Interactions of neuropeptide Y, hypocretin-I (orexin A) and melanin-concentrating hormone on feeding in rats. *Brain Res* 2002; 944: 232-238.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-585
- Saper C. Staying awake for dinner: integration of sleep, feeding, and circadian rhythms. *Prog Brain Res* 2006; 153: 243-252

Sapolsky RM, Romero ML, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews* 2000; 21: 55-89.

Spiegel K, Tasali E, Penev P, Van Cauter E. Brief communication: sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann Intern Med* 2004; 141: 846-850.

Stanley BG, Lanthier D, Chin AS, Leibowitz SF. Suppression of neuropeptide Y-elicited eating by adrenalectomy or hypophysectomy: reversal with corticosterone. *Brain Res* 1989; 501:32-36.

Suchecki D, Antunes J, Tufik S. Palatable solutions during paradoxical sleep deprivation: reduction of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and lack of effect on energy imbalance. *J Neuroendocrinol* 2003; 15: 815-821.

Suchecki D, Tiba PA, Tufik S. Paradoxical sleep deprivation facilitates subsequent corticosterone response to a mild stressor in rats. *Neurosci Letters* 2002; 320: 45-48.

Suchecki D, Tufik S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiol Behav* 2000; 68: 309-316.

Suchecki D, Lobo LL, Hipólido DC, Tufik S. Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Res* 1998; 7: 276-281.

- Taheri S, Lin L, Austin D, Young T, Mignot E. Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Med* 2004; 1: 210-217.
- Terao A, Peyron C, Ding J, Wurts SW, Edgar DM, Heller HC, et al. Preprohypocretin (propro-orexin) expression is unaffected by short-term sleep deprivation in rats and mice. *Sleep* 2000; 23: 867-874.
- Thrivikraman, KV, Su Y, Plotsky PM. Patterns of Fos-Immunoreactivity in the CNS Induced by Repeated Hemorrhage in Conscious Rats: Correlations with Pituitary-Adrenal Axis Activity. *Stress* 1997; 2: 145-158.
- Tortorolo P, Yamuy J, Sampogna S, Morales FR, Chase MC. Hypocretinergic neurons are primarily involved in activation of the somatomotor system. *Sleep* 2003; 26: 25-28.
- Tufik S, Lindsey CJ, Carlini EA. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacol* 1978; 16: 98-105.
- Ueno H, Yamaguchi H, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Reg Pep* 2005; 126: 11-19
- Williams G, Cai XJ, Elliot JC, Harrold JA. Anabolic neuropeptides. *Physiol Behav* 2004; 81: 211-222.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yahagisawa M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Ann Rev Neurosci* 2001; 24:429-458.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 1998; 280: 1378-1382.

Yamanaka A, Kunii K, Nambu T, Tsujino N, Sakai A, Matsuzaki I, et al. Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res* 2000; 859: 404-409.

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.

ABSTRACT

Food intake and sleep are controlled by overlapping regulatory mechanisms integrated by the hypothalamus. Paradoxical sleep (PS) deprivation leads to loss of body weight, increased metabolic rate and increased hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activation. Initially, there were reports of increased food intake during PS deprivation; however, recent studies have reported a large waste of chow in the water chamber, suggesting that PS-deprived rats may be chewing, but not necessarily consuming more food. The present study investigated changes in the immunoreactivity of Fos and of neuropeptides (CRH, NPY, and ORX) in hypothalamic nuclei related to energetic metabolism, to sleep regulation and to stress response. In addition, chow intake and plasma levels of ACTH and corticosterone were determined. PS deprivation resulted in the typical weight loss, in addition there was a blunted circadian pattern of food intake, due to an increase in food consumption during daytime; total daily consumption increased only on Day 4. The percentage of spillage found in the bottom of the chamber was constant throughout the procedure, except on night 3. HPA axis activity was increased as observed by the immunoreactivity of both Fos and CRH in the PVN and also by higher levels of ACTH and CORT in the experimental group. ORX and Fos immunoreactivity in the LHA were markedly increased at the end of PS deprivation. No changes were observed in either Fos or NPY immunoreactivity in the ARC. The present results suggest that metabolic changes induced by PS deprivation involve the activation of ORX neurons in

the lateral hypothalamus and of CRH neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.

